



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

INSTITUTO DE OFTALMOLOGÍA FUNDACIÓN CONDE DE VALENCIANA

MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS

CARACTERIZACIÓN INMUNOFENOTÍPICA DE LINFOCITOS T Y B EN PACIENTES CON SÍNDROME DE SJÖGREN PRIMARIO: CORRELACIÓN CLÍNICO-INMUNOLÓGICA.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA:

ERIKA MARÍA VERA PÉREZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS

DRA. MARÍA C. JIMÉNEZ MARTÍNEZ

INSTITUTO DE OFTALMOLOGÍA FUNDACIÓN CONDE DE VALENCIANA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN

COTUTOR DE TESIS:

LUIS ALBERTO SALAZAR LÓPEZ

INSTITUTO DE OFTALMOLOGÍA FUNDACIÓN CONDE DE VALENCIANA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN

COMITÉ TUTOR:

DR. LUIS H. SILVEIRA TORRE

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA IGNACIO CHÁVEZ SERVICIO DE REUMATOLOGÍA

DR. YONATHAN GARFIAS BECERRA

INSTITUTO DE OFTALMOLOGÍA FUNDACIÓN CONDE DE VALENCIANA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. ENERO, 2017



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.

JURADO EXAMEN DE GRADO

DR. JULIO GRANADOS ARRIOLA

PRESIDENTE DEL JURADO

DIVISIÓN INMUNOGENÉTICA. DEPARTAMENTO DE TRANSPLANTES.

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

DRA. MARÍA ISABEL SADA OVALLE

SECRETARIO DEL JURADO

LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA INTEGRATIVA. UNIDAD DE INVESTIGACIÓN.

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS

DRA. MARÍA DEL CARMEN JIMÉNEZ MARTÍNEZ

VOCAL I

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN.

INSTITUTO DE OFTALMOLOGÍA CONDE DE VALENCIANA

MTRO. HENRY VELÁZQUEZ SOTO

VOCAL II

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN.

INSTITUTO DE OFTALMOLOGÍA CONDE DE VALENCIANA

DR. LUIS HUMBERTO SILVEIRA TORRE

VOCAL III

SERVICIO DE REUMATOLOGÍA.

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA IGNACIO CHÁVEZ

Investigadores colaboradores:

Dra. Concepción Santacruz Valdés
Médico Adscrito al Departamento de Córnea y Cirugía Refractiva
Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana Servicio de Córnea

Dra. Cristina Hernández Díaz
Jefa de Servicio de Laboratorio de Ultrasonido Musculoesquelético y Articular
Instituto Nacional de Rehabilitación

Dr. Lucío Ventura Ríos
Servicio de Laboratorio de Ultrasonido Musculoesquelético y Articular
Instituto Nacional de Rehabilitación

Dra. Karla Montiel
Alumna del Programa de Servicio Social,
Universidad Tominaga Nakamoto

AGRADECIMIENTOS

ESTE TESIS FUE REALIZADA COMO REQUERIMIENTO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS, DENTRO DEL PROGRAMA DE POSGRADO DE CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD. EL TRABAJO EXPERIMENTAL SE REALIZÓ EN EL INSTITUTO DE OFTALMOLOGÍA “FUNDACIÓN CONDE DE VALENCIANA” BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. MARÍA C. JIMÉNEZ MARTÍNEZ Y DEL DR. LUIS ALBERTO SALAZAR LÓPEZ.

EL FINANCIAMIENTO DE ESTE TRABAJO FUE A TRAVÉS DEL PROGRAMA DE APOYOS PARA LOS ESTUDIOS DE POSGRADO (PAEP)-UNAM, EL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA UNAM Y POR LA FUNDACIÓN DE ASISTENCIA PRIVADA “CONDE DE VALENCIANA” IAP.

POR SER UN PROGRAMA PERTENECIENTE AL PROGRAMA NACIONAL DE POSGRADOS DE CALIDAD, CONACYT APOYÓ LOS ESTUDIOS DE MAESTRIA (NÚMERO DE BECARIO 577631).

Agradecimientos Personales

Quisiera agradecer a mi esposo Beto por su apoyo, cuidado y comprensión porque a pesar de los tiempos difíciles hemos logrado salir adelante juntos y siempre será mi principal impulso y pilar para seguir adelante y seguir alcanzando nuestras metas juntos.

También quiero agradecer a mis padres Mario y Lupita por su apoyo incondicional durante mi vida y mi formación profesional. Porque son un ejemplo de responsabilidad, honestidad y perseverancia.

Así mismo, quisiera agradecer por su apoyo y constante motivación a mis hermanas Mariana y Rocío quienes siempre han estado a mi lado, así como a mis abuelitos Pily y Mario que desde donde están siempre estuvieron presentes.

Gracias a mi tutora la Dra. Maricarmen por todas sus enseñanzas, por sus consejos y tips para realizar esta tesis y la maestría, así como por su apoyo en mi desarrollo profesional.

Gracias por su contribución al proyecto y apoyo constante al Dr. Luis Alberto Salazar como co- tutor.

Gracias al Dr. Silveira y al Dr. Garfias por sus evaluaciones y consejos durante los Coloquios al final de cada semestre de la maestría.

Gracias a la Dra. Santacruz, a la Dra. Hernández, al Dr Ventura y a la Dra. Montiel como investigadores colaboradores para la realización de este protocolo. Gracias a la Dra. Diana Ferrusquia por su apoyo en referencias de pacientes.

Gracias al Laboratorio Clínico de la Unidad de Investigación del Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana quienes participaron con la parte de toma de muestra y procesamiento de las pruebas de laboratorio.

ÍNDICE

| | |
|--------------------------------|-----------|
| 1. Resumen. | P. p. 7 |
| 2. Marco Teórico. | P. p. 9 |
| 3. Planteamiento del Problema. | P. p. 16 |
| 4. Pregunta de Investigación. | P. p. 16 |
| 5. Justificación. | P. p. 16 |
| 6. Objetivos. | P. p. 17 |
| 7. Materiales y Métodos. | P. p. 18 |
| 8. Resultados. | P. p. 38 |
| 9. Discusión. | P. p. 59 |
| 10. Conclusiones | P. p. 67 |
| 11. Anexos. | P. p. 69 |
| 12. Bibliografía | P. p. 101 |

Caracterización inmunofenotípica de linfocitos T y B en pacientes con Síndrome de Sjögren primario: correlación clínico-inmunológica.

Resumen

Introducción: El síndrome de Sjögren (SS) es una enfermedad sistémica autoinmune con principal afección a las glándulas exocrinas. Los mecanismos de su etiopatogenia aún no han sido claramente esclarecidos, pero sabe que las glándulas salivales, lacrimales y otras glándulas exocrinas son infiltradas por linfocitos T (LT) CD4+ y linfocitos B (LB) predominantemente. Interesantemente, se ha reportado que la infiltración celular glandular va cambiando en las diferentes etapas de la enfermedad, en lesiones leves existe un predominio de LT CD4+, en lesiones severas existe un predominio de LB, aunque se desconocen los patrones sistémicos de estas poblaciones celulares, conocer el inmunofenotipo tanto de las subpoblaciones de LT CD4+ y de LB podría ayudar a conocer más acerca etiopatogenia de la enfermedad.

Objetivo: Caracterizar el inmunofenotipo de los LT CD4+ y LB de circulación periférica y correlacionar los cambios inmunológicos con las manifestaciones clínicas oftalmológicas y sistémicas en SS primario.

Material y Método: se realizó un estudio descriptivo, transversal, observacional en sujetos con diagnóstico de SS primario. Se les realizaron inmunofenotipo de LT CD4+ y de LB circulantes para identificar la expresión de moléculas asociadas a migración en LT CD4+ de sangre periférica (CCR3, CCR9, CCR10); la frecuencia en circulación periférica de los linfocitos T activados y Tregs (CD57, CD25, FOXP3); y las subpoblaciones de LB en sangre periférica (CD19, CD38low, CD38med, CD38hi). Se determinó la presencia de auto- anticuerpos Anti- Ro, Anti- La, Factor Reumatoide, niveles de inmunoglobulinas séricas IgG, IgM e IgA. Así mismo, se hicieron valoraciones de las características clínicas del SS primario con tinción de fluoresceína para escala de Van Bijsterveld, Schirmer I, biopsia de glándula salival menor (Escala de Chisholm mason), ultrasonido de glándulas salivales mayores (Escala de Hocevar) y se evaluó la actividad de la enfermedad sistémica usando el índice de actividad de la enfermedad de Síndrome de Sjögren EULAR (ESSDAI). Los datos se analizaron con estadística descriptiva. Para evaluar diferencias significativas se utilizó, dependiendo de las variables a comparar una prueba de U-Mann Whitney o T de Student. Dependiendo del tipo de variable se utilizó la prueba de correlación de Spearman o la prueba de correlación de Pearson. Se consideró diferencia estadísticamente significativa cuando la $p \leq 0.05$.

Resultados: se incluyeron 7 participantes que cumplieron criterios de selección, 1 participante fue eliminada por tener anticuerpos de hipotiroidismo autoinmune. La edad media fue de 54.83 años, la mediana de retraso en el diagnóstico fue de 4 años, la edad media al diagnóstico fue de 53 años, la mediana entre inicio de síntomas e inicio de los fármacos modificadores de la enfermedad (FARME) fue de 0.125 años, la mediana de tiempo evolución SS fue de 4 años. En la valoración el 50% de las pacientes tenía tratamiento FARME y 83.33% tenía manejo lubricante tópico oftalmológico. La media del ESSDAI fue de 7.5 puntos. La media del OSDI fue de 16.25 puntos (afección leve/ moderada), la media de Van Bijsterveld en ojo derecho fue de 3.6 puntos y en ojo izquierdo de 5 puntos. La media de tiempo de ruptura de la película lacrimal fue de 2.4 segundos en ojo derecho e izquierdo, la media del Schirmer I fue de 5.8mm en ojo derecho y de 4.4mm en ojo izquierdo. 5 participantes tuvieron Anti-Ro, Anti-La y Factor Reumatoide positivos e hipergammaglobulinemia, 4 tuvieron hipocomplementemia, 5 tuvieron crioglobulinemia, 2 tuvieron patrón obstructivo por Espirometría. En comparación con controles sanos se encontró diferencia significativa en incremento 1.6 veces mayor en LT activados (CD4+CD25+), 2 veces mayor en LT reguladores (CD4+CD25+FoxP3) y un incremento 2.2 veces de LB transicionales (CD19+CD38med). Sólo se encontraron correlaciones negativas y significativas entre las subpoblaciones LT reguladores ($r=-0.9856$, $p=0.0028$), LB transicionales ($r=-0.8721$, $p=0.0500$) y la clasificación Hocevar; y positiva y significativa entre la subpoblación LB precursores y la clasificación Hocevar ($r=0.9747$, $p=0.0167$).

Conclusión: Los LT activados y reguladores y LB transicionales a nivel periférico se encontraron elevados en las participantes evaluadas con SSp en comparación con controles sanos ya que el tiempo de evolución (determinado por inicio de síntomas sicca) tuvo una mediana de 4 años por lo que se podría considerar una muestra aún en etapas tempranas. Las únicas correlaciones significativas se encontraron con la escala de Hocevar lo que confirma su utilidad como método diagnóstico de imagen alternativo para evaluar la eficacia de la afección glandular salival. Tuvo una correlación negativa con los LT reguladores y los LB transicionales ya que a mayor afección glandular se consideran éstos están reducidos a nivel periférico por su infiltración a nivel glandular y tuvo una correlación positiva con LB precursores ya que en etapas tardías principalmente los LB de memoria infiltran la glándula por lo que los precursores se elevan a nivel periférico.

Summary

Theoretical Framework: Sjogren's syndrome (SS) is an autoimmune systemic disease with main affection of the exocrine glands. Its pathogenesis mechanisms have not yet been clearly elucidated, but environmental, hormonal, genetic and immunological have been involved. Salivary, lacrimal and other exocrine glands are infiltrated by CD4 + T lymphocytes (LT) but also B lymphocytes (LB) and plasma cells, leading to the formation of germinal centers that also contain follicular dendritic cells (DC). Interestingly, the glandular cell infiltration changes at different stages of the disease, primary SS with minor injuries have a predominance of CD4 + LT but in severe injuries there is a predominance of LB. Once established the lymphoid infiltrate in the salivary glands, local CD and LTh produce cytokines and other survival factors. The SS is initiated by a Th1 and Th17 response and then progresses to a Th2 and Th follicular response for germinal centers to be formed. The immunophenotypic characterization of both subpopulations of T CD4 + and LB cells might help to know more about etiopathogenesis of the disease.

Objective: Characterize the immunophenotype of LB + and LT CD4+ peripheral circulation and correlate immunological changes with the ophthalmological, oral and/or systemic clinical manifestations in primary SS.

Material and Methods: A descriptive, cross-sectional, observational study was conducted in subjects diagnosed with primary SS. Immunophenotyping of circulating LT CD4 + and LB to identify the expression of molecules associated with migration in peripheral blood CD4 + LT (CCR3, CCR9, CCR10); the peripheral circulation frequency of activated LT and Tregs (CD57, CD25, FOXP3); and peripheral blood LB subpopulations (CD19, CD38low, CD38med, CD38hi). Presence and anti- antibody titers of Anti- Ro, Anti- La, rheumatoid factor, serum levels of immunoglobulins IgG, IgM and IgA were performed. Also, assessments of the clinical features of primary SS were done with tests for ocular surface staining, Schirmer I test, minor salivary gland biopsy, ultrasound of major salivary glands, among others; the activity of systemic disease was evaluated using the index of disease activity EULAR Sjögren's syndrome. The data were studied with descriptive statistics. To evaluate significant differences, a U-Mann Whitney or Student's T test was used depending on the variables. Depending on the type of variable correlation test Spearman or Pearson correlation test was used. Statistically significant difference when $p \leq 0.05$ was considered.

Results: We included 7 participants who met selection criteria, 1 participant was eliminated because of presence of antibodies of autoimmune hypothyroidism. The mean age was 54.83 years, the median delay in diagnosis was 4 years, mean age at diagnosis was 53 years, median between onset of symptoms and onset of disease modifying drugs (DMARD) was 0.125 years, median of evolution of SS was 4 years. In the assessment 50% of the patients had DMARD treatment and 83.33% had topical lubricant management. The average of the ESSDAI was 7.5 points. The mean OSDI was 16.25 points (mild / moderate affection), the mean of Van Bijsterveld in the right eye was 3.6 points and in the left eye 5 points. The mean rupture time of the tear film was 2.4 seconds in the right and left eye, the mean of the Schirmer I was 5.8mm in the right eye and 4.4mm in the left eye. 5 participants had Anti-Ro, Anti-La and Rheumatoid Factor positive and hypergammaglobulinemia, 4 had hypocomplementemia, 5 had cryoglobulinemia, 2 had obstructive pattern by Spirometry. Compared with healthy controls, a significant difference was found in a 1.6-fold increase in activated LT (CD4 + CD25 +), 2-fold higher in LT regulators (CD4 + CD25 + FoxP3) and a 2.2 fold increase in transitional LB (CD19 + CD38med). Only negative and significant correlations were found between the LT regulators ($r = -0.9856$, $p = 0.0028$), LB transitional ($r = -0.8721$, $p = 0.0500$) subpopulations and Hocevar classification; and positive and significant between the LB precursors subpopulation and the Hocevar classification ($r = 0.9747$, $p = 0.0167$).

Conclusions: Peripheral activated and regulatory LTs and transitional LBs were found to be elevated in participants assessed with SSp compared to healthy controls as the time course (determined by onset of sicca symptoms) had a median of 4 years so it could be considered a sample in the early stages. The only significant correlations were found with the Hocevar scale confirming its usefulness as an alternative diagnostic imaging method to evaluate the efficacy of the salivary glandular condition. It had a negative correlation with the regulatory LT and the transitional LB since to the greater glandular affection they are considered to be reduced at peripheral level because of their glandular infiltration and had a positive correlation with precursors LB since in late stages mainly memory LB infiltrate the gland so that the precursors rise in peripheral level.

