



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**DIVISION DE ESTUDIOS SUPERIORES
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES "DR. BERNARDO SEPULVEDA"
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI**

**CARACTERIZACION INMUNOFENOTIPICA
DEL INFILTRADO INFLAMATORIO EN LA
GLANDULA SALIVAL MENOR DE
PACIENTES CON SINDROME DE SJÖGREN
PRIMARIO Y LESION LINFOEPITELIAL.**

TESIS DE POSGRADO

**PARA OBTENER EL TITULO DE:
ESPECIALISTA EN REUMATOLOGIA**

QUE PRESENTA EL:

DR. ALFREDO DIAZ JIMENEZ

**TUTOR:
DR. CARLOS RIEBELING NAVARRO
MEDICO ADSCRITO AL DEPARTAMENTO DE REUMATOLOGIA DEL
H.E.C.M.N. S. XXI**



IMSS

MEXICO, D.F. 2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

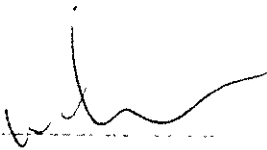
DIVISION DE ESTUDIOS SUPERIORES
INSITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES "DR BERNARDO SEPULVEDA"
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI

CARACTERIZACION INMUNOFENOTIPICA DEL INFILTRADO
INFLAMATORIO EN LA GLANDULA SALIVAL MENOR DE PACIENTES CON
SINDROME DE SJÖGREN PRIMARIO Y LESION LINFOEPITELIAL.

TESIS DE POSGRADO
PARA OBTENER EL TITULO DE:
ESPECIALISTA EN REUMATOLOGIA
QUE PRESENTA EL:
DR. ALFREDO DÍAZ JIMENEZ

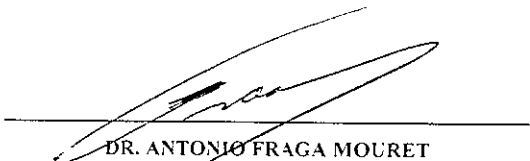
TUTOR:
DR. CARLOS RIEBELING NAVARRO
MEDICO ADSCRITO AL DEPARTAMENTO DE REUMATOLOGIA DEL H.E.
C.M.N. S.XXI

México 2001



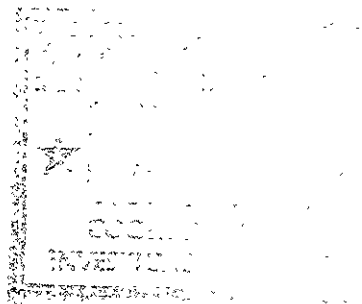
DR. NEILS WACHER RODARTE

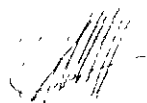
JEFE DE LA DIVISION DE EDUCACION E INVESTIGACION MEDICA HOSPITAL DE
ESPECIALIDADES, "DR BERNARDO SEPULVEDA"
CENTRO MEDICO NACIONAL SXXI.



DR. ANTONIO FRAGA MOURET

PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE REUMATOLOGIA, DEL HOSPITAL DE
ESPECIALIDADES, "DR. BERNARDO SEPULVEDA"
CENTRO MEDICO NACIONAL SXXI.





DR. CARLOS RIEBELING NAVARRO
MEDICO ADSCRITO AL DEPARTAMENTO DE REUMATOLOGIA, HOSPITAL DE
ESPECIALIDADES, "DR. BERNARDO SEPULVEDA"
CENTRO MEDICO NACIONAL S.XXI.



DR. ENRIQUE BLANCO LEMUS
MEDICO ADSCRITO AL DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA, HOSPITAL DE
ESPECIALIDADES, "DR. BERNARDO SEPULVEDA"
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI.

INDICE

ANTECEDENTES	6
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, HIPOTESIS Y OBJETIVO	10
MATERIAL Y METODOS	11
ANALISIS ESTADISTICO	12
RESULTADOS	13
DISCUSION	15
CONCLUSIONES	16
ANEXOS	17
BIBLIOGRAFIA	21

ANTECEDENTES

El Síndrome de Sjogren (SS) es una enfermedad autoinmune que se caracteriza por el infiltrado linfocitario de las glándulas salivales y lagrimales con una destrucción progresiva del parénquima tisular que lleva a una disminución o pérdida completa de la función secretora (1). El SS puede ser primario (SSP) o secundario, cuando se asocia a otra enfermedad autoinmune (1). La prevalencia del SS en la población general es desconocida. En los departamentos de reumatología el SS puede ser más frecuente que el lupus eritematoso sistémico y aproximadamente el 30% de los pacientes con artritis reumatoide y esclerodermia tienen al menos evidencia histológica de SS. No se conoce la prevalencia del SSP pero se considera que ésta depende de los criterios de clasificación utilizados (2). Los mecanismos responsables del daño tisular no están aún completamente entendidos. Sin embargo, se reconoce que el cuadro clinicopatológico es el resultado de la infiltración linfocitaria y fibrosis de las glándulas salivales y lagrimales. El infiltrado está constituido fundamentalmente por linfocitos T CD4⁺ y en menor porcentaje por linfocitos B y células plasmáticas. El factor reumatoide se presenta en aproximadamente en el 75% de los pacientes, y los anticuerpos antinucleares (SSA-Ro y SSA-La) aparecen en el 50 a 80% de los casos. En los pacientes con estos auto-anticuerpos son frecuentes los alelos HLA-DQA1 y DQB-1 (3). No obstante la gran cantidad y variedad de auto-anticuerpos presentes en el SSP, no hay datos concluyentes que estos sean responsables de las lesiones tisulares. De esta manera se ha involucrado a los linfocitos T CD4⁺ como las células responsables del proceso inflamatorio autoinmune. El análisis molecular del receptor de los linfocitos T (TCR) que componen el infiltrado en la glándula salival indica una expansión clonal, sugiriendo una estimulación dirigida por antígenos (4). La naturaleza del auto-antígeno no se conoce, aunque algunos datos sugieren como candidato a una proteína del citoesqueleto llamada la alfa-fodrina (5). Adicionalmente se ha demostrado que las células del epitelio ductal y acinar son destruidas mediante una actividad citotóxica (6).

El primer hallazgo histológico en la glándula salival en el SSP es la infiltración linfocitaria periductal y perivascular (2). La infiltración linfocitaria se incrementa progresivamente y pueden observarse folículos linfoides con centros germinales. Conforme el infiltrado inflamatorio aumenta, las células epiteliales de los conductos pueden mostrar hiperplasia llegando a obstruir las luces de los mismos. Posteriormente se produce pérdida de acinos con fibrosis y hialinización. Los folículos linfoides reactivos están rodeados por células semejantes a centrocitos que infiltran el epitelio ductal. El aumento de los agregados se correlaciona con la formación de estructuras derivadas del epitelio ductal hiperplásico con infiltración por linfocitos (lesión linfopitelial benigna o islas mioepiteliales), denominadas por algunos autores como sialoadenitis mioepitelial (MESA) (7-9). La LLE es un hallazgo histopatológico que se observa en los pacientes con SS principalmente en la glándulas parótidas y menos frecuente en las glándulas submandibulares. La LLE aparece en las glándulas parótidas en aproximadamente el 85% de los pacientes y en el 15% en las glándulas submandibulares (10). Cuando las glándulas submandibulares están afectadas, las glándulas parótidas también lo están. Clínicamente los pacientes presentan una inflamación firme y recurrente de las glándulas afectadas que pueden o no asociarse a dolor (11).

Histológicamente, la LLE en la glándula salival mayor esta caracterizada por una infiltración linfocitaria de la glándula, atrofia parenquimatosa y a un foco de proliferación epitelial llamado isla mioepitelial. Por los métodos de inmunohistoquímica microscopía electrónica se ha confirmado que las islas mioepiteliales están compuestas tanto de células diferenciadas ductales y mioepiteliales (12,13). En los estadios tempranos de la enfermedad existen frecuentemente focos de proliferación linfoide periductal y en etapas más avanzadas hay casi un total reemplazo de los componentes glandulares por una infiltración linfocitaria. Los lóbulos glandulares no están igualmente afectados y puede formarse centros germinales dentro del infiltrado linfocitario que pueden ser pequeños o extensos. El infiltrado linfocitario es primariamente policlonal con un predominio de linfocitos T (14,15). En etapas tardías de la enfermedad, los linfocitos B y las células plasmáticas predominan (16). Las islas mioepiteliales están constituidas por una hiperplasia de células ductales y de foco de linfocitos residuales. Las islas mioepiteliales son