Marco Teórico

Epidemiología

El Síndrome de Sjögren (SS) primario es una enfermedad sistémica autoinmune con principal afección a las glándulas exocrinas, aunque también pueden haber manifestaciones extra glandulares hasta en 40% de los pacientes.^{1, 2} La prevalencia del SS en población anglosajona es del 0.1-0.6%,^{3, 4} con mayor predominio en el género femenino, que en el masculino, con una relación de 9:1,^{4, 5} afectando a mujeres postmenopáusicas en la 4ª a 6ª década de la vida.⁵ Recientemente, Qin y colaboradores⁶ realizaron una revisión sistemática de la epidemiología de SS, en la que incluyor estudios realizados en europa, asia y estados unidos, en esta revisión se encontró una incidencia de SS de 6.92 (IC 95% 4.98- 8.86) por cada 100 000 años/persona, teniendo por género la siguiente distribuición: en mujeres, de 12.3 (IC 95% 9.07- 15-53) y en hombres, de 1.47 (IC95% 0.81- 2.12). Este mismo estudio reportó una prevalencia de 60.82 (IC 95% 43.69- 77.94) casos por 100 000 habitantes.

Características Clínicas

Los principales síntomas del SS son xerostomía y xeroftalmia o queratoconjuntivitis sicca. Aunque también puede afectar a otras glándulas como las nasales, faríngeas, bronquiales, vaginales, vulvares, dérmicas y gástricas. La xerostomía puede causar ausencia y daño dental, disminución del flujo salival, queilitis anular, atrofia de papilas filiformes, disfagia, disgeusia y sensación urente oral. Hasta 60% pueden tener crecimiento de glándulas salivales mayores episódico o crónico. La afección oral se mantiene estable generalmente después de los primeros 5 años de evolución. El diagnóstico de la afección oral puede hacerse con sialometría, sialografía, cintillografía, imagen por resonancia magnética (IRM), o ultrasonido (US) de las glándulas salivales mayores. La xeroftalmia puede causar sensación de cuerpo extraño ocular, irritación, eritema conjuntival y fotosensibilidad por daño del epitelio corneal y conjuntiva bulbar, pueden llegar a haber úlceras o perforaciones corneales. La afección ocular se mantiene estable después de los primeros 10 a 12 años de evolución. El diagnóstico de la afección ocular puede hacerse por la

prueba de Schirmer, rosa de bengala y el tiempo de ruptura de la película lagrimal entre otras. ^{3, 7, 8}

Etiopatogenia

Los mecanismos de daño en el SS asociados a su etiopatogenia aún no han sido claramente esclarecidos, pero se han sugerido factores infecciosos como el virus Epstein Barr, el virus linfotrópico humano tipo 1 (HTLV-1), el virus de hepatitis C y el enterovirus como factores iniciadores de la lesión histopatológica, al estimular a células dendríticas plasmocitoides a través de receptores toll like (TLR).⁹ En cuanto a los factores hormonales, se ha encontrado que las células epiteliales glandulares durante la menopausia se encuentran apoptóticas y exponen autoantígenos que predisponen a individuos genéticamente predispuestos a una activación autoinmune. ¹⁰

La afección glandular está caracterizada por infiltrados de células mononucleares focales alrededor de los ductos que sustituyen unidades de secreción, ¹¹ las glándulas exocrinas con mayor afección son las lagrimales y las salivales; ⁹ estos infiltrados están predominantemente compuestos por linfocitos T cooperadores (Th) CD4+ ¹² resultando en la pérdida de la capacidad secretora y subsecuentemente en los síntomas del síndrome sicca. En cuanto a las manifestaciones sistémicas, algunas están relacionadas con infiltración linfocítica periepitelial a nivel pulmonar, hepático, renal; y otras con formación de inmunocomplejos como en la vasculitis cutánea, la neuropatía periférica y la glomerulonefritis. ⁹

Las glándulas salivales, lacrimales y otras glándulas exocrinas son infiltradas primordialmente por linfocitos Th CD4+, pero también por linfocitos B (LB), lo que conduce a la formación de centros germinales.¹² Interesantemente, la infiltración celular glandular va cambiando en las diferentes etapas de la enfermedad, de tal forma que en pacientes con SS primario con lesiones leves existe un predominio de linfocitos Th CD4+, mientras que en lesiones severas existe un predominio de linfocitos B.^{9, 12}

Subpoblaciones de Linfocitos T cooperadores CD4+ y Síndrome de Sjögren.

Los linfocitos T cooperadores (Th) CD4+, tienen un papel primordial en la activación y diferenciación de estructuras linfoides terciarias en las glándulas salivales de pacientes con SS primario. De tal forma que se ha sugerido que la infiltración celular puede predecir un curso clínico más pronunciado.

^{13, 14} En este sentido, el microambiente en glándulas salivales labiales de pacientes con SS primario, ha revelado una mayor expresión de RNA mensajero para citocinas, quimiocinas y receptores de quimiocinas Th1/Th17 al inicio de la enfermedad; de tal forma que en algunos pacientes con SS se han encontrado concentraciones elevadas de IFN- γ sérico, en glándulas salivales de SS los linfocitos T contienen expresión incrementada de RNAm para IFN- γ y STAT1, mientras que los niveles séricos de la respuesta Th2 están disminuidos; sin embargo, a medida que progresa la enfermedad existe un cambio hacia una respuesta Th2¹⁵ con infiltración de linfocitos T foliculares que favorecerán el desarrollo de centros germinales.¹⁴

En el proceso de infiltración celular selectiva a las glándulas salivales, las interacciones de quimiocinas y receptores de quimiocinas juegan un papel importante, de tal forma que se ha reportado una expresión incrementada de RNAm en glándulas salivales de pacientes con SS para las quimiocinas IP-10, RANTES y MIP-1 α , así mismo los linfocitos infiltrantes

expresan CXCR3 y CCR5 al inicio de la enfermedad; en cambio, la expresión de RNAm en glándula salival para TARC y MDC, así como la expresión de CCR4 y CCR8 en linfocitos infiltrantes está asociada con el progreso de la enfermedad.¹⁶ Se desconocen los patrones de expresión de algunos de estos receptores de quimiocinas en sangre periférica de pacientes con SS.

En el caso de los linfocitos T reguladores (Tregs) se ha reportado que se encuentran en menor cantidad en infiltrados linfoides de glándulas salivales en enfermedad avanzada, que en los estadios más tempranos; lo que apoya la teoría que la expresión del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) por DC produce una diferenciación de los LT vírgenes con proteína box forkhead (Foxp3), sin embargo en presencia de IL-6 en el microambiente por el estado proinflamatorio, induce la diferenciación hacia Th17. Otros autores han reportado que no existen diferencias significativas entre pacientes con SSp y controles sanos en sangre periférica.¹⁶ De aquí la importancia de conocer la actividad clínica para poder encontrar una asociación con las poblaciones celulares reguladoras de linfocitos T.

Dentro de las diferentes poblaciones de linfocitos Th, los linfocitos T foliculares (TFh) pueden estar asociados a severidad o a manifestaciones sistémicas en enfermedades autoinmunitarias. Existen diversos marcadores para identificar a los linfocitos TFh CXCR5, BCL-6, ICOS, CD57, PD-1, BTLA,¹⁷ aunque no existe un consenso, los más utilizados para identificar a esta población celular es la expresión de CXCR5 en este sentido, se ha reportado que los TFh BCL-6+ tuvieron una correlación significativa con linfocitos T CD4+ activados, anticuerpos Anti- SSA/ Anti-SSB y concentraciones séricas elevadas de IL-12 e IL-21 en pacientes con SS.¹⁴ De la misma forma, Simpson *et al.*¹⁸ demostraron que los linfocitos T periféricos con fenotipo de TFh ICOS+ podrían ser utilizados como biomarcador de severidad en pacientes con LES, ya que esta subpoblación de linfocitos T se asoció a manifestaciones

clínicas sistémicas como glomerulonefritis, enfermedad tromboembólica, trombocitopenia títulos altos de anticuerpos. En ese mismo estudio, se incluyó un grupo de SS secundario asociado a LES en donde se encontraron títulos altos de anticuerpos anti-SSA y anti-SSB que se asociaron con niveles elevados de LTFh. Li et al.¹⁹ identificaron una frecuencia incrementada de linfocitos TFh en SSp y lo asociaron con la presencia de autoanticuerpos Anti-Ro y Anti-La positivos, sugiriendo que los TFh podrían ser un biomarcador de actividad inmunológica en SSp.¹⁸ Así mismo, Gong *et. al.*²⁰ demostraron *in vitro* que las células epiteliales de glándulas salivales de pacientes con SSp co-cultivadas con linfocitos T vírgenes, inducen la diferenciación de linfocitos TFh a través de la producción de IL-6, así mismo estimulan la producción de IL-21 por los linfocitos TFh a través de la interacción con ICOSL en las células epiteliales de las glándulas salivales.

Linfocitos B y Síndrome de Sjögren

Una vez establecido el infiltrado en las glándulas salivales por linfocitos Th CD4+, se producen citocinas que favorecen la cooperación celular con los linfocitos B. Los linfocitos B activados por este microambiente producen autoanticuerpos como Anti- Ro, Anti-La y Factor Reumatoide, que favorecen la generación de inmunocomplejos circulantes e hipergammaglobulinemia; esta activación también favorece la expansión poli y oligoclonal de los linfocitos B, lo que se ha asociado a un incremento del riesgo de linfoma no Hodgkin en pacientes con SSp.¹¹

Se ha reportado que los linfocitos B circulantes de memoria de pacientes con SS primario se encuentran disminuidos, mientras que en glándulas salivales se encuentran aumentados.¹²

Furuzawa-Carballeda *et al.*²¹ reportaron que la frecuencia de linfocitos B inmaduros/ transicionales IgA+ productores de IL-10 eran mayores que en el

grupo control; así mismo, la subpoblación de LB CD19⁺CD38^{Hi}CD24^{Hi}IL-10⁺ era mayor en los pacientes con SSp sin actividad clínica, comparados con los que tienen actividad clínica; de la misma manera, esta subpoblación de linfocitos Breg se encontraba incrementada en pacientes con SSp con serología negativa (niveles de inmunoglobulinas IgG, IgA, IgM y complemento C3 y C4), comparados con los que la tenían positiva.

Todo lo anterior sugiere que los cambios en los patrones de expresión de quimiocinas y la determinación de células reguladoras T y B, evaluados desde sangre periférica, podrían ser útiles en la clasificación del estado clínico del paciente. En la Tabla 1, se resumen los conocimientos inmunológicos en relación a los linfocitos Th y B y su participación en el daño por síndrome de Sjögren.

Tabla 1. Linfocitos Th y B en pacientes con Síndrome de Sjögren primario. ¹⁻²¹

| Célula | Sérico | Glandular |
|---------------|---|--|
| Th1 | IFN- γ incrementado | Células infiltrantes CD4 + Th1 en etapas tempranas del infiltrado. |
| Th2 | Se desconoce. | Células infiltrantes CD4 + Th2 en etapas más tardías infiltrado. Asociación a mayor infiltrado celular por linfocitos B de memoria |
| TFh | Incrementados a nivel periférico relacionaos con incremento autoanticuerpos. No se ha correlacionado con manifestaciones clínicas. | Células infiltrantes CD4 + CXCR5 periferia infiltrado. Asociación a mayor infiltrado celular por LB. Células epiteliales glandulares estimulan diferenciación LT vírgenes en LTFh a través IL-6. |
| LTreg | Reportes contradictorios. No se ha correlacionado con manifestaciones. | CD4+CD25+ Foxp3+ disminuídos en infiltrados avanzados (correlación inversa con severidad clínica). |
| LB | Disminución de linfocitos B de memoria en sangre periférica. No se ha correlacionado con manifestaciones y evolución de la enfermedad. | Infiltración de linfocitos B de memoria en centros germinales Células B CD19+ infiltrantes en etapas avanzadas. Sobreexpresión CXCL13 y CXCL12 en glándulas |
| LBreg | Incremento de las poblaciones Breg en pacientes con SSp leve. | Se desconoce su distribución en glándulas y si tienen relación con el estado clínico. |

Planteamiento del Problema

Existen diversas poblaciones celulares de Linfocitos T CD4+ y linfocitos B que se activan durante el proceso autoinmune en pacientes con SS primario y que se encuentran infiltrando las glándulas; sin embargo se desconocen los cambios en el inmunofenotipo circulante. –Así mismo, se desconoce si el inmunofenotipo circulante se correlaciona con las manifestaciones clínicas oftalmológicas, de glándulas salivales y sistémicas durante los diferentes estadios clínicos de la enfermedad.

Pregunta de investigación

¿Cuál es el inmunofenotipo de los linfocitos circulantes (T CD4+ y B) en el Síndrome de Sjögren primario?

Justificación

La caracterización inmunofenotípica de las subpoblaciones de linfocitos Th CD4+ y de linfocitos B circulantes y su correlación con las diferentes manifestaciones clínicas de la enfermedad en pacientes con SS contribuirá a conocer más sobre la inmunofisiopatología de la enfermedad, así mismo la determinación del inmunofenotipo circulante podría utilizarse como herramienta pronóstica en pacientes con SSp.

Objetivos

General

Caracterizar el inmunofenotipo de los linfocitos Th CD4+ y los linfocitos B obtenidos de circulación periférica de pacientes con Síndrome de Sjögren primario y correlacionar los cambios inmunológicos con las manifestaciones clínicas oftalmológicas y sistémicas.

Específicos

- 1) Identificar la expresión de moléculas asociadas a migración en linfocitos T CD4+ de sangre periférica (CCR3, CCR9, CCR10) en SS primario.
- 2) Identificar la frecuencia en circulación periférica de los linfocitos T activados y Tregs en SS primario (CD57, CD25, FOXP3).
- 3) Identificar las subpoblaciones de linfocitos B en sangre periférica en SS primario (CD19, CD38low, CD38med, CD38hi).
- 4) Describir las manifestaciones clínicas oftalmológicas, los hallazgos por US de glándulas salivales mayores y las características sistémicas en pacientes con SS primario.
- 5) Correlacionar los hallazgos inmunológicos con las manifestaciones clínicas oftalmológicas y sistémicas en pacientes con SS primario.

Materiales y Métodos

Diseño del estudio.

Se realizó un estudio observacional, descriptivo, transversal, comparativo.

Universo de trabajo.

Sujetos con diagnóstico de Síndrome de Sjögren primario de la población en control en el Servicio de Córnea y Cirugía Refractiva del Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana. Por la baja prevalencia de la enfermedad también se incluyeron sujetos con diagnóstico de Síndrome de Sjögren primario referidos de otras instituciones.

Se compararon los resultados con un grupo de referencia de participantes sin patologías autoinmunes o alérgicas o cualquier otra que a criterio del investigador alterara el sistema inmunológico para determinar los valores de referencia en la citometría de flujo.

Criterios de selección

Criterios de inclusión casos (Sjögren primario):

- a) Aceptar participar en el protocolo de estudio y firma del consentimiento informado.
- b) Sujetos de cualquier género, mayores de 18 años de edad.
- c) Diagnóstico de Síndrome de Sjögren de acuerdo a los criterios de clasificación del Grupo de Consenso Americano- Europeo (2002) ²², los cuales son:
 - Síntomas oculares positivos consistentes en resequedad ocular diaria persistente por más de 3 meses, sensación recurrente

de arenilla o grava en los ojos y/o uso de sustitutivos de lágrimas más de 3 veces al día.

- Síntomas orales consistentes en sensación diaria de resequedad oral por más de 3 meses, inflamación de glándulas salivales recurrente o persistente del adulto y/o si requiere beber líquidos frecuentemente para ayudar a tragar alimentos secos.
- Signos oculares con evidencia objetiva y positiva en al menos uno de éstos: prueba Schirmer sin anestesia positiva (≤ 5 mm en 5 minutos), calificación de rosa de bengala u otra validada de ojo seco (≥ 4 sistema Bijsterveld).
- Histopatología con sialodinitis linfocítica focal con calificación mayor a un foco linfocitario positivo (1 foco se considera más de 50 linfocitos en un área de 4mm^2).
- Signo de afección de glándula salival con evidencia objetiva de al menos uno de los siguientes: flujo salival no estimulado (≤ 1.5 ml en 15 minutos), sialografía parotídea con sialectasias difusas (patrón punteado, cavitario o destructivo) sin obstrucción de ductos mayores, cintillografía salival con retraso de captura, concentración disminuida y/o excreción retardada del trazador. *En el protocolo sólo se realizará la prueba de flujo salival no estimulado.
- Anticuerpos Anti- Ro (anti- SSA) y/o anti- La (anti- SSB) positivos.

Se consideró cumple con criterios de clasificación para Síndrome de Sjögren primario si tuvieron 4 de éstos 6 criterios positivos pero debió incluir el criterio de histopatología o serología (anticuerpos positivos) o si tuvo positivo 3 de los 4 criterios objetivos (signos oculares, histopatología, afección glandular objetiva o positividad de anticuerpos) y cumplieron con los siguientes criterios de exclusión: no tener antecedente de radioterapia de cuello o cabeza,

infección activa por virus hepatitis C (VHC), enfermedad de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), antecedente de linfoma, sarcoidosis, enfermedad injerto contra huésped o uso de medicamentos anticolinérgicos.

- d) Determinación de anticuerpos Antinucleares (ANA), Anticuerpos Anti-Ro (Anti-SSA), Anti-La (Anti-SSB), Factor Reumatoide, inmunoglobulinas IgG, IgM, IgA e IgE, crioglobulinas, complemento C3 y C4.
- e) Determinación de laboratorios generales para identificar manifestaciones extraglandulares como Biometría Hemática, Química Sanguínea de 6 elementos, examen general de orina, Proteína C Reactiva (PCR), Velocidad de Sedimentación Globular (VSG). En caso de alteración en paraclínicos, cuadro clínico o exploración física que amerite otros estudios paraclínicos a los especificados en el protocolo para confirmar y valorar manifestación (es) extraglandular (es) del SS primario serán solicitados de forma externa pero el costo de estos estudios tendrá que ser cubierto por el paciente.
- f) Biopsia de glándula salival menor y análisis histopatológico para clasificación del grado de acuerdo a los criterios de Chisholm-Mason.²³

*Los paraclínicos indicados como criterios de selección fueron realizados como parte del protocolo, si se detectó que algún paciente no cumplió criterios de inclusión por estos resultados el paciente no fue incluido.

Criterios de exclusión:

- a) Sujetos con antecedentes personales de otra patología articular, inflamatoria u otra patología autoinmune.
- b) Sujetos con alguna comorbilidad ocular asociada con síndrome de ojo seco.

- c) Antecedente de síndrome sicca por otras causas como radioterapia previa de cabeza y cuello, infección viral con Hepatitis C o virus de la inmunodeficiencia humana conocida, uso de medicamentos colinérgicos.
- d) Antecedente de linfoma, enfermedad de injerto contra huésped, sarcoidosis, enfermedad relacionada con IgG4.

Criterios de eliminación

- a) Participantes que retiren su consentimiento para participar en el estudio.
- b) En caso de sospecha de manifestación (es) sistémica(s), en los que no se contara con los estudios necesarios para la confirmación y valoración del grado de la(s) misma(s), se eliminó al paciente.
- c) En caso de detección de Sjögren secundario o asociado a otra enfermedad autoinmune el paciente se eliminó.

Tamaño de la muestra: voluntarios consecutivos con síndrome de Sjögren primario que acudieron al Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana en el período de julio de 2014 a septiembre 2015. Por tratarse de un estudio piloto no requirió de cálculo del tamaño de muestra, además por la baja prevalencia del Síndrome de Sjögren primario el muestreo se realizó por conveniencia de acuerdo al número de voluntarios que aceptaron participar.

Variables del estudio

1. Inmunofenotipo de linfocitos T CD4+ circulantes*.
2. Inmunofenotipo de linfocitos B circulantes*.

*Nota: Se usó un grupo de referencia de voluntarios sanos apareados por edad y género para comparar los valores normales de la inmunotipificación de LT CD4 y LB.

3. Presencia y títulos de anticuerpos Anti- La, Anti- Ro, Factor Reumatoide.
4. Concentración de inmunoglobulinas séricas IgG, IgM, IgA.

5. Características clínicas (oftalmológicas, salivales y sistémicas) del síndrome de Sjögren primario.

Las variables de este estudio se encuentran definidas en la Tabla 2.

Otras variables de interés en este estudio fueron: variables sociodemográficas y antropométricas: edad, género, tabaquismo, enfermedades crónico-degenerativas y su tratamiento.

Variable de confusión: Tratamiento sistémico del SS primario.

Tabla 2. Clasificación de variables del estudio.

| Variable | Tipo | Escala de medición |
|--|-----------------------|--|
| <i>Inmunofenotipo LT CD4+ circulantes</i> | Cuantitativa continua | Homing: CCR3 (Th2), CCR9 (mucosas), CCR10 (piel): Porcentaje. T activadas: CD25, CD57: Porcentaje. Tregs: CD4, CD25, FOXP3: Porcentaje. |
| <i>Inmunofenotipo LB circulantes</i> | Cuantitativa continua | CD19, CD38low, CD38med, CD38hi |
| <i>Calificación van Bijsterveld tinción fluoresceína y/o rosa de bengala</i> | Cuantitativa ordinal | 0- 9 puntos. |
| <i>Prueba de Schirmer I</i> | Cuantitativa continua | Milímetros |

| | | |
|--|-----------------------|---|
| <i>Cuestionario OSDI</i> | Cuantitativa ordinal | 0- 100 puntos |
| <i>Medición de flujo salival no estimulado (15min)</i> | Cualitativa | Positivo (≤ 1.5 ml en 15min), negativo (> 1.5 ml en 15min) |
| <i>Biopsia glándula salival escala de Chisholm Mason</i> | Cuantitativa ordinal | Grado 1, grado 2, grado 3, grado 4. |
| <i>Calificación Hocevar Ultrasonido (US) de glándulas salivales mayores escala de grises</i> | Cuantitativa ordinal | 0- 48 puntos. |
| <i>Índice de actividad de la enfermedad de Síndrome de Sjögren EULAR (ESSDAI)</i> | Cuantitativa discrete | 0-123 puntos. |

Análisis de marcadores de membrana por citometría de flujo

Para determinar la expresión del inmunofenotipo celular se empleó inmunofluorescencia directa, realizando tinciones con anticuerpos murinos dirigidos contra CD4, CD19, CD25, FoxP3, CD38 (análisis expresión low, med, hi), CD57, CCR3, CCR9, CCR10 conjugados a un fluorocromo. Brevemente, después de obtenidas las CMN, se incubó 50 μ ls con los anticuerpos conjugados a fluorocromo a 4^oC por 30 minutos. Después de la incubación, las células fueron lavadas y lisados los eritrocitos. Posteriormente las células fueron fijadas y en su caso permeabilizadas por 10 min a temperatura ambiente (Cytotfix/Cytoperm Becton Dickinson San José CA, USA) para de nuevo ser incubadas con anti-FoxP3 conjugado a fluorocromo a 4^oC por 30 minutos. Concluido el tiempo de incubación, las células fueron lavadas y fijadas con p-formaldehído al 1% e inmediatamente analizadas en un citofluorómetro FACSVerse (Becton Dickinson San José CA, USA). Los datos se presentan en gráficas de puntos o histogramas. Se utilizó el software Flow Jo, LLC versión 10.2 para la estrategia de análisis.

Evaluación clínica del Síndrome de Sjögren:

1) Afección glándulas lacrimales.

El grado de severidad de afectación ocular fue evaluado con:

- a) Tiempo de Ruptura de la película lagrimal: se realizó aplicando anestésico tópico con tinción de fluoresceína. Se evaluó pidiendo al paciente parpadear tres veces y bajo observación en lámpara de hendidura y luz de cobalto. Se midió el tiempo a partir del último parpadeo, pidiendo al paciente que no parpadeará hasta que el observador observó la primera mancha negra sobre la córnea. Cuando ésta apareció, se consideró que se rompió la película lagrimal y es hasta donde se tomó el tiempo en segundos.

b) Pruebas de tinción para superficie ocular: Fluoresceína y Rosa de Bengala. En caso de encontrarse positiva a tinción por fluoresceína se usó la escala de van Bijsterveld con la que se calificaron dos zonas de tinción conjuntiva y córnea, se calificó en graduación de 1 a 3 grados (grado 1 puntilleo escaso separado, grado 2 puntilleo moderado separado, grado 3 puntilleo confluyente), la calificación posible fue de 0 a 9 puntos.²⁴

c) La afección oftálmica se evaluó con la prueba de Schirmer I, se consideró positiva, menor a 5mm después de 5 minutos.

d) El grado de demanda de gotas oftálmicas.

e) Exploración oftalmológica completa que incluyó agudeza visual y biomicroscopia.

f) Cuestionario OSDI (Ocular Surface Disease Index): cuestionario que establece la severidad y la clasificación del ojo seco según su sintomatología.

Puntuación 0- 100 puntos (0-13 normal, 13 a 22, afección leve/ moderada, 23 a 50 puntos, afección moderada/ grave).

2) Afección glándulas salivales.

El grado de afección en glándulas salivales se evaluó con:

a) La medición de flujo salival no estimulado durante 15 minutos, se consideró positivo menor a 1.5ml.

b) Biopsia de glándula salival menor, que se clasificó de acuerdo a la escala de Chisholm Mason. ²³

- Grado 0: sin infiltrado linfocitario. Glándulas salivales normales.

- Grado 1: infiltrado linfocitario/plasmocitario leve difuso (<50 células/4mm²). Sialoadenitis crónica leve.
 - Grado 2: infiltrado moderado o menos de un foco de infiltrado linfocitario/plasmocitario (<1 foco de 50 células/4 mm²). Sialoadenitis crónica moderada.
 - Grado 3: infiltrado linfocitario/plasmocitario (1 foco de 50 células/4 mm²) y atrofia glandular (fibrosis, pérdida marcada de acinos, ductos dilatados). Sialoadenitis crónica severa.
 - Grado 4: más de un foco. Síndrome de Sjögren.
- c) US de las glándulas salivales parótidas y submandibulares bilaterales en dos planos ortogonales donde se valoró su ecoestructura en escala de grises e incremento en la vascularización usando el Doppler poder.
- a. Equipo Esaote MyLab 70 (Genova, Italia ®) con transductor lineal multifrecuencia de 10- 18MHz y en caso necesario transductor lineal multifrecuencia de 7.5- 12MHz.
 - b. Parámetros Doppler poder (Transductor lineal multifrecuencia de 10- 18MHz): frecuencia de repetición de pulso (PRF) 750Hz, persistencia 4, filtro de pared 3, densidad (PRC) 3, frecuencia Doppler 14.3MHz, ganancia de color justo cuando los artefactos de sonido desaparecen debajo de la cortical ósea (50-70%).

Se utilizó la graduación sonográfica de las glándulas salivales mayores de Hocevar et. al. ,²⁵ que emite una calificación 0- 48 puntos. A continuación se presenta en la tabla 3 los parámetros que fueron evaluados en la escala de Hocevar.

Tabla 3. Escala Hocevar de Ultrasonido de Glándulas Salivales Mayores.

| Parámetro | Glándulas | 0 | 1 | 2 | 3 |
|--|--------------------------|--|-------------------------------|----------------------|--------------------|
| <i>Ecogenicidad parénquima comparado con tiroides*</i> | Parótida y submandibular | Comparable | Disminuido | - | -- |
| <i>Falta de Homogeneidad</i> | Parótida y submandibular | Homogéneo | Leve | Evidente | Severo |
| <i>Áreas hipoecoicas</i> | Parótida y submandibular | Ausente | Pocas aisladas | Varias | Numerosas |
| <i>Ecos hiperecoicos</i> | Parótida | Ausente | Pocos escasos | Severo | Numerosos |
| | Submandibular | Ausente | Presente | - | - |
| <i>Claridad de bordes glandulares</i> | Parótida y submandibular | Claro, bordes regulares bien definidos | Parcialmente bordes definidos | Bordes mal definidos | Bordes no visibles |

*En caso de patología tiroidea se debe comparar con tejidos circundantes glandulares (músculo), lo cual no fue necesario en ningún paciente.

3) Manifestaciones sistémicas.

a) Se realizó exploración física completa para detectar incremento de volumen de las glándulas parótidas y submandibulares salivales, así mismo para detectar probables manifestaciones extraglandulares del SS primario como adenopatías, artritis, manifestaciones cutáneas, manifestaciones pulmonares, manifestaciones neurológicas periféricas y de SNC y manifestaciones musculares, entre otras.

- b) Se realizó espirometría en reposo para valorar función pulmonar en todos los participantes con Síndrome de Sjögren primario asociado a AR.
- c) Se realizaron laboratorios generales para valorar función renal y descartar actividad a nivel hematológico, muscular y biológico en todos los participantes con Síndrome de Sjögren primario.
- d) Se realizó la evaluación de la actividad de la enfermedad sistémica usando el índice de actividad de la enfermedad de Síndrome de Sjögren EULAR (ESSDAI) ²⁶ con la que se evaluaron diferentes dominios expresados en la tabla 4.

Tabla 4. Índice de actividad de la enfermedad de SS EULAR (ESSDAI).

| Dominio | Nivel de actividad | Descripción |
|---|---|---|
| <i>Constitucional (descartar infecciones o pérdida peso voluntaria)</i> | 0 No 3 Baja 6 Moderada | Baja: Fiebre leve o intermitente (37.5- 38.5°C)/ diaforesis y/o pérdida peso 5- 10%. Moderada: fiebre >38.5°C, diaforesis nocturna, pérdida peso >10%. |
| <i>Linfadenopatía (excluir infecciones)</i> | 0 No 4 Baja 8 Moderada 12 Alto | Baja: linfadenopatía ≥1cm en cualquier región o ≥2cm región inguinal. Moderada: ≥2cm cualquier región o ≥3cm inguinal y/o esplenomegalia (clínica o imagen). Alta: malignidad trastorno proliferativo LB. |

| | | |
|--|--|--|
| <p><i>Glandular (excluir infección o litiasis)</i></p> | <p>0 No 2 Baja 4 Moderada</p> | <p>Baja: incremento tamaño ≤ 3cm parótida o limitado a glándulas submandibulares o lagrimales. Moderada: incremento tamaño parótida ≥ 3cm o importante de glándulas submandibulares o lacrimales.</p> |
| <p><i>Articular (excluir Osteoartritis)</i></p> | <p>0 No 2 Baja 4 Moderada 6 Alta</p> | <p>Baja: artralgias de manos, carpos, tobillos y pies con rigidez articular matinal > 30min. Moderada: artritis 1-5 articulaciones (conteo articular 28). Alta: artritis ≥ 6 articulaciones (conteo articular 28).</p> |
| <p><i>Cutáneo</i></p> | <p>0 No 3 Baja 6 Moderada 9 Alta</p> | <p>Baja: eritema multiforme. Moderada: vasculitis cutánea limitada (vasculitis urticariana, púrpura limitada a pies o tobillo, lupus subagudo). Alta: vasculitis cutánea difusa (vasculitis urticariana, purpura difusa, úlceras).</p> |
| <p><i>Pulmonar</i></p> | <p>0 No 5 Baja 10 Moderada 15 Alta</p> | <p>Baja: tos persistente o afección bronquial sin evidencia por imagen de daño o enfermedad pulmonar intersticial por radiología o TACAR*, sin disnea o función pulmonar normal. Moderada: afección pulmonar activa moderada (TACAR fibrosis</p> |

| | | |
|--|--|--|
| | | <p>pulmonar con disnea ejercicio NHYA II ó pruebas de función pulmonar anormal: DL_{CO}>70% pero no <40% o FVC >80% pero no ≤60%.</p> <p>Alta: fibrosis pulmonar TACAR con disnea en reposo (NHYA III o IV) o pruebas de función pulmonar anormales FVC <60% o DL_{CO} <40%.</p> |
| <i>Renal</i> | <p>0 No 5 Baja 10 Moderada 15 Alta</p> | <p>Baja: acidosis tubular renal sin falla renal o afección glomerular (proteinuria 0.5-1gr/día) sin hematuria ni falla renal (TFG≥60ml/min).</p> <p>Moderada: acidosis tubular renal al (TFG<60ml/min) o afección glomerular (proteinuria 1- 15gr/día sin hematuria ni falla renal o evidencia histológica de GMN extra membranosa o infiltrado intersticial).</p> <p>Alta: afección glomerular (proteinuria >1.5gr/día o hematuria) o falla renal (TFG <60ml/min) o cambios histológicos de GMN proliferativa o crioglobulinemia).</p> |
| <i>Muscular (exclusión miopatía por glucocorticoide)</i> | <p>0 No 6 Baja 12 Moderada</p> | <p>Baja: miositis por EMG anormal o biopsia sin debilidad o CPK normal.</p> |

| | | |
|--|---|---|
| | 18 Alta | <p>Moderada: miositis activa por EMG anormal o biopsia con debilidad muscular (4/5) o CPK elevada más del doble pero menos de 4 veces.</p> <p>Alta: miositis activa alta por EMG anormal o biopsia con debilidad ($\leq 3/5$) o CPK elevada más de 4 veces.</p> |
| <i>Sistema nervioso periférico (SNP)</i> | <p>0 No</p> <p>5 Baja</p> <p>10 Moderado</p> <p>15 Alta</p> | <p>Baja: polineuropatía axonal sensitiva pura (estudios neuroconducción) o neuralgia trigémino.</p> <p>Moderada: neuropatía motora-sensorial axonal, neuropatía sensorial pura con vasculitis crioglobulinemica, ganglionopatía, polineuropatía demielinizante inflamatoria (estudios neuroconducción) o afección craneal de origen periférico.</p> <p>Alta: neuropatía motora- sensorial axonal (déficit motor $\leq 3/5$) afección nervios periféricos por vasculitis, ganglionopatía con ataxia severa, polineuropatía demielinizante inflamatoria (déficit motor $\leq 3/5$).</p> |
| <i>Sistema nervioso central (SNC)</i> | <p>0 No</p> <p>10 Moderada</p> <p>15 Alta</p> | <p>Moderada: afección nervio craneal origen central, neuritis óptica o síndrome tipo esclerosis</p> |

| | | |
|--|---|--|
| | | <p>múltiples (sensibilidad o cognitivo).</p> <p>Alta: vasculitis cerebral con EVC o ataque isquémico transitorio, convulsiones, mielitis transversa, meningitis linfocítica, síndrome tipo esclerosis sistémica (motor).</p> |
| <i>Hematológica (sólo citopenias de origen autoinmune)</i> | <p>0 No</p> <p>2 Baja</p> <p>4 Moderada</p> <p>6 Alta</p> | <p>Baja: Neutropenia >1000 pero <1500 anemia Hb >10 pero <12, trombocitopenia >100,000 pero <150,000.</p> <p>Moderada: Neutropenia >500 pero <1000 anemia Hb >8 pero <10, trombocitopenia >50,000 pero <100,000.</p> <p>Alta: Neutropenia <500 anemia Hb <8, trombocitopenia <50,000.</p> |
| <i>Biológico</i> | <p>0 No</p> <p>1 Baja</p> <p>2 Moderada</p> | <p>Baja: complemento C3 y C4 bajo, hipergammaglobulinemia, IgG >16 pero <20g/L.</p> <p>Moderada: crioglobulinemia, hipergammaglobulinemia, IgG >20g/L y/o hipogammaglobulinemia reciente o reducción reciente nivel IgG (<5g/L).</p> |

Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado con el Graph pad. El resumen de los datos se presenta con estadística descriptiva, para determinar la distribución de las variables numéricas se usó la prueba de Shapiro- Wilk y los resultados se muestran en tablas presentando media y desviación estándar (DS) o mediana y rango intercuartil (IQR).