específicamente infiltradas por linfocitos y cuando son más grandes que los linfocitos circulantes y tienen un citoplasma claro, son hallazgos que los distinguen como células B monocitoides del tejido linfóide asociado a mucosa (MALT) (17). En este fondo es donde surge el LNII de linfocitos B de bajo grado. El primer dato de linfoma es la presencia de células semejantes a centrocitos con infiltración por grupos pequeños y alrededor de las islas mioepiteliales en zonas amplias. Posteriormente, se pierden los folículos reactivos y la arquitectura lobular de la glándula es modificada por la presencia de abundantes linfocitos neoplásicos.

Notoriamente, las glándulas salivales menores (GSm) raramente presentan lesiones linfopiteliales. Sin embargo muestran un infiltrado linfocitario similar a los encontrados en la glándula parótida de pacientes con SS. La biopsia de GSm a venido a ser parte integral del estudio de los pacientes con SS (7), aunque por si misma es insuficiente para establecer el diagnóstico de SS, una evaluación del grado alteración histopatológica más los hallazgos clínicos y de laboratorio pueden ayudar a establecer el diagnóstico (18).

Los pacientes con LLE y SS tienen un riesgo aumentado para desarrollar neoplasias linfoides (19). Se ha demostrado que existe continuidad entre las lesiones inflamatorias claramente benignas y los linfomas no Hodgkin (LNH) en la glándula salival de pacientes con SSP (11). Ha sido determinado que algunas lesiones previamente identificadas como LLE son actualmente estadios tempranos de un linfoma tipo MALT (19). Aunque se había propuesto que las islas mioepiteliales eran benignas actualmente se reconoce que pueden estar presentes en los linfomas de bajo grado tipo MALT de las glándulas salivales por periodos prolongados antes de ser evidente la diseminación extraglandular (9,18). Los hallazgos que indican el desarrollo de un linfoma incluyen importante agregación de células linfoides de tamaño medio monomórficas con un abundante citoplasma pálido y núcleo homogéneo (células B monocitoides), involucro de la grasa paraglandular o el tejido conjuntivo y la evidencia de infiltrado partineural con demostración mediante inmunohistoquímica de fenotipo de linfocito B y restricción de la cadena ligera

Estos dos patrones polares pueden ser identificados utilizando solamente criterios histológicos. Sin embargo, la distinción entre una lesión linfocitética benigna y una lesión linfocitética con linfoma temprano puede ser difícil. En esta situación, el análisis inmunofenotípico del infiltrado puede ser de utilidad, ya que la expresión de inmunoglobulinas monotípicas en estas lesiones se considera una evidencia de linfoma B de bajo grado (11). Mediante técnicas moleculares es posible definir si los linfocitos B que componen del infiltrado linfocitario en la lesión linfocitética "benigna" tienen rearranglos en los genes de inmunoglobulinas y de esta manera definir su monoclonalidad (22). Al respecto, los rearranglos de las cadenas ligeras son desproporcionalmente de tipo kappa y no lambda, y los linfomas de pacientes con SSP siguen este mismo comportamiento. A pesar de estos hallazgos de monoclonalidad, la mayoría de los linfomas de la glándula salival permanecen localizados por períodos prolongados y son relativamente indolentes (11).

De esta manera, la correcta identificación del infiltrado linfocitario y el hallazgo de una lesión linfocitética en el tejido glandular tienen importantes implicaciones en relación al manejo y pronóstico del paciente ya que el análisis inmunofenotípico y molecular ha demostrado que la lesión linfocitética benigna o sialoadenitis

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Cual es el inmunofenotipo de los linfocitos del infiltrado en la glándula salival menor de pacientes con SS primario y lesión linfoepitelial ?