Para evaluar diferencias significativas se utilizó, dependiendo de las variables a comparar, una prueba de U-Mann Whitney o T de Student. Se consideró diferencia estadísticamente significativa cuando la p fue ≤ 0.05 . El análisis de correlación se realizó dependiendo de la distribución de los datos y conforme a los resultados obtenidos en la prueba de normalidad, se utilizó la prueba de correlación de Spearman o Pearson. Ver tabla 5.

Tabla 5. Variables en los que se buscó correlación.

| Inmunológicas | Clínicas |
|--|--|
| 1) Treg (%). 2) Th1/Th2 (%). 3) LB Maduro, memoria, activado, Breg (%) | 1) Actividad clínica medida por índice ESSDAI (0- 23 puntos). 2) US glándulas salivales mayores escala Hocevar (0- 48 puntos) |

Actividades de investigadores

Investigador principal realizó la valoración clínica reumatológica de las manifestaciones a nivel de la glándula salival y de las sistémicas en el Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana.

El investigador principal, tutor y co-tutor realizaron el procesamiento de las muestras y análisis de resultados inmunológicos en el Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana.

La Dra. Santacruz realizó la evaluación oftalmológica en el Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana.

La Dra. Montiel apoyó a los investigadores del Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana con actividades logísticas y toma de muestras.

La Dra. Hernández y el Dr. Ventura realizaron el ultrasonido de glándulas salivales mayores, en el laboratorio de Ultrasonido Musculo-esquelético y Articular del Instituto Nacional de Rehabilitación.

Consideraciones éticas.

El protocolo del estudio clínico y cualquier enmienda fue sometida para su aprobación al Comité de Ética Institucional en el Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana Institución de Asistencia Privada (IAP) y a las autoridades regulatorias correspondientes. Además el protocolo se realizó según los requisitos normativos y se seguirán las buenas prácticas clínicas de la Conferencia Internacional sobre Armonización ICH (International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use) y la Declaración de Helsinki. Todos los pacientes autorizaron y firmaron Consentimiento Informado del protocolo para participar. **(Anexo 1)**.

Consideraciones de bioseguridad.

Durante el protocolo se tomaron muestras de sangre (10ml aproximadamente) y de orina de cada paciente para la medición de los siguientes parámetros:

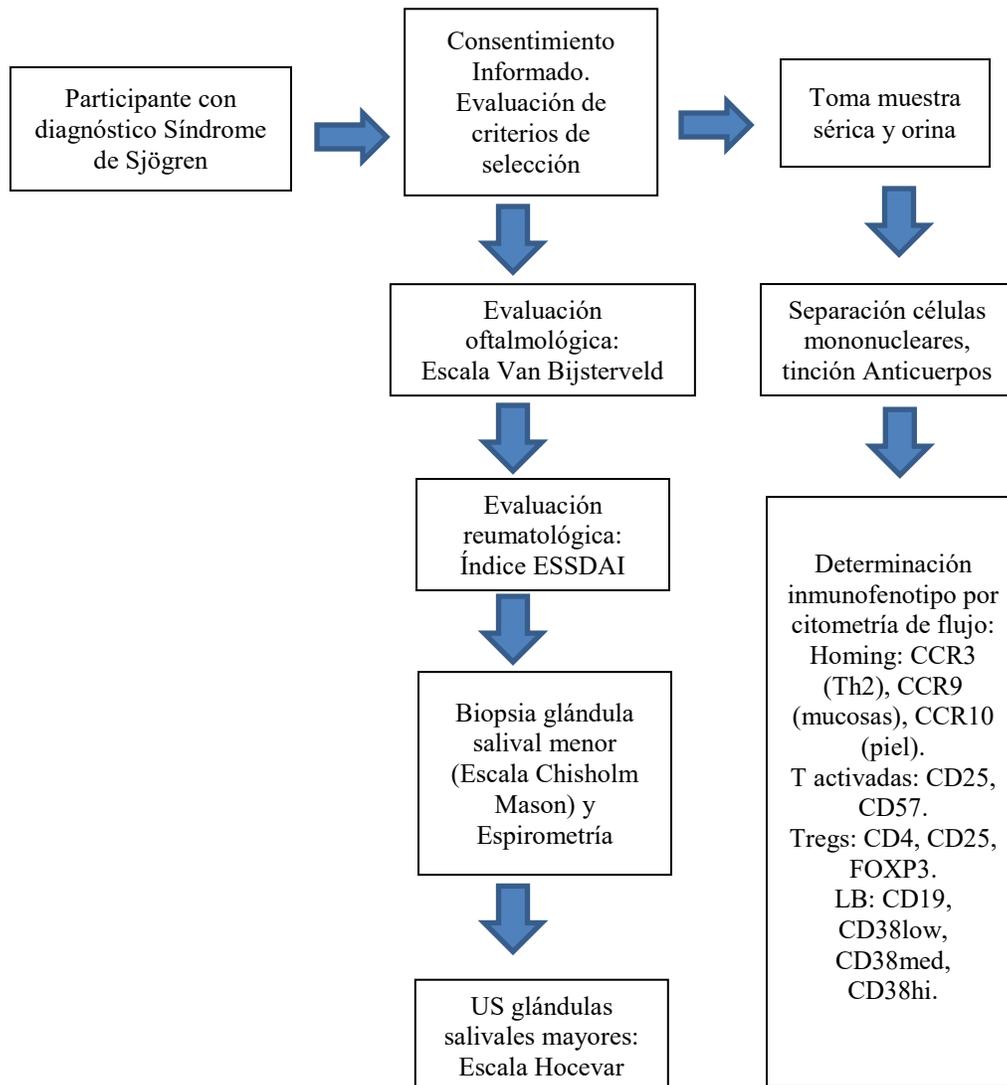
Biometría hemática, Velocidad de Sedimentación Globular, Química Sanguínea de 6 elementos, Examen General de Orina, albúmina y creatinina en orina y sérica, Velocidad de Sedimentación Globular, Anti-Ro, Anti-La, Factor Reumatoide, complemento C3 y C4, Crioglobulinas, Inmunoglobulinas IgA, IgG, IgM e IgE, Inmunofenotipo de LT CD4+ circulantes CCR3, CCR9, CCR10, CD57, CD25, CD4, FOXP3, CD19, CD38 y Biopsia de glándula salival menor.

Para el cumplimiento de esta parte del protocolo se contó con la infraestructura del área de Inmunología de la Unidad de Investigación del Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana.

Así mismo, el área de laboratorio clínico de la Unidad de Investigación cuenta con área de toma de muestra, la cual cumple con los requisitos especificados en la Norma Oficial Mexicana NOM-007-SSA3-2011, para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos. Los desechos biológicos generados se colectaron, transportaron y desecharon conforme al protocolo interno vigente de manejo de Residuos Peligrosos Biológico- Infecciosos (RPBI) de la Unidad de Investigación del Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana basado en la NOM-087-ECOL-SSA1-2002 sobre el manejo de RPBI. Los RPBI se recaudaron en las bolsas indicadas con color rojo y amarillo y teniendo recipientes rígidos especiales para punzocortantes, presentes tanto en el área de toma de muestra como en el área de laboratorio. Posteriormente estos contenedores fueron transportados por el personal calificado al área de concentración de RPBI para su posterior destrucción de acuerdo al procedimiento institucional.

La toma de muestra se realizó por el equipo médico autorizado mediante acreditación del curso interno de manejo de RPBI.

Diagrama general de trabajo



Resultados

En este estudio, se incluyeron 7 participantes con diagnóstico confirmado de Síndrome de Sjögren primario, de acuerdo a los criterios de clasificación del Grupo de Consenso Americano- Europeo (GCAE, 2002) que cumplieron los criterios de inclusión y exclusión. En la figura 1, se observa una imagen característica de la biopsia de glándula salival menor, en la que se observa infiltración grado 4, conforme a la escala de Chisholm Mason. Sólo una participante fue eliminada del estudio porque durante su evaluación se detectaron anticuerpos anti-tiroglobulina y anti-peroxidasa positivos, sin tener aún el diagnóstico de hipotiroidismo autoinmune con perfil tiroideo normal.

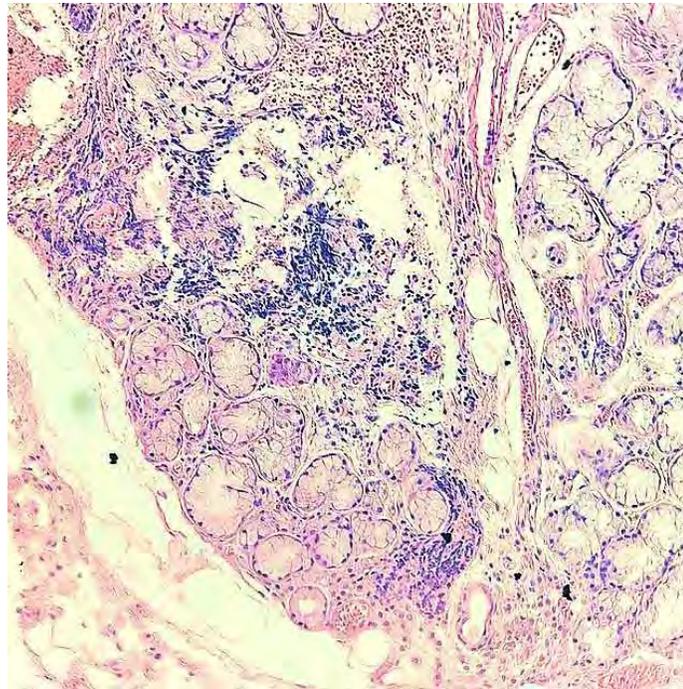


Figura 1. Biopsia de glándula salival menor. Se observa imagen característica con infiltrado linfocítico en parénquima glandular, atrofia glandular y áreas de fibrosis. Tinción H y E, 200x

Características Demográficas

Todos los sujetos que participaron en este estudio fueron del género femenino, con una edad media de 54.8 ± 12.9 años. Sólo una paciente tenía el antecedente de tabaquismo previo con un índice tabáquico de 1.25 paquetes/año. Una de ellas tenía antecedente de Hipertensión Arterial Sistémica y osteoporosis, otra participante tenía antecedente de una parálisis facial periférica y otra insuficiencia venosa superficial periférica.

La edad media al diagnóstico de SSp fue de 53 ± 13.32 , sin embargo, el tiempo de inicio de síntomas previo al diagnóstico (retraso en el diagnóstico) tuvo una mediana de 4 años (3.25-7.50), por lo que la edad media de inicio de los síntomas de SSp fue de 49.33 ± 13.67 . Así mismo, el tiempo entre inicio de los síntomas e inicio de fármacos modificadores de la enfermedad (FARME) tuvo una mediana de 0.125 años (0-6.0 años). La mediana de tiempo de evolución de los síntomas fue de 4 años (3.25- 7.50). En la tabla 6 se enumeran las variables demográficas de las participantes.

Tabla 6. Variables demográficas.

| Variable demográfica | Media \pm DE/ Mediana (IQR)/ N (%) |
|--|--|
| Edad (años) | 54.83 \pm 12.93 |
| Escolaridad (años) | 11.33 \pm 2.87 |
| Tabaquismo (participantes) | 1 (16.67%) |
| Hipertensión Arterial Sistémica (participantes) | 1 (16.67%) |
| Osteoporosis (participantes) | 1 (16.67%) |
| Parálisis facial periférica (participantes) | 1 (16.67%) |
| Insuficiencia venosa periférica superficial (participantes) | 1 (16.67%) |
| Edad al diagnóstico (años) | 53 \pm 13.32 |
| Tiempo evolución antes de diagnóstico (años) | 4 (3.25- 7.50) |
| Edad inicio síntomas (años) | 49.33 \pm 13.67 |
| Tiempo entre inicio síntomas- inicio FARME (años) | 0.125 (0- 6) |
| Tiempo evolución SS (síntomas) (años) | 4 (3.25- 7.50) |

Tratamiento

Todas las participantes, excepto una, se encontraban con tratamiento oftalmológico al momento de la evaluación; La demanda de uso de gotas oftálmicas fue mayor a 4 veces al día en 3 participantes, 4 veces al día en otra y una negó uso de las mismas.

El 50% tenía tratamiento con FARME pero las participantes restantes no tenía ningún manejo inmunosupresor. Durante su evolución sólo una participante había recibido otro tratamiento FARME con combinación de cloroquina con metotrexate pero al momento la valoración sólo continuaba con cloroquina, suspendió metotrexate por diagnóstico de fibrosis pulmonar. En la Tabla 7 se especifica el tratamiento oftalmológico y tratamiento FARME al momento de la valoración de las participantes.

Tabla 7. Tratamiento Oftalmológico y FARME.

| Tipo de Tratamiento | N (%, participante) |
|---|----------------------------|
| Oftalmológico | |
| Dextran e hidroxipropilmetilcelulosa gotas | 3 (50%, SSp1, SSp3, SSp6) |
| Dextran e hidroxipropilmetilcelulosa gotas, Carboximetilcelulosa 5% con Purite 0.05mg gotas, Ácido poliacrílico 3mg gel | 1 (16.67%, SSp2) |
| Coindritin sulfato, ácido hialurónico yaprotina liofilizado gotas. Hialuronato de sodio gotas, suero autólogo | 1 (16.67%, SSp5) |
| FARME | |
| Hidroxicloquina y Metotrexate | 1 (16.67%, SSp1) |
| Cloroquina | 1 (16.67%, SSp3) |
| Hidroxicloquina | 1 (16.67%, SSp6) |
| Demanda uso gotas oftálmicas (Lubricantes) | |
| Más de 4 veces al día | 3 (50%) |
| 4 veces al día | 1 (16.67%) |
| No uso gotas | 2 (33.33%) |

Actividad clínica sistémica de las pacientes incluidas en el estudio

Durante la evolución del SSp todas las participantes refirieron manifestaciones extraglandulares; todas, excepto una, refirieron manifestaciones articulares consistentes en artralgias, pero sólo una tuvo artritis (paciente con manejo con metotrexate e hidroxicloroquina), en ésta participante se descartó artritis reumatoide ya que la determinación del anticuerpo anti-péptido cíclico citrulinado (Anti-CCP) fue negativa. En este sentido, ninguna participante cumplió con criterio de actividad articular de ESSDAI ya que a pesar de referir artralgias no tenían rigidez articular matinal (RAM) mayor a 30 minutos.

Una participante refirió xerotráquea con antecedente de fibrosis pulmonar, diagnóstico previamente por Tomografía Axial Computada de alta resolución (TACAR), otra paciente refirió xerosis y otra participante refirió fatiga y lívedo reticularis. En una paciente se encontró hipertrofia de parótida derecha, en esta misma paciente se encontró hipertrofia sinovial de metacarpofalángicas, En otra paciente se encontró afección pulmonar manifestada por estertores infraescapulares además la misma refirió artralgia a la palpación de pequeñas articulaciones de manos. En la tabla 8 se resumen resultados de principales laboratorios generales.

Una participante tuvo afección renal alta (falla renal por disminución TFG $<60\text{ml/min}$), glandular baja (crecimiento de parótida $\leq 3\text{cm}$) y biológica moderada (hipergammaglobulinemia con $\text{IgG} \geq 20\text{g/L}$ y crioglobulinemia). Otra tuvo manifestaciones a nivel pulmonar moderada (FVC $<80\%$ pero $>60\%$ y evidencia de daño pulmonar intersticial por TACAR) y biológico moderado (C4 bajo, hipergammaglobulinemia con $\text{IgG} \geq 20\text{g/L}$ y crioglobulinemia). Otra participante tuvo manifestaciones a nivel hematológico (trombocitopenia <150 mil pero >100 mil) y biológico moderado (C4 bajo, hipergammaglobulinemia con $\text{IgG} \geq 20\text{g/L}$ y crioglobulinemia). Otra tuvo afección renal baja (afección glomerular proteinuria 0.5-1gr/día sin falla renal ni hematuria) y biológico bajo (C4 bajo,

hipergammaglobulinemia con IgG \geq 16g/L pero <20g/L). Otra participante tuvo manifestación a nivel biológico moderado (C4 bajo, hipergammaglobulinemia con IgG \geq 16g/L pero <20g/L y crioglobulinemia) y otra participante tuvo actividad biológica moderada (crioglobulinemia).

Tabla 8. Laboratorios generales

| Laboratorio | Media (DE) / Mediana (IQR) |
|---|-----------------------------------|
| Hemoglobina (g/dL) | 14.43 \pm 1.06 |
| Hematocrito (%) | 42.78 \pm 3.43 |
| Leucocitos (10 ³ /uL) | 4.62 \pm 1.16 |
| Neutrófilos (10 ³ /uL) | 2.54 \pm 0.85 |
| Linfocitos (10 ³ /uL) | 1.51 \pm 0.51 |
| Plaquetas (10 ³ /uL) | 214.5 \pm 47.81 |
| VSG (mm/h) | 35.33 \pm 15.99 |
| Glucosa (mg/dL) | 85.5 \pm 8.59 |
| Creatinina (mg/dL) | 0.59 (0.50- 0.77) |
| TFG MDRD * (ml/min/1.73m ²) | 108.83 \pm 29.03 |
| UACR* (mg/gr creatinina) | 0 (0-347) |
| Colesterol (mg/dL) | 169.66 \pm 2.47 |
| Triglicéridos (mg/dL) | 80.66 \pm 22.01 |
| pH orina | 6.16 \pm 0.25 |

*DE desviación estándar. TFG Tasa Filtración Glomerular por fórmula modificación dieta en enfermedad renal (modification of diet on renal disease). UACR índice albúmina creatinina urinaria (urinary albumin to creatinine ratio).

Por espirometría la media de la capacidad vital forzada (FVC) fue de 2.58 \pm 0.49L, del volumen espiratorio máximo en el primer segundo (FEV1) fue de 1.67 \pm 0.71L, de la relación FEV1/ FVC fue de 63.48 \pm 20.94% y la mediana del flujo espiratorio medio (FEF 25- 75%) fue de 1.46L/s (0.68- 2.55). En la tabla 9 se resumen estos parámetros.

Tabla 9. Parámetros de espirometría.

| Espirometría (Media \pm DE*/ mediana (IQR)) | |
|---|-------------------|
| FVC (L) (Teórico 2.21) | 2.58 \pm 0.49 |
| FEV1 (L) (Teórico 1.66) | 1.67 \pm 0.71 |
| FEV1/FVC (%) (Teórico 75.7) | 63.48 \pm 20.94 |
| FEF 25- 75 (L/s) (Teórico 1.40) | 1.46 (0.68- 2.55) |

*DE desviación estándar

Con la exploración física (EF) completa se descartaron linfadenopatías, datos clínicos de manifestaciones en piel, músculo, sistema nervioso periférico y sistema nervioso central en todas las pacientes.

La EF y los estudios paraclínicos permitieron determinar una media de ESSDAI de 7.5 ± 6.74 puntos. Todas las participantes excepto la segunda tuvieron anticuerpos Anti-Ro y Anti-La positivos, la segunda paciente cumplió con los criterios de clasificación GCAE con el criterio objetivo histológico. Todas las participantes, excepto la segunda, tuvieron hipergammaglobulinemia y factor reumatoide positivo. Todas tuvieron hipocomplementemia de C4 excepto la primera y la segunda participante. Todas las participantes excepto la sexta tuvieron crioglobulinemia. La tercera y quinta participantes tuvieron un patrón obstructivo por Espirometría, sin embargo, en la quinta paciente no se encontró alteración a la exploración física pulmonar y su FVC fue mayor a 80% por lo que no cumplió criterios para afección pulmonar por ESSDAI. En la tabla 10 se resumen las manifestaciones positivas por paciente, conforme a la evaluación ESSDAI y el puntaje asociado.

Tabla 10. Puntaje ESSDAI por participante.

| Participante | Manifestaciones ESSDAI | Puntos ESSDAI |
|---------------------|--|----------------------|
| SSp1 | Crecimiento parótida derecha ≤ 3 cm (2 puntos), TFG calculada por MDRD 58ml/min (15 puntos), IgG 22.1g/L, hipergammaglobulinemia y crioglobulinemia (2 puntos). | 19 |
| SSp2 | Crioglobulinemia (2 puntos) | 2 |
| SSp3 | FVC 69%, TACAR fibrosis pulmonar (10 puntos), C4 bajo, IgG 22.3g/L, hipergammaglobulinemia y crioglobulinemia (2 puntos). | 12 |
| SSp5 | Trombocitopenia 140,000 (2 puntos), C4 bajo, IgG 22.9g/L, crioglobulinemia e hipergammaglobulinemia (2 puntos). | 4 |
| SSp6 | Proteinuria 0.5-1gr/día (5 puntos), C4 bajo IgG 19.7g/L e hipergammaglobulinemia (1 punto). | 6 |
| SSp7 | C4 bajo, IgG 16.8g/L, hipergammaglobulinemia y crioglobulinemia (2 puntos). | 2 |

Características oftalmológicas de las pacientes incluidas en el estudio.

En cuanto a la valoración oftalmológica la media del OSDI fue de 16.25 ± 5.67 ; en este cuestionario la puntuación es de 0-100 puntos, de 0 a 13 puntos se considera normal, de 13 a 22 puntos se considera una afección leve/ moderada, y de 23 a 50 puntos se considera una afección moderada/ grave; por lo que la media de nuestra muestra se considera una afección leve/ moderada. Ninguna de las pacientes evaluadas tuvo afección moderada/ grave. La agudeza visual de y los hallazgos de la biomicroscopia de cada participante se resumen en las tablas 11 y 12 respectivamente; por otra parte, los hallazgos cuantitativos de la valoración oftalmológica, se resumen en la tabla 13.

Tabla 11. Agudeza visual pacientes incluidos en el estudio

| Participante | Agudeza visual OD | Agudeza Visual OI |
|--------------|-------------------|---------------------|
| SSp1 | 20/100 | 20/100 |
| SSp2 | 20/40 | 20/100 |
| SSp3 | 20/120 | 20/60 |
| SSp5 | 20/40 | Cuenta dedos a 1.5m |
| SSp6 | 20/30 | 20/30 |
| SSp7 | 20/20 | 20/20 |

*OD ojo derecho, OI ojo izquierdo.

Tabla 12. Hallazgos biomicroscopia.

| Área anatómica | SSp1 | SSp2 | SSp3 | SSp5 | SSp6 | SSp7 |
|-------------------|--|---|--|--|--------------------------|--|
| Párpado | Borde palpebral hiperémico AO, papilas positivas | Borde palpebral engrosado AO, papilas positivas OD, orificios ocluidos OI | Borde palpebral hiperémico AO, poca expresión meibum AO | NA | NA | Papilas positivas OI |
| Córnea | NA | QPS AO, lesión ulcerativa OI | QPS AO | QPS AO, defectos epiteliales OI | QPS AO | QPS AO |
| Conjuntiva | Fibrosis subconjuntival, pérdida arquitectura vasos subconjuntivales | Conjuntiva hiperémica AO, telangiectasias OD, folículos positivos AO, moco filamentoso OI | Conjuntiva hiperémica OI | Conjuntiva hiperémica ambos ojos, folículos positivos OD | Conjuntiva hiperémica AO | Conjuntiva hiperémica ambos ojos, folículos positivos OD |
| Iris | NA | NA | Pigmento edematoso OD | NA | NA | NA |
| Cristalino | Esclerosis grado I | NA | Esclerosis nuclear grado II OD y esclerosis grado I OI, opacidad anterior AO | Opacidad subcapsular OD | NA | NA |

*AO ambos ojos, OD ojo derecho, OI ojo izquierdo, QPS Queratitis punteada.

Tabla 13. Hallazgos cuantitativos de la valoración oftalmológica.

| Hallazgo | Media (DE) / Mediana (IQR) | Media (DE) / Mediana (IQR) |
|--|----------------------------|----------------------------|
| | Ojo Derecho | Ojo Izquierdo |
| VB | 3.6 ± 3.13 | 5 ± 3.16 |
| VB córnea (puntos) | 1 (0.5-2) | 2.2 ± 1.09 |
| VB conjuntiva temporal (puntos) | 1.4 ± 1.14 | 1.4 ± 1.34 |
| VB conjuntiva nasal (puntos) | 1 (0.0- 2.0) | 1.4 ± 1.34 |
| Daño corneal (puntos) | 2 (1- 8) | 8.5 ± 6.02 |
| Tiempo ruptura lágrima (segundos) | 2.4 ± 0.54 | 2.4 ± 1.14 |
| Schirmer I (mm) | 5.8 ± 2.77 | 4.4 ± 1.34 |
| Línea de marx (x´) | 50.2 ± 28.15 | 53.2 ± 30.18 |

*DE desviación estándar, VB Van Bijsterveld.

Se encontró alteración en el cierre palpebral en ojo derecho de la primera y la quinta participantes y en el ojo izquierdo de la segunda y la quinta participantes. La sensibilidad de ojo derecho se encontró ausente en el ojo derecho e izquierdo de la cuarta participante y se encontró disminuida en ambos ojos de la tercera y séptima participantes. En la tabla 14 se describe el cierre adecuado y la sensibilidad por ojo por participante.

Tabla 14. Cierre palpebral y sensibilidad.

| Participante | Cierre Adecuado OD | Cierre Adecuado OI | Sensibilidad OD | Sensibilidad OI |
|--------------|--------------------|--------------------|-----------------|-----------------|
| SSp1 | Ausente | Presente | Presente | Presente |
| SSp2 | Presente | Ausente | Presente | Presente |
| SSp3 | Presente | Presente | Disminuida | Disminuida |
| SSp5 | Ausente | Ausente | Ausente | Ausente |
| SSp6 | Ausente | Ausente | Disminuida | Disminuida |
| SSp7 | Presente | Presente | Disminuida | Disminuida |

*OD ojo derecho, OI ojo izquierdo

Características ultrasonográficas de las glándulas salivales mayores

Para la evaluación ultrasonográfica de las glándulas salivales mayores, se utilizó la escala de Hocevar, encontrando un puntaje de promedio de 21.33 ± 4.96 puntos, en el que la primera participante tuvo 19 puntos, la segunda 15 puntos, la tercera 17 puntos, la quinta 25 puntos, la sexta 27 y la séptima 25 puntos. Adicionalmente, se encontró doppler poder incrementado en la parótida derecha de la primera participante, en la submandibular derecha de la segunda participante, en la submandibular izquierda de la quinta participante y en la parótida derecha de la sexta participante. Las características evaluadas por la escala de Hocevar se ejemplifican en las figuras 2 y 3 y la aplicación del Doppler poder con positividad en la figura 4. La escala de Hocevar por característica evaluada por participante y el Doppler poder se resume en la tabla 15.



Figura 2. Ultrasonido (US) en escala de grises de la glándula parótida derecha en eje longitudinal con ecogenidad disminuida en comparación con glándula tiroides, falta de homogeneidad evidente, varias áreas hipoecoicas, ecos hiperecoicos escasos y bordes definidos.



Figura 3. US de glándula submandibular derecha en escala de grises en eje longitudinal que muestra ecogenidad disminuida en comparación con glándula tiroides, falta de homogeneidad evidente, pocas áreas hipoecoicas, ecos hiperecoicos escasos y bordes definidos.



Figura 4. US de glándula parótida derecha en escala de grises plano transversal con presencia de Doppler poder.

Tabla 15. Hallazgos ultrasonográficos Escala Hocevar y Doppler poder.

| Característica US | SSp1 | SSp2 | SSp3 | SSp5 | SSp6 | SSp7 |
|------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Ecogenicidad PD | Disminuido (1) | Comparable (0) | Disminuido (1) | Disminuido (1) | Disminuido (1) | Disminuido (1) |
| Ecogenicidad PI | Disminuido (1) |
| Ecogenicidad SD | Disminuido (1) |
| Ecogenicidad SI | Comparable (0) | Disminuido (1) | Comparable (0) | Disminuido (1) | Disminuido (1) | Disminuido (1) |
| Falta Homogeinidad PD | Severo (3) | Homogeneo (0) | Evidente (2) | Evidente (2) | Homogeneo (0) | Leve (1) |

| | | | | | | |
|------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------------|----------------------|
| Falta Homogeinidad PI | Leve (1) | Leve (1) | Evidente (2) | Severo (3) | Severo (3) | Severo (3) |
| Falta Homogeinidad SD | Leve (1) | Evidente (2) | Leve (1) | Evidente (2) | Evidente (2) | Evidente (2) |
| Falta Homogeinidad SI | Leve (1) | Evidente (2) | Homogeneo (0) | Evidente (2) | Severo (3) | Leve (1) |
| Áreas hipoecoicas PD | Numerosas (3) | Pocas aisladas (1) | Numerosas (3) | Varias (2) | Pocas aisladas (1) | Pocas aisladas (1) |
| Áreas hipoecoicas PI | Varias (2) | Pocas aisladas (1) | Varias (2) | Numerosas (3) | Numerosas (3) | Numerosas (3) |
| Áreas hipoecoicas SD | Pocas aisladas (1) | Varias (2) | Numerosas (3) | Varias (2) | Varias (2) | Varias (2) |
| Áreas hipoecoicas SI | Pocas aisladas (1) | Pocas aisladas (1) | Pocas aisladas (1) | Varias (2) | Numerosas (3) | Numerosas (3) |
| Ecos hiperecoicos PD | Pocos escasos (1) | Ausente (0) | Ausente (0) | Pocos escasos (1) | Pocos escasos (1) | Pocos escasos (1) |
| Ecos hiperecoicos PI | Ausente (0) | Ausente (0) |
| Ecos hiperecoicos SD | Presente (1) | Presente (1) | Ausente (0) | Presente (1) | Ausente (0) | Ausente (0) |
| Ecos hiperecoicos SI | Presente (1) | Presente (1) | Ausente (0) | Ausente (0) | Presente (1) | Ausente (0) |
| Claridad bordes PD | Bordes definidos (0) | Bordes definidos (0) | Bordes definidos (0) | Bordes definidos (0) | Parcialmente definidos (1) | Bordes definidos (0) |

| | | | | | | |
|---------------------------------|-------------------------|-------------------------|----------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| Claridad bordes PI | Bordes definidos (0) | Bordes definidos (0) | Bordes definidos (0) | Parcialment e definidos (1) | Parcialmente definidos (1) | Parcialment e definidos (1) |
| Claridad bordes SD | Bordes definidos (0) | Bordes definidos (0) | Bordes definidos (0) | Bordes definidos (0) | Parcialmente definidos (1) | Bordes mal definidos (2) |
| Claridad bordes SI | Bordes definidos (0) | Bordes definidos (0) | Bordes definidos (0) | Bordes definidos (0) | Parcialmente definidos (1) | Parcialment e definidos (1) |
| Hocevar (puntos) | 19 | 15 | 17 | 25 | 27 | 25 |
| Doppler incrementado | PD | PD, SD | Ausente | PD, SI | PD | Ausente |

*PD parótida derecha, PI parótida izquierda, SD submandibular derecha, SI submandibular izquierda.