HIPÓTESIS

El inmunfenotipo de los linfocitos de localización periductal e intraepiteliales en la glándula salival menor de pacientes con SSP y LLE corresponde a células B

OBJETIVO

Determinar el inmunifenotipo de los linfocitos del infiltrado inflamatorio en la glándula salival menor de pacientes con SSP con y sin LLE.

MATERIALES Y METODOS

Se estudiaron biopsias embebidas en parafina de pacientes con diagnóstico de SSP definido de acuerdo a los criterios de San Diego (20), que acuden a la consulta externa del departamento de Reumatología del H.E. C.M.N. S XXI del IMSS.

Las láminillas fueron evaluadas inicialmente mediante microscopía de luz para definir la densidad del infiltrado linfocitario mediante la escala de Greenspan (anexo II) y determinar el patrón de lesión histopatológica (presencia o ausencia de LLE). De esta manera se seleccionaron 14 laminillas que tuvieran Greenspan 4., de las cuales 7 tuvieron LLE y en 7 estuvo ausente. De los tejidos embebidos en parafina se realizaron dos cortes para ser procesados para el método de Inmunohistoquímica peroxidasa (anexo III) utilizando los anticuerpos primarios anti-CD20 (clona L26, IgG2a, capa, Dako) y anti CD45RO (clona UCHL1, IgG2a, capa, Dako) a una concentración de 1:50 para identificar linfocitos B y T respectivamente. La inmunoreactividad citoplásmica para ambos anticuerpos fue valorada mediante microscopía de luz y se determinó el patrón de infiltración predominante (intersticial o periductal). Como control positivo para la técnica de Inmunohistoquímica se empleó amígdala palatina. Se estableció una graduación semicuantitativa para determinar la intensidad del infiltrado linfocitario de la siguiente manera. + = mínimo, ++ = escaso, +++ = moderado y ++++ = intenso. Los valores obtenidos fueron agrupados en baja densidad cuando tuvieron +/-++ y de alta densidad cuando tuvieron +++/++++. Las observaciones se hicieron de forma independiente por 3 investigadores.

ANALISIS ESTADISTICO

Se compararon las frecuencias relativas segun la intensidad del infiltrado inflamatorio, estableciendo dos grupos que comprenden la presencia o ausencia de LLE. Así como la localización del infiltrado linfocitario y la proporción semicuantitativa agrupada de la siguiente manera: +/- = Baja densidad y +++/++++ = Alta densidad. Se utilizó la prueba exacta de Fisher para determinar diferencias significativas entre los grupos con y sin LLE.

RESULTADOS

Se estudiaron un total de 14 biopsias de pacientes con SSP definido que tuvieron una edad promedio de 53 años (rango de 34 a 73 años). Todos los pacientes fueron del sexo femenino excepto dos, estos últimos están incluidos en el grupo con LLE. El tiempo de evolución fue de 7 años en promedio para el grupo de LLE y 12 años para el grupo sin LLE.

Las características de densidad, inmunofenotipo y localización para cada uno de los casos según la presencia o ausencia de LLE se muestran en las tablas 1 y 2 respectivamente.

Tabla 1. LESION LINFOEPITELIAL POSITIVA

BIOPSIA	CD45RO			CD20		
	LIE	II	HPD	LIE	II	HPD
1	+	++	++	+	++	++++
2	++++	+++	++++ ♦	+++	++	++++
3	++	++	++	+/-	++	++
4D	++++	++++	++++	++	++	++++
5	+	++++	+++	+++	+	+++
6C	++	+++	++	+	+	+
7*	+++	++++	++++	++	+	+++

Abreviaturas: LIE, Linfocitos intraepiteliales, II infiltrado intersticial, HPD infiltrado inflamatorio periductal, IIPA Infiltrado Inflamatorio periacinar

♦total

D Atrofia ----

C Atrofia acinar ++++ MESA establecida

*Isla mioepitelial CD20 agrupado en nodulos

TABLA 2. LESION LINFOEPITELIAL NEGATIVA

BIOPSIA	CD45RO			CD20		
	LIE	II	HPD	LIE	II	HPD
8x	--	++++	+	-	+	+
9	--	++	+	+	+	+
10*	+	+	+	-	-	-
11	+	+	+	-	+	+
12	+	-	+	-	+	++
13	+	+++	+	-	+	+
14	+	--	+	-	+	+

× Formación de centros germinales

*1 estasia ductal

La densidad de linfocitos T en el infiltrado intersticial fue mayor en el grupo con LLE+ (p=0.03). Por otra parte, la población de linfocitos T no mostró diferencias significativas en otras localizaciones. El análisis de linfocitos B mostró diferencias significativas con densidad mayor para el infiltrado de localización periductal en el grupo con LLE+ (p=0.01) En otras localizaciones, la densidad de la células B no mostró diferencias estadísticamente significativas (Tabla 3).