Evaluación Inmunológica de las participantes incluidas en el estudio

De los laboratorios inmunológicos la mediana de Anti- Ro fue de 600 U/mL (3.67- 624.12) y de Anti-La fue de 44.1U/mL (10.57- 630.60). La media de IgA fue de 406.66 ± 190.64 mg/dL con límite superior de 400mg/dL, la media de IgG fue de 1948.33 ± 385.87 mg/dL con límite superior de 1600mg/L y la media de IgM fue de 200.00 ± 109.54 mg/dL con límite superior de 300mg/dL. La media de C3 fue de 111.16 ± 42.07 mg/dL con límite inferior de 60mg/dL y la mediana de C4 fue de 26.50 mg/dL (18.50-162.50) con límite inferior de 60mg/dL. La media de Factor Reumatoide fue de 133.54 ± 103.14 UI/mL. En la tabla 16 se resumen estos resultados y en la tabla 17 las determinaciones de anticuerpos realizados para descartar Síndrome de Sjögren secundario como Anti-DNA doble cadena (ds), anticuerpos contra citoplasma de neutrófilos (ANCA) contra proteinasa 3 (PR3) y mieloperoxidasa (MPO) y anticuerpo anti péptido cíclio citrulinado (Anti-CCP) por cada participante.

Tabla 16. Laboratorios Inmunológicos.

| Inmunológico | Media (DE) / Mediana (IQR) |
|---------------------------------|-----------------------------------|
| Anti-Ro (U/mL) | 600 (3.67-624.12) |
| Anti- La (U/mL) | 44.1 (10.57- 630.60) |
| Factor Reumatoide (U/mL) | 133.54 ± 103.14 |
| IgA (mg/dL) | 406.66 ± 0.95 |
| IgG (mg/dL) | 1948.33 ± 385.87 |
| IgM (mg/dL) | 200 ± 109.54 |
| C3 (mg/dL) | 111.16 ± 42.07 |
| C4 (mg/dL) | 26.5 (18.50-162.50) |

Tabla 17. Determinación de inmunoglobulinas y auto-anticuerpos

| Inmunológico (valores normales) | SSp1 | SSp2 | SSp3 | SSp5 | SSp6 | SSp7 |
|--|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Anti- Ro (SSA) U/mL | 696.49 | 0 | 600 | 600 | 600 | 4.9 |
| Anti- LA (SSB) U/mL | 722.4 | 0 | 14.6 | 600 | 14.1 | 73.6 |
| IgA (70-400) mg/dL | 370 | 170 | 530 | 690 | 440 | 240 |
| IgG (700- 1600) mg/dL | 2210 | 1310 | 2230 | 2290 | 1970 | 1680 |
| IgM (50- 300) mg/dL | 230 | 60 | 110 | 360 | 170 | 270 |

| | | | | | | |
|--|--------|-------|-------|-------|-------|--------|
| C3 (60- 160) mg/dL | 66 | 190 | 110 | 89 | 111 | 101 |
| C4 (60- 60) mg/dL | 130 | 260 | 31 | 11 | 22 | 21 |
| Factor Reumatoide UI/mL | 122.21 | 10.56 | 209.3 | 91.95 | 70.79 | 296.43 |
| Crioglobulinas | + | + | ++ | + | - | +++ |
| Anti-DNAds UI/mL | 1.5 | 1.1 | 0.9 | 2.7 | 1.1 | 3 |
| c-ANCA (PR3) UI/mL | 0.3 | 0.3 | 0.4 | 0 | 0.3 | 0 |
| p-ANCA (MPO) UI/mL | 0.6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.3 |
| Anti-CCP | 1 | 1.5 | 0.8 | 0.7 | 1.6 | 10 |

Expresión de marcadores de membrana en las subpoblaciones de linfocitos T y B

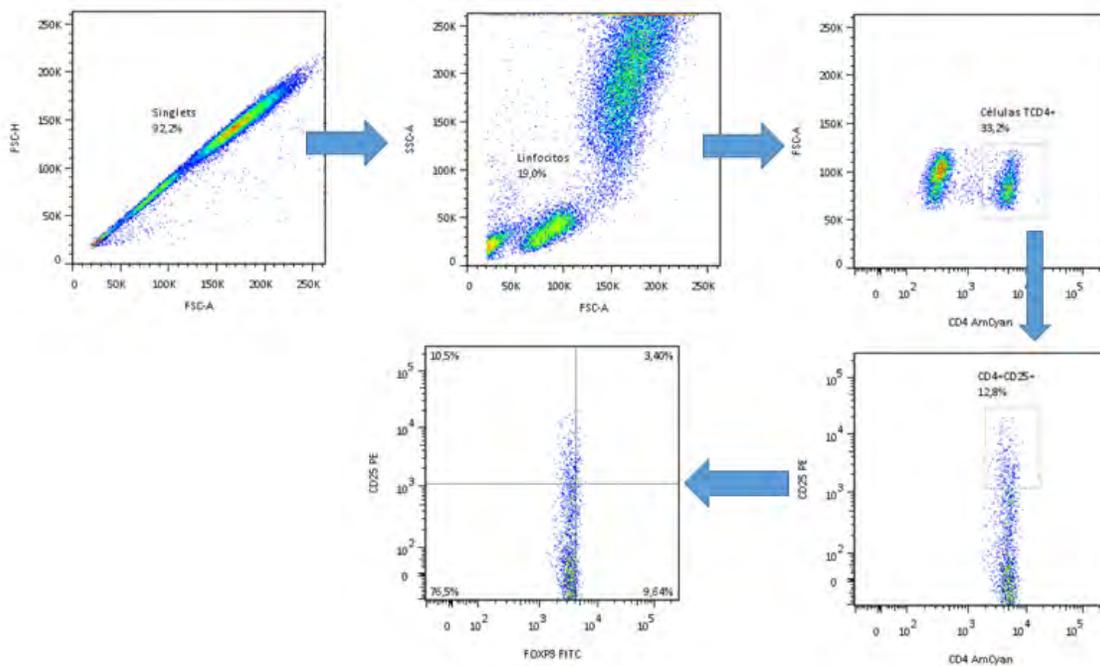
Con la finalidad de conocer el estado de activación en periferia de las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ se determinaron algunos marcadores relacionados con activación en participantes y sanos. La tabla 18 resume estos resultados.

Tabla 18. Caracterización fenotípica de las diferentes poblaciones celulares de linfocitos T y B en SSp

| Subpoblación celular | Pacientes SSp Mediana (IQR) | Sanos Mediana (IQR) | Valor de p |
|-----------------------------|--|--------------------------------|-------------------|
| CD4+ CD25+ | 20.15 (16.45- 26.13) | 14.3 (7.02- 15.4) | 0.04 |
| Treg (CD4+ CD25+ FoxP3+) | 5.22 (2.39- 6.41) | 2.3 (1- 3.5) | 0.04 |
| CD4+ CCR9+ | 4.97 (3.56- 10.88) | 6 (5.97- 6.1) | 0.27 |
| CD4+ CCR10+ | 5.5 (3.86- 6.94) | 4.9 (4.89- 8.96) | 0.5 |
| CD4+ CCR3+ | 1.42 (0- 4.72) | 3.82 (3.7- 4.71) | 0.19 |
| CD4+ CD57+ | 9.9 (3.75- 14.85) | 6.8 (5.18- 13.7) | 0.5 |
| CD19+ CD38Lo | 14.7 (3.72- 55.9) | 46.4 (46- 57) | 0.28 |
| CD19+ CD38Med | 67.5 (29.45- 80.25) | 25 (23- 28.6) | 0.03 |
| CD19+ CD38Hi | 8.79 (6.45- 9.34) | 8.1 (7.27- 8.29) | 0.39 |

Al evaluar la expresión de CD25 en linfocitos T CD4+ encontramos un incremento de 1.6 veces en el porcentaje de células CD4+CD25+ en SSp que en sujetos sanos ($p=0.04$); de la misma manera encontramos un incremento de 2 veces en el porcentaje de células CD4+CD25+FoxP3+ en participantes con SSp, que en sujetos sanos ($p=0.04$) (Ver figura 5) y Tabla 18.

A



B

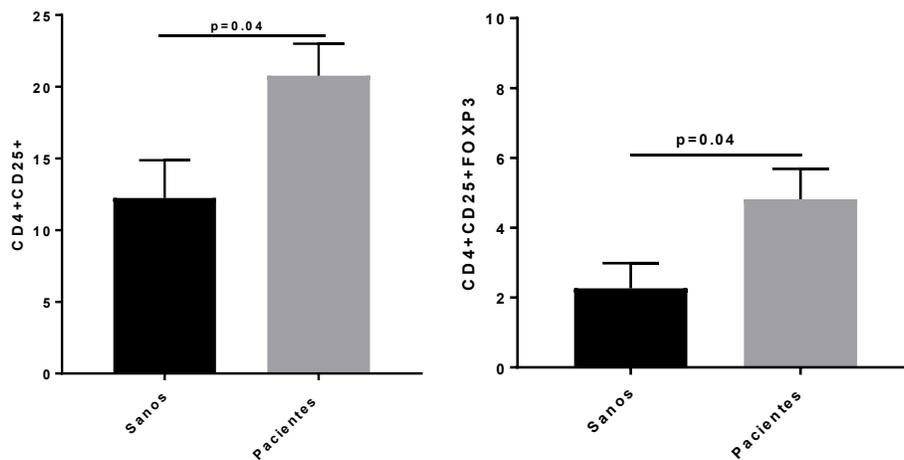
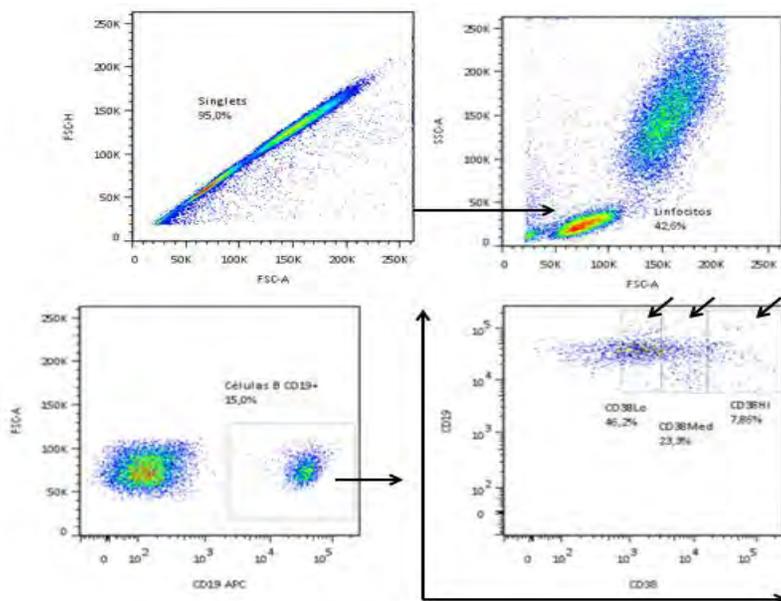


Figura 5. Frecuencia de células CD4+CD25+ y CD4+CD25+FoxP3+ en sangre periférica. En A) Se observa el análisis por citometría de flujo realizado, en B) Se observan los cambios en la frecuencia de células CD4+CD25+ y CD4+CD25+FoxP3+ en pacientes con SSp.

No se observaron diferencias significativas entre los demás subpoblaciones cooperadoras entre sujetos sanos y participantes con SSp en este estudio. La Tabla 18 resume la frecuencia de las distintas poblaciones celulares entre ambos grupos

En el caso de las subpoblaciones de linfocitos B evaluadas en este estudio, se observó un incremento de 2.2 veces en la subpoblación de linfocitos CD19+CD38+Med de SSp, al comparar con sujetos sanos ($p=0.03$) (Ver figura 6). La Tabla 18 resume las frecuencias encontradas para las subpoblaciones de linfocitos CD19+CD38^{lo}, CD19+CD38^{Med} y CD19+CD38^{Hi} en ambos grupos de estudio.

A



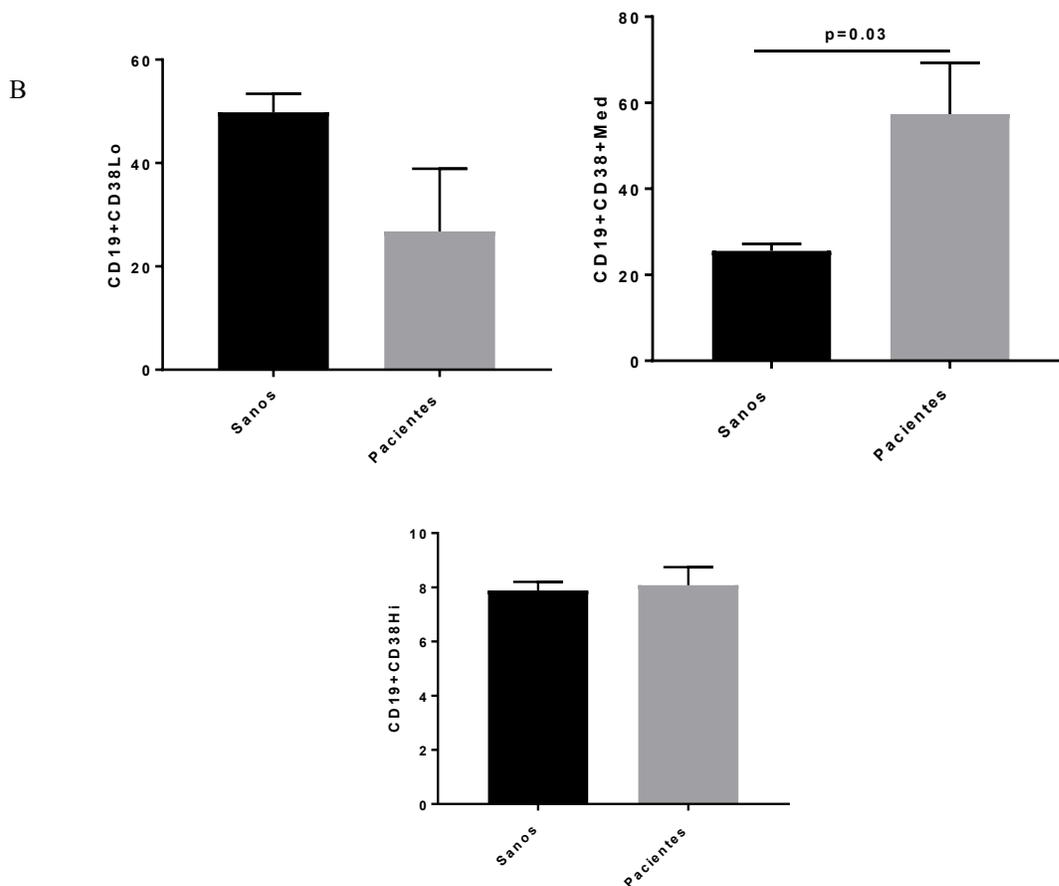


Figura 6. Frecuencia de células CD19+CD38+ Lo/Med/Hi en sangre periférica. En A) Se observa el análisis por citometría de flujo realizado, en B) Se observan los cambios en la frecuencia de células CD19+CD38+Med en pacientes con SSp

Por último, al correlacionar los hallazgos inmunológicos con las diferentes escalas utilizadas en este estudio (ESSDAI y HOCEVAR) sólo se encontraron correlaciones negativas y significativas entre las subpoblaciones CD4+CD25+FOXP3+ ($r=-0.9856$, $p=0.0028$), CD19+CD38+Med ($r=-0.8721$, $p=0.0500$) y la clasificación Hocevar; y positiva y significativa entre la subpoblación CD19+CD38+Lo y la clasificación Hocevar ($r=0.9747$, $p=0.0167$). (Figura 7) No se encontró ninguna otra correlación significativa entre los hallazgos inmunológicos y el ESSDAI o el Hocevar.

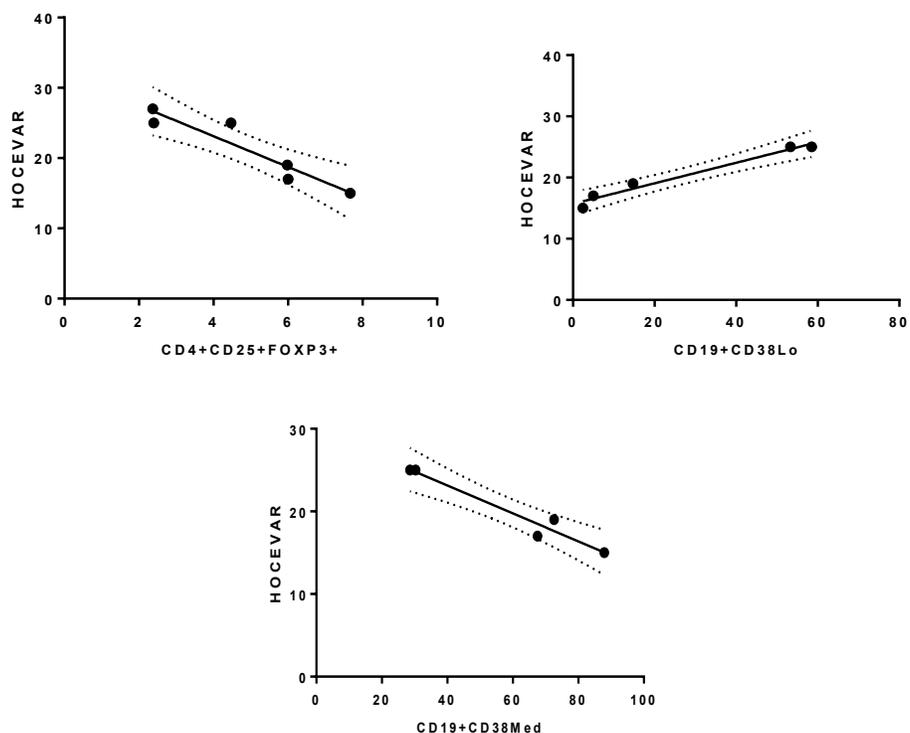


Figura 7. Correlación entre los hallazgos inmunológicos y la escala de Hocevar.

Discusión

El síndrome de Sjögren es una enfermedad sistémica que afecta principalmente a glándulas exocrinas. El SS es más común en el género femenino con un promedio de edad entre 50 y 60 años, ¹ de la muestra de nuestro protocolo todas las participantes fueron de género femenino y la edad media fue de 54.83 años que coincide con lo reportado en la literatura, ¹ la edad media de inicio de los síntomas de SSp fue de 49.33 años. Todas las participantes eran mayores de 50 años excepto una de 34 años.

Existe un retraso en el diagnóstico de 5 a 10 años, ¹ sin embargo el tiempo entre inicio de los síntomas e inicio de fármacos modificadores de la enfermedad (FARME) tuvo una mediana de 0.125 años (mínimo de 0 y un máximo de 12 años), por lo que el retraso en el diagnóstico en nuestra muestra fue menor a lo reportado. Akpek et. al.²⁷ evaluaron retrospectivamente una cohorte de pacientes con ojo seco para evaluar la tasa de SS, de 215 pacientes con diagnóstico de ojo seco encontraron 24 (10.9%) de pacientes con SS primario, de los cuales sólo el 33.3% (8/24) tuvo diagnóstico al momento de la presentación clínica de ojo seco, el 50% (12/24) se diagnosticó SS primario en la primera evaluación por ojo seco y el restante 16.7% (4/24) fueron diagnosticados durante el seguimiento. El 66.6% tuvieron Anti-Ro o Anti-La positivo pero en 16.7% tuvieron anticuerpos antinucleares (ANA) negativos por lo que se confirmó diagnóstico por biopsia de glándula salival menor.

Todas las pacientes tenían síntomas sicca (xeroftalmía y xerostomía), sólo en una paciente a la exploración física se encontró hipertrofia de glándula salival mayor (parótida derecha), que se reporta hasta en el 60% de forma episódica o crónica. ⁷ La principal afección del SS es a nivel oftalmológico (glándulas lacrimales) y oral (glándulas salivales).

En cuanto a la afección oftalmológica, un estudio donde se compararon diferentes grupos de pacientes con ojo seco de diagnósticos bien definidos, se evaluaron a 27 pacientes con SS, encontraron un OSDI con afección moderada/ grave en comparación con controles sanos (N19) con calificación normal ²⁸ en nuestra muestra la afección fue leve/ moderada de acuerdo al OSDI. La media de ruptura de película lacrimal en el estudio fue 4 veces más rápida en el grupo de SS comparado con controles sanos ²⁸ pero fue similar a la encontrada en nuestra muestra. En el mismo estudio midieron la prueba de Schirmer sin anestésico en 5 minutos (tipo I) encontrando mayor afección en el grupo SS siendo casi 4 veces menor en comparación con controles sanos, ²⁸ en comparación con nuestra muestra

la afección fue ligeramente mayor en nuestra muestra casi 5 veces menor en comparación con los controles sanos del estudio mencionado.

También se pueden afectar otras glándulas exocrinas diferentes a la glándulas salivales y lacrimales como glándulas a nivel nasal, faríngeo, bronquial, vaginal, vulvar, dérmico y gástricas;⁸ en nuestra muestra una participante refirió xerostráquea con manifestación principal tos crónica, aunque esta paciente ya tenía el antecedente de fibrosis pulmonar, y otra participante refirió xerosis. La xerosis ha sido reportada desde un 23 hasta un 68% en SS, incluso se han demostrado depósitos de IgG intercelulares en epidermis en dos tercios de los pacientes con SS primario.^{1,8} La paciente que reoportó xerosis también reportó livedo reticularis, en la literatura se reporta fenómeno de Raynaud en 13- 35%¹ pero no hay reportes de livedo reticularis, se considera esta participante debe vigilarse ante un posibilidad de Síndrome de Sjögren secundario o asociado a otra enfermedad autoinmune aún no manifestada.

Se reportan manifestaciones sistémicas en el 20- 40%.¹ Seror et. al.²⁶ determinaron la validez del índice ESSDAI, en 395 pacientes con SSp, de los cuales el 93.6% era de género femenino, con una media de edad de 58 años y mediana de la duración de la enfermedad de 5 años. El 59.2% tenían Anti-Ro positivo en 33.5% Anti-La positivo; un tercio (N 120) nunca había tenido manifestaciones sistémicas, el 39.2% (N 155) tenía historia y el 30.4% (N 120) tenía al momento de la evaluación manifestaciones sistémicas. La mediana de ESSDAI de todos los pacientes (N 395) fue de 2 puntos, en los pacientes sin historia de manifestaciones sistémicas fue de 2, en los pacientes con manifestaciones sistémicas durante evolución previa a su evaluación fue de 2 y en los pacientes con actividad sistémica al momento de la evaluación fue de 8.5 puntos. En nuestra muestra de pacientes se encontró actividad sistémica de acuerdo al ESSDAI en todas las participantes aunque fue detectada por alteraciones en estudios paraclínicos como alteración función renal, proteinuria, hipergammaglobulinemia, crioglobulinemia e hipocomplementemia, sólo en una participante se detectó alteración por exploración física afección

pulmonar que tenía confirmado fibrosis pulmonar por imagen. Una participante tuvo afección de función renal por disminución de la tasa de filtración glomerular además de crecimiento de la parótida derecha ya mencionada. Otra participante tuvo afección renal por proteinuria y una participante tuvo afección hematológica por trombocitopenia. La media de ESSDAI en nuestra muestra fue mayor (7.5 ± 6.74 puntos) al estudio de Seror et. al.²⁶ pero menor al subgrupo con manifestaciones sistémicas al momento de la evaluación de los mismos autores.

La afección pulmonar se ha reportado desde un 43 a 75% de los pacientes con SS, pero afección clínica importante en 9-12%. La afección pulmonar temprana se ha asociado a Anti-Ro e hipergammaglobulinemia, la xerotrquea se ha reportado en 17% de los pacientes con SS pero el 50% tiene antecedente de tos crónica. La enfermedad pulmonar intersticial se ha relacionado con Anti-Ro, género masculino, edad avanzada al diagnóstico además de tabaquismo; los patrones que se han reportado en Tomografía Axial Computada de Alta Resolución (TACAR) son neumonía intersticial inespecífica, neumonía intersticial usual, neumonía organizada criptogénica y quistes o bulas múltiples. El patrón más común reportado en las pruebas de función pulmonar es obstructivo leve más comúnmente de vías aéreas pequeñas (FEF 25- 75%),^{1, 4, 5} en nuestra muestra dos participantes tuvieron patrón obstructivo pero no de vías aéreas pequeñas que ha sido la más frecuentemente reportada en SS por lo que la obstrucción podría no ser secundaria al SS; sin embargo, una de estas participantes ya tenía el antecedente de fibrosis pulmonar por TACAR con disminución de la FVC por lo que cumplió criterios de actividad pulmonar por ESSDAI.

La afección renal tiene una prevalencia de 5% pero existen reportes que hasta un tercio de los pacientes la tienen pero de forma subclínica. La principal manifestación es la acidosis tubular renal que se ha reportado en un 13 hasta un 73% de los pacientes con SS, siendo principalmente acidosis tubular renal distal que se ha asociado a hipergammaglobulinemia. Predominantemente es afección tubular, la nefritis tubulointersticial se presenta hasta en 35- 59% por epitelitis, en biopsias se

ha observado una infiltración linfocítica plasmocitoide difusa o focal intersticial, generalmente con curso benigno. La glomerulonefritis es una manifestación rara que se presenta en 0.4% generalmente los pacientes presentan proteinuria menor a 1gr en 24 horas y se ha relacionado con vasculitis, crioglobulinemia e hipocomplementemia. Una de las pacientes cumplió el criterio de afección renal por ESSDAI por disminución de TFG y la otra por proteinuria, pero ninguna tenía antecedente de otra enfermedad crónica degenerativa. ^{1, 29, 30, 31}

La afección hematológica se han reportado citopenias hasta en un 33% de SS, anemia leve (9- 11gr/dL) se reporta en un 20% de SS generalmente de patrón normocítica normocrómica, sólo en 4% se ha reportado moderada a severa (<9gr/dL). Leucopenia leve (<4000) se ha reportado en 16% de SS pero severa (<2000) en 0.2%, linfopenia (<1000) en 9% y neutropenia (<1500) en 7%. Específicamente linfopenia de LTh (<300) se ha reportado en 5%. La trombocitopenia (<150,000) se ha reportado en 13% de SS aunque moderada (<100,000) en 3% y severa (<50,000) en sólo 0.4%. Se ha asociado con afección renal y presencia de Anti-La, la paciente que tuvo trombocitopenia tenía Anti-La positivo pero no afección renal. ³²

Aproximadamente una 50% del SS desarrollan artritis durante su enfermedad que puede preceder a los síntomas sicca, es común que se asocie a rigidez articular matinal y se puede presentar como una sinovitis intermitente o como una poliartritis crónica; sin embargo, en radiografías simples no tienen cambios erosivos como en Artritis Reumatoide ²⁹, en nuestra muestra todas las pacientes refirieron artralgiás pero ninguna cumplió con este criterio para el ESSDAI porque no estaban acompañadas de rigidez articular matinal, sólo una refirió durante evolución artritis. Una participante tuvo anticuerpos contra péptido cíclico citrulinado (Anti-CCP) positivos a títulos bajos pero no ha tenido durante evolución artritis únicamente artralgiás, aunque este anticuerpo se considera un criterio de clasificación para Artritis Reumatoide no es exclusivo de esta enfermedad, se ha encontrado en otras enfermedades e inclusive en personas sanas. En Síndrome de Sjögren primario se

ha encontrado positivo en 22.1% (media títulos 61.6 ± 15.6 U/mL) que se ha asociado a artritis no erosiva y positividad de Factor Reumatoide y Anti-Ro, sin cumplir criterios de Artritis Reumatoide.³³

Otras manifestaciones descritas en SS que no se presentaron en nuestra muestra son afección a sistema nervioso central (trastornos similares a esclerosis múltiple, mielopatía, mielonolisis pontina, parkinsonismo, neuritis óptica, mielitis transversa, vasculitis, entre otros), neuropatía periférica (sensorial), neuropatía autonómica, pérdida de audición neurosensorial, alteraciones cognitivas y del ánimo, miositis subclínica, afección gastrointestinal (dismotilidad severa, afección exócrina páncrea e hígado, entre otras). Las manifestaciones sistémicas se presentan en un tercio de los pacientes con SS y éstas pueden variar en cada paciente, por lo que su ausencia en nuestra muestra puede ser por el tamaño de la misma.¹

En Síndrome de Sjögren existe una disregulación de LB, demostrada por presencia de autoanticuerpos principalmente Anti-Ro (SSA) y Anti-La (SSB), hipergammaglobulinemia y crioglobulinemia que se encontraron todos positivos en 83.33% de las participantes, además de elevación de Factor Reumatoide, una IgM contra la porción Fc de IgG. La hipergammaglobulinemia fue mayor de IgG en comparación con el resto de las inmunoglobulinas analizadas (IgA e IgM), se ha reportado que la IgG tiene una elevación mayor en las fases más tempranas del SS comparado con fases más tardías.⁷ Aunque en nuestra muestra no se presentaron manifestaciones sistémicas asociadas a inmunocomplejos, a hipergammaglobulinemia, niveles elevados de Factor Reumatoide, Anti-Ro e hipocomplementemia se ha asociado a manifestaciones mediadas por inmunocomplejos como vasculitis cutánea, glomerulonefritis y neuropatía periférica.^{1, 8}

La mayoría de las pruebas de imagen (sialografía, cintillografía) para la evaluación de la afección de glándulas salivales son invasivas, caras y de poca accesibilidad, por lo que el ultrasonido (US) de glándulas salivales mayores representa una

alternativa de fácil acceso, no costosa y no invasiva que incluso se ha propuesto sea incluido en los criterios de clasificación del SS. Se considera que la heterogeneidad del parénquima de la glándula salival mayor por US en escala de grises equivale a afección clínica de la misma en SS, esta heterogeneidad está demostrada por áreas hipoeoicas, ecos hiperecoicos e incluso áreas anecoicas que asemejan un panal de abeja. Este criterio de heterogeneidad ha demostrado una sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de SS de 63.1 y 96.1% respectivamente. Sin embargo, la ausencia de heterogeneidad de la glándula tampoco excluye el diagnóstico de SS. El tamaño de la glándula salival medida por US puede variar de acuerdo con la edad, peso y superficie corporal por lo que no se considera un criterio diagnóstico; sin embargo, se ha demostrado un menor tamaño de glándulas salivales con heterogeneidad en pacientes con SS en comparación con controles sanos. También el US ha demostrado similar sensibilidad para el diagnóstico de SS en comparación con sialografía y cintilografía (75.3%, 72.7% y 70.1% respectivamente) con especificidad igualmente comparable (83.4%, 84.9% y 82.3% respectivamente). Incluso se ha llegado a considerar al US como una alternativa a la biopsia de glándula salival menor ya que se ha demostrado una correlación alta entre ambos. Sin embargo, el considerar la heterogeneidad de la glándula como único criterio diagnóstico puede producir falsos positivos por lo que se debe hacer una correlación con los hallazgos clínicos e inmunológicos para confirmar el diagnóstico de SS. El US representa una herramienta más para el diagnóstico y la evaluación en SS.³⁴ La escala ultrasonográfica de Hocevar que empleamos fue realizada evaluando a 218 pacientes con sospecha de SS, de los cuales 68 cumplieron los criterios de clasificación de SS y el resto se tomó como grupo control (N150), 40/68 pacientes con SS tuvieron una calificación de la escala ≥ 17 puntos que se consideró como punto de corte para comparar a los pacientes con SS con el grupo control, en los 28 pacientes con SS que tuvieron una calificación menor se consideró la causa de esto fue un estado más temprano de la enfermedad ya que tenían una calificación de focos por biopsia menor, prevalencia menor de positividad de ANA, Anti-Ro y Anti-La y menor afección oftalmológica. La escala ultrasonográfica de Hocevar

demonstró una sensibilidad y especificidad de 58.8 y 98.7% respectivamente para el diagnóstico de SS. Posteriormente se evaluó esta misma escala en la práctica clínica con un valor predictivo positivo de 95.2% y negativo de 84% para el diagnóstico de SS.²⁵ En nuestra muestra de participantes la media de la escala US de Hocevar fue de 21.33 \pm 4.96 puntos, confirmando el diagnóstico de SS, consideramos el ultrasonido demostró ser un método de imagen útil, de bajo costo, no invasivo.