Tabla 3. Densidad del infiltrado inflamatorio según el inmunofenotipo, su localización y la presencia o ausencia de LLE.

	CD45RO				CD20			
	LLE +		LLE -		LLE +		LLE -	
	BD	AD	BD	AD	BD	AD	BD	AD
LIE	4	3	7	0	5	2	7	0
II	2	5*	5	2	7	0	7	0
HPD	3	4	7	0	2	5*	7	0

LLE - Lesion linfopitelial LIE = Linfocitos intraepiteliales. II = Infiltrado intersticial HPD = Infiltrado inflamatorio periductal BD = Baja densidad AD = Alta Densidad

DISCUSION

El presente estudio propone una descripción del inmunofenotipo del infiltrado linfocitario de acuerdo a la presencia o no de LLE. Al respecto, la literatura reconoce que en esta enfermedad, las glándulas salivales tienen un infiltrado predominantemente T y que este hecho tiene un papel fisiopatogénico importante (3). Nuestros hallazgos indican que la distribución de dicho infiltrado puede variar, con respecto a la presencia de LLE. Esto es especialmente significativo para dos localizaciones, la intersticial y la periductal, en los casos con LLE. Así pues la proporción relativa reportada para linfocitos B varía del 5 al 20% (21) en nuestro estudio se observa una proporción mayor a lo reportado con predominio periductal e intersticial y que aparentemente depende de la presencia de LLE.

Estas observaciones pueden tener particular interés al proponer un sustrato anatómico (MESA), relacionado a una alta densidad de linfocitos B y que potencialmente serían los elementos para el desarrollo de un linfoma de tipo MALT. No obstante que el presente estudio no analizó el estado de monoclonalidad (restricción de cadenas ligeras), no encontramos cambios en la morfología celular que indicaran la transformación a un fenotipo neoplásico (células tipo centrocito).

La presencia de linfocitos B en el intersticio de las glándulas salivales de pacientes con SSP, se ha relacionado a la producción de auto-anticuerpos in situ y a este hecho se le ha atribuido una participación en la patogénesis de la enfermedad. Sin embargo, la presencia de linfocitos B intraepiteliales no tiene una explicación clara hasta el momento. Sería relevante la demostración de un patrón de hipermutación somática en los linfocitos B (22) de localización intraepitelial con el fin de establecer molecularmente clonas en fases tempranas que pueden ser identificadas como neoplásicas. Al respecto, la presencia de linfocitos T intraepiteliales se ha relacionado al reconocimiento y respuesta inmune contra varios antígenos de origen viral y de componentes estructurales en la célula del epitelio ductal (4.5)

CONCLUSIONES

1. La densidad del infiltrado inflamatorio se correlaciona con la presencia de LLE.
2. El infiltrado inflamatorio periductal es significativamente mayor tanto para el inmunofenotipo B como T en presencia de LLE.
3. No existe diferencia en cuanto al inmunofenotipo de los linfocitos intraepiteliales en las biopsias con LLE.

ANEXOS

ANEXO I

CRITERIOS DE SAN DIEGO PARA CLASIFICACION DEL SINDROME DE SJOJREN

I. Síndrome de Sjögren primario

A. Síntomas y signos objetivos de sequedad ocular

1. Prueba de Schimer menor a 8 mm durante 5 minutos, y
2. Tinción positiva en la prueba de rosa de Bengala o fluoresceína en la cornea o la conjuntiva, compatible con queratoconjuntivitis sicca.

B. Síntomas y signos objetivos de boca seca

1. Disminución del flujo parotídeo usando copas de Lashley u otro método, y
2. Biopsia de glándula salival menor anormal (puntuación de un foco > 2 obtenido del promedio de 4 lóbulos evaluables)

C. Demostración de un trastorno autoinmunitario sistémico

1. Factor reumatoide elevado ($> 1:320$)
2. Anticuerpos antinucleares a título alto ($> 1:320$)
3. Presencia de anticuerpos anti-SS-A (Ro) o anti-SS-B (La)

II. Síndrome de Sjögren secundario

Signos y síntomas característicos del SS según se define en el punto I, más datos clínicos suficientes para el diagnóstico de Artritis Reumatoide, Lupus eritematoso generalizado, polimiositis, esclerodermia o cirrosis biliar.

1. Exclusiones: Sarcoidosis, linfoma preexistente, VIH, VHC, VHB, fibromialgia primaria, y otras causas conocidas como de neuropatía autonómica, queratitis sicca o crecimiento de glándulas salivales.

El síndrome de Sjögren definido requiere de los criterios IA, IB y IC. El SS probable no requiere de biopsia de glándula salival menor pero puede ser diagnosticado mediante demostración de disminución de la función salival (criterios IA, IB1 y IC)

ANEXO III

PROCEDIMIENTO DE INMUNOHISTOQUIMICA

1. Se utilizaron tejidos fijados en formol amortiguados al 10% durante 24-48 hr e incluidos en parafina
2. Se cortaron en micrótomo a 4 micrómetros
3. Se colocaron en laminillas tratadas con adhesivo (poli-L-lisina ó silano), dos cortes de tejido en estudio (uno como control negativo y otro como problema) Un corte de tejido de amígdala palatina se utilizó como control positivo.
4. Las laminillas con los cortes se incubaron a 60 °C durante 30 minutos
5. Se desparafinaron e hidrataron de la siguiente forma:
 - a. Xilol durante 2 minutos (2 veces).
 - b. Alcohol absoluto durante 2 minutos.
 - c. Alcohol de 96% durante 2 min (2 veces)
 - d. Agua común 3 cambios.
 - e. Agua destilada durante 2 minutos.
6. Se enfriaron a temperatura ambiente
7. Se lavaron con PBS durante 5 minutos.
8. Se bloqueo la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) AL 3% durante 15 minutos a temperatura ambiente.
9. Se decanto.
10. Se lavo con PBS durante 5 minutos
11. Se agrego suero fetal bovino y se incubo durante 10 minutos
12. Los cortes problema y el control positivo se incubaron en cámara húmeda por 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo anti-CD20 (clona L26, IgG2a, Kappa, Dako) y anti-CD45RO (Clona UCHL1, IgG2a, Kappa, Dako) a una dilución 1:50
13. Se decanto
14. Se lavo con PBS a chorro.

LIBRERIA Y TIENDA DE MATERIAL
DE LA UNIVERSIDAD

15. Se lavo con PBS durante 5 minutos
16. Se adiciono a todos a todos los cortes el segundo anticuerpo (biotilnado) y se incubo a 20 minutos.
17. Se lavo con PBS durante 5 min
18. Se le agrego el complejo enzimatico (estreptavidina) y se incubo a 20 min
19. Se lavo con PBS por 5 min.
20. Se agtego el crómogeno (DAB – diamunobencidina).
21. Se observo al microscopio hasta observar inmunoreacción con el control positivo.
22. Se agrego agua destilada.
23. Se contrasto con hematoxilina de Harris hasta haber obtenido el contraste adecuado.
24. Se lavo con agua corriente.
25. Se viro con agua amoniacal
26. Se deshidrato de la siguiente forma
 - a. Se pasaron por alcohol 96% durante 2 min (2 veces)
 - b. Se pasaron por alcohol absoluto durante 2 min (2 veces)
 - c. Se pasaron por xilol durante 2 minutos (2 veces)
27. Se agrego resina y se coloco un cubreobjetos adecuado.

BIBLIOGRAFIJA

1. Moutsopoulos HM, Tzioufas AG: Sjögren's syndrome. In Klippel JH, Dieppe PA (eds): Rheumatology. London: Mosby - Year Book Europe Ltd, 2000
2. Fox R.L., Stern M, Michelson P. Update in Sjogren's syndrome. *Curr Opin Rheumatol* 2000, 12: 391 - 398.
3. Manthorpe R et al. Primary syndrome: diagnostic criteria, clinical features and disease activity. *J Rheumatol* 1997, 24 (suppl 50): 8
4. Sumida T et al. TCR in Sjögren's syndrome. *Br J Rheumatol* 1997;36: 622.
5. Haneji N, et al: Identification of alpha - fodrin as a candidate autoantigen in primary Sjögren's syndrome. *Science* 1997; 276: 604
6. Grflithd GM, Muller C.: Expression of perforin and granzymes in vivo. Potential diagnostic markers for activated cytotoxic cells. *Immunol Today* 1991;12:415-9.
7. Godwin JF. Benign lymphoepithelial lesion of the parotid gland (adenolymphoma, chronic inflammation lymphoepithelioma, lymphocytic tumor, Mikulicz disease): report of eleven cases. *Cancer* 1952;5:1089,103.
8. Hijek E, Smith WJ, Isaacson PG. Primary B-cell lymphoma of salivary glands and its relationship to mioepithelial syloadenitis. *J. Clin Pathol* 1988;19: 766-76.
9. Kondratowicz JM, Small M, Morgan DW. Clinicalpathological study of mioepithelial sialadenitis and chronic sialadenitis (sialolithiasis) *J. Clin Pathol* 1988;40:3-9.
10. Ellis GL, Aucler PL. Atlas of tumor pathology. Tumors of the salivary glands, 3th ed series fascicle Armed Forces Institute of Pathology, Washington DC, 1996: 411-413.
11. Moutsopoulos HM, Chused TM, Mann DL, et al. Sjogren's syndrome (sicca syndrome) *Curr Op issues. Ann Intern Med.* 1980,92:221 - 6.
12. Dardick I, Van Nostreabd AW, Rippstein P, Skaimming L, Hopp D, Dairkee SH. Characterization of epimyoepithelial islands in benign lymphoepithelial lesion of major salivary gland: an immunohistochemical and ultrastructural study. *Head Neck Surg* 1988,10:168 - 78

13. Kjørelid U., Ostberg Y, Virtanen I, Thronell LF. Immunohistochemical analysis of autoimmune sialadenitis in man. *J Oral Pathol* 1988; 17: 374 – 80
14. Bridges AJ, England DM. Benign lymphoepithelial lesion: relationship to Sjögren's syndrome and involving malignant lymphoma. *Semin Arthritis Rheum* 1989;19:201 – 8
15. Freimark B, Fantozzi R, Bone R, Bordin G, Fox R. Detection of clonally expanded salivary gland lymphocytes in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1989;32:859 – 69
16. Baatsaiks JG. Lymphoepithelial lesion and Sjögren's syndrome. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1987;96:354 – 5.
17. Andrade RL, Hagen KA, Manivel JC. Distribution and Immunophenotype of the inflammatory cell population in the benign lymphoepithelial lesion (Mikulicz's disease). *Hum Pathol* 1988;19:932 – 47.
18. Daniels TE. Benign lymphoepithelial and Sjögren's syndrome. In Ellis GL, Aucleir PL, Gnepp DR, eds. *Surgical Pathology of the salivary glands*. Philadelphia: WB Saunders, 1991.83 – 106.
19. Falzon M, Isaacson PG. The natural history of the salivary gland in which there a monoclonal population of B cells. A report of two cases. *Am J Surg Pathol* 1991;15:59 – 65.
20. Fox RI. Systemic diseases associated with dry eye. *International Ophthalmology Clinics* 1994;24: 71 – 87.
21. Adamson TC, Fox RI, Frishman DM, ed al: Immunohistologic analysis of lymphoid infiltrates in primary Sjögren's syndrome using monoclonal antibodies. *J Immunol* 1983; 130: 203
22. Bhaler D, Miklos J, Swerdlow S. Ongoing Ig Gene Hypermutation in Salivary Gland Mucosa – Associated Lymphoid Tissue – Type Lymphomas. *Blood*,1997, 89.3335 – 44.