En cuanto al inmunofenotipo se encontró un incremento significativo en comparación con controles sanos de 1.6 veces de LT activados (CD4+CD25+), un incremento 2 veces de LT reguladores. Christodoulou et. al.³⁵ encontraron que los niveles de LT reguladores (CD4+FoxP3+) periféricos fueron similares en pacientes con SS y controles sanos, encontraron una distribución inversa al comparar los LT reguladores periféricos con los infiltrantes en glándulas salival mayor. Furuzawa-Carballeda et. al.²¹ no encontraron diferencia significativa entre los LT reguladores de pacientes con SS primario y controles sanos. Szodoray et. al.³⁶ encontraron niveles menores de LT reguladores CD4+CD25+ en comparación con controles sanos. En cambio Gottenberg et. al.³⁷ al igual que nosotros encontraron niveles más altos significativamente en pacientes con SS en comparación con controles de LT reguladores (CD4+CD25high). Como ya se había mencionado los hallazgos de LT reguladores a nivel periférico han sido contradictorios, en general los LT reguladores se encuentran infiltrando glándula en etapas tempranas pero en etapas avanzadas del infiltrado se encuentran disminuidos, por lo que suponemos a nivel sérico en etapas tempranas podría estar disminuido por infiltración glandular y en etapas más avanzadas aumentado ya que ha disminuido en el infiltrado glandular.

También se encontró un incremento significativo en comparación con controles sanos de 2.2 veces de LB transicionales (CD19+CD38Med). Binard et. al.³⁸ encontraron nivel más elevado de LB Bm2 (IgD+, CD38+) y Bm2'(IgD+, CD38++) en SS primario en comparación con controles sanos y con pacientes con Artritis Reumatoide y Lupus. Cornec et. al.³⁹ también encontraron un incremento

significativo de LB Bm2 y BM2' en SS primario en comparación con controles con ojo seco por otras causas.

Se encontró una correlación negativa con: LT reguladores (CD4+CD25+FOXP3) y la escala de Hocevar; entre mayor sea la puntuación e la escala de Hocevar mayor al afección a glándulas salivales por lo que los niveles de LT reguladores a nivel periférico son menores entre mayor puntuación de Hocevar.

Igualmente se encontró una correlación negativa con LB transicionales (CD19+CD38med) y la escala de Hocevar, igualmente los LB transicionales son menores a nivel periférico a medida de que mayor daño a nivel de glándula salival (mayor puntuación de Hocevar) probablemente porque migren a nivel glandular, los LB transicionales son estadios tempranos en el desarrollo de LB que se escapan de médula ósea para unirse a órganos linfoides secundarios.⁴⁰

Se encontró una correlación positiva con LB precursores (CD19+CD38lo) y la escala de Hocevar, los LB precursores se encuentran disminuidos a nivel periférico cuando la afección glandular es menor (menor puntuación de la escala de Hocevar) y viceversa; en etapas tardías (mayor daño glandular) el infiltrado está conformado por LB activados y células plasmáticas por lo que a nivel periférico se encuentra disminuidos los LB de memoria, suponemos que es entonces cuando los precursores de LB se encuentran aumentados a nivel periférico.

Conclusiones

Los LT activados y reguladores y LB transicionales a nivel periférico se encontraron elevados en las participantes evaluadas con SSp en comparación con controles sanos ya que el tiempo de evolución (determinado por inicio de síntomas sicca) tuvo una mediana de 4 años por lo que se podría considerar una muestra aún en etapas tempranas. Las únicas correlaciones significativas se

encontraron con la escala de Hocevar lo que confirma su utilidad como método diagnóstico de imagen alternativo para evaluar la eficacia de la afección glandular salival. Tuvo una correlación negativa con los LT reguladores y los LB transicionales ya que a mayor afección glandular se consideran éstos están reducidos a nivel periférico por su infiltración a nivel glandular y tuvo una correlación positiva con LB precursores ya que en etapas tardías principalmente los LB de memoria infiltran la glándula por lo que los precursores se elevan a nivel periférico.

Perspectivas

Se planea continuar con el proyecto para ampliar el número de muestra, así como realizar análisis de citocinas a nivel periférico, lacrimal y salival para hacer correlaciones con el inmunofenotipo encontrado. Así como un análisis por inumohistoquímica de las biopsias de glándula salival menor para determinar el inmunofenotipo del infiltrado para soportar las teorías de migración de las células.

Anexo 1.

CONSENTIMIENTO INFORMADO
Versión 2

Título protocolo **“Caracterización inmunofenotípica de linfocitos T y B en pacientes con Síndrome de Sjögren primario: correlación clínico-inmunológica”**

Este documento fue revisado y aprobado por el Comité de Ética del Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana. Número de Registro protocolo COFEPRIS 13 CEI 09 015 095

Identificación del PARTICIPANTE (llenado por el médico)

Iniciales del participante (con mayúsculas): _____

Número de Identificación del participante: _____

Edad del participante ____ años

Identificación del Médico del Estudio

Nombre del investigador principal: Erika María Vera Pérez

Sitio de Investigación: Unidad de Investigación del Instituto de Oftalmología Fundación de Asistencia Privada Conde de Valenciana IAP.

Domicilio: Chimalpopoca No. 14, Col. Obrera, Del. Cuauhtémoc, C. P. 06800, México D. F. Tel. 5442-1700 Ext. 3725.

Lo estamos invitando a participar en un estudio de investigación que busca caracterizar las células de defensa en relación a su enfermedad (Síndrome de Sjögren), usted está siendo invitado a participar en el estudio porque tiene diagnóstico de Síndrome de Sjögren primario o secundario asociado a Artritis Reumatoide. Antes de que decida participar, usted debe entender por qué se está realizando este estudio, qué va a involucrar y cuáles son los riesgos y beneficios asociados. La información que se proporciona a continuación, le ayudará a tomar una decisión informada. Por favor tome su tiempo para leerla cuidadosamente y realizar todas las preguntas que surjan.

Este documento también le informará sobre cómo se utilizará su expediente médico y quién podrá tener acceso a él. Una vez que haya leído el documento y se le hayan aclarado todas sus dudas, se le pedirá que lo firme si decide participar en el estudio. De igual forma, se le entregará un original de este documento.

¿QUÉ ESTUDIO SE VA A REALIZAR Y POR QUÉ?

NOMBRE DEL ESTUDIO: “Caracterización inmunofenotípica de linfocitos T y B en

pacientes con Síndrome de Sjögren primario. Correlación clínico-inmunológica.”

¿QUÉ ES EL SÍNDROME DE SJÖGREN?

El Síndrome de Sjögren (SS) es una enfermedad autoinmune sistémica, en la que sus defensas atacan a su cuerpo, principalmente a sus glándulas que producen saliva y lágrimas por lo que las principales manifestaciones clínicas son resequedad de boca y ojos, pero pueden afectarse otras glándulas como las de la piel que pueden producir resequedad de piel y otros órganos o sistemas como las articulaciones que pueden producir dolor y ocasionalmente inflamación articular, existen otras manifestaciones poco frecuentes que pueden ocurrir en el pulmón, el riñón, la piel, los nervios, etcétera.

¿CUÁL ES EL OBJETIVO DE ESTE ESTUDIO?

Queremos evaluar el tipo de células y sus subtipos que están alteradas en su enfermedad (Síndrome de Sjögren) y relacionarlas con las manifestaciones a nivel de los ojos, la boca y sistémicas (otros órganos de su cuerpo) y compararlas con participantes sin la enfermedad.

¿CÓMO PODRÁ SER ELEGIDO EL PARTICIPANTE?

Antes de poder ser incluido en esta investigación, se le deberá realizar lo siguiente a cada participante:

1. Historial médico y de medicamentos para confirmar:
 - Diagnóstico de Síndrome de Sjögren primario (sin asociación a otras enfermedades autoinmunes) o secundario asociada a Artritis Reumatoide.
 - No tener antecedente de radioterapia previa de cabeza y cuello, infección viral con Hepatitis C o virus de la inmunodeficiencia humana conocida, uso de medicamentos colinérgicos (si tiene duda el médico del estudio le dirá si usa alguno), linfoma, enfermedad de injerto contra huésped, sarcoidosis o enfermedad relacionada con IgG4 (si tiene dudas el médico del estudio le explicará si usted tiene o no alguna de estas enfermedades de acuerdo a su valoración clínica).
2. Ser mayor de 18 años.
3. Aceptar y firmar este documento, al firmar este procedimiento usted autoriza realizar todas las pruebas que son mencionadas en el documento.

Una vez realizados estos pasos y en caso de haber cumplido con estos criterios usted podrá ser incluido en el estudio.

¿EN QUÉ CONSISTE EL ESTUDIO?

A los participantes que cumplan los criterios para ser incluidos en el estudio, se les realizará lo siguiente:

1. Interrogatorio y exploración física para integrar su expediente.
2. Se le tomarán muestras de sangre para medir células de defensa que podrían estar alteradas en su enfermedad llamadas linfocitos T y linfocitos B, usando

marcadores especiales se determinará el inmunofenotipo (tipo de células inmunes que son) que incluirán: inmunofenotipo de LT CD4+ circulantes y posterior estimulación policlonal e inmunofenotipo de LB periféricos y posterior a estimulación policlonal (la estimulación policlonal se realizará en el laboratorio a sus células, no se hará en usted).

- Además se le medirán sustancias que determinan el tipo de respuesta de su sistema inmunológico (defensa) en sangre y lágrimas que incluirán: interleucina séricas, sobrenadante de cultivo y lacrimales Th1/ Th2/ TH17 (IL-2, IL-4, IL- 6, IL-10, IL-17A, TNF, IFN- gamma).

3. Evaluación del estado clínico de su enfermedad a nivel oftálmico usando:

- Tinción superficie ocular con fluoresceína y/o rosa de bengala: se usa una tinción que no le causará daño para ver si existe daño de su superficie del ojo, después de aplicarle el tinte será evaluado con una lámpara especial.
- Prueba de Schirmer I y II: se usará una tira de papel que se colocará en contacto con la superficie de su ojo durante 5 minutos para medir la función de las glándulas que producen lágrimas.
- Citología de impresión: se usará un filtro que se colocará en contacto de su ojo que posteriormente será teñido y evaluado para determinar si tiene alteración de las células de la superficie de su ojo.
- Se le realizará una exploración de su ojo completa, incluida agudeza visual.
- Se medirá la altura de su menisco lacrimal: se medirá la altura de la su río lacrimal para valorar la cantidad de lágrima que produce.

4. Evaluación del estado clínico de su enfermedad a nivel oral usando:

- Flujo salival no estimulado: se medirá la cantidad de saliva que produce en 15 minutos sin estimulación usando un tubo que extraerá su saliva.
- Biopsia de glándula salival menor: se le realizará biopsia de una glándula salival menor ubicada en la parte interna de su mucosa de la boca del labio inferior, se le aplicará anestesia local en la zona donde se realizará la biopsia, se le hará una incisión (corte) superficial de aproximadamente 1cm de longitud en la mucosa de su boca, se extraerán una a tres glándulas salivales menores a través de esta incisión usando pinzas. La incisión no requiere sutura (cierre de la herida), se dejará cicatrizar sola. Los riesgos de la biopsia de glándula salival menor son hemorragia, infección, dolor, limitación para comer irritantes por 5 días a 2 semanas después de la biopsia. Deberá mantener aseo oral frecuente para evitar complicaciones infecciosas hasta la cicatrización de la incisión, así mismo evitar comer comida irritante como limón, cítricos, chile u otros hasta la cicatrización de su incisión.

La biopsia sirve para ver el grado de afección de sus glándulas por las células de su sistema inmunológico (defensa) que migran a ellas y las destruyen.

La biopsia se realizará en el consultorio y no requiere hospitalización como un procedimiento ambulatorio.

- Ultrasonido de glándulas salivales mayores: se le realizará estudio de ultrasonido de sus glándulas salivales llamadas parótidas y submandibulares. El ultrasonido no emite radiación y no le predispone a algún daño, el ultrasonido se realizará en el Laboratorio de Ultrasonido Musculoquelético y Articular del Instituto Nacional de Rehabilitación, se le concertará una cita a la cual deberá acudir, en caso de no poder se le solicitará avisar para reagendar su cita.
5. Evaluación de su estado clínico sistémico usando:
- Se le realizará exploración física completa con el objetivo de detectar manifestaciones en otras partes de su cuerpo aparte de sus glándulas salivales y lacrimales, de encontrarse datos clínicos de afección en algún órgano o sistema de su cuerpo se le harán pruebas especializadas para descartar o confirmar y documentar esto.
 - Se le realizarán laboratorios generales de sangre que incluirán Biometría hemática, Química Sanguínea de 6 elementos, Examen General de Orina, Proteína C Reactiva y Velocidad de Sedimentación Globular. Además de anticuerpos y pruebas especiales para valorar su enfermedad que incluirán Anticuerpos Antinucleares, Anti-Ro, Anti-La, Factor Reumatoide, complemento C3 y C4, Crioglobulinas, Inmunoglobulinas IgA, IgG, IgM e IgE, subtipos IgG 1 al 4.
 - Se le realizará espirometría que es un estudio para ver cómo funcionan sus pulmones que no le producirá ningún daño, usted sólo tendrá que espirar (sacar aire) a través de una boquilla conectada a un aparato que mide su función pulmonar.

Sus muestras podrían ser almacenadas y usadas para investigaciones futuras si usted acepta.

¿CUÁLES SON LOS RIESGOS DE PARTICIPAR EN EL ESTUDIO?

Los riesgos de la biopsia de glándula salival menor, como ya fueron mencionados, son hemorragia, infección, dolor, limitación para comer irritantes por 5 días a 2 semanas después de la biopsia. Deberá mantener aseo oral (lavarse con pasta de dientes y agua) frecuente para evitar complicaciones infecciosas hasta la cicatrización de la incisión, así mismo evitar comer comida irritante como limón, cítricos, chile u otros hasta la cicatrización de su incisión.

Las muestras de sangre para las pruebas mencionadas anteriormente se obtendrán mediante punción de una vena de su brazo, se le extraerán de 10- 15ml (2-3 cucharaditas) aproximadamente de sangre, los principales riesgos de las muestras de sangre son dolor en el sitio de punción, hemorragia, formación de hematoma (moretón o colección de sangre), desmayos, y en casos muy raros infección o lesión de estructuras cercanas como nervios.

¿CUÁLES SON LOS POSIBLES BENEFICIOS AL PARTICIPAR EN ESTE ESTUDIO?

Participar en este estudio tiene los siguientes posibles beneficios: las valoraciones médicas y los estudios realizados no tendrán ningún costo para usted. Todos los resultados se le darán a conocer si usted lo solicita.

Además usted podrá contribuir en los avances del conocimiento médico acerca de la causa de su enfermedad que podría ayudar en un futuro a otros pacientes y podría contribuir en el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico, tratamiento y seguimiento de su enfermedad.

En caso de que durante su valoración se determine que es necesario hacer estudios complementarios que no están descritos en este documento (consentimiento informado), éstos serán solicitados para ser realizados fuera del Instituto de Oftalmología, pero usted deberá cubrir su costo ya que no tienen relación con este protocolo y son parte de su seguimiento clínico.

Usted no recibirá ningún pago por participar en el estudio.

¿TENGO QUE PARTICIPAR EN ESTE ESTUDIO? ¿CUÁLES SON LAS ALTERNATIVAS?

La participación en este estudio es completamente **voluntaria**. Si por alguna razón usted se negara a participar en él, esto no tendría ninguna repercusión en su atención brindada en el Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana. Usted tendrá el derecho de recibir el tratamiento habitual que se brinda en Instituto. En caso de participar y de juzgarlo necesario, podría retirarse del estudio en el momento que lo desee y sin repercusión en su seguimiento futuro.

¿CÓMO SERÁ GUARDADA LA INFORMACIÓN? ¿TENDRÉ ACCESO A ELLA?

La información que se obtenga será **estrictamente confidencial y anónima**, es decir sus datos serán guardados de manera que sólo el personal del estudio de investigación y personal autorizado tendrá acceso a ella y no se vincularán sus datos ni se le identificará personalmente en caso de que los resultados de la investigación sean publicados en congresos, cursos o revistas científicas. Su información será utilizada exclusivamente para fines de investigación. Como ya se mencionó, los resultados se le darán a conocer si usted lo solicita.

¿QUÉ SUCEDE SI SURGE ALGUNA DUDA?

Cualquier duda adicional que surja en el futuro será oportunamente aclarada. En caso de dudas favor de comunicarse con la Dra. Erika María Vera Pérez, investigador principal, o con el Dr. Marco Polo Peralta Álvarez al teléfono: **5442-1700 Ext. 3725**, los días martes de 15:30hrs a 18:00hrs con la Dra Vera y de lunes a Viernes de 08:00 a 13:00hrs con el Dr. Peralta.

Si tiene dudas sobre sus derechos como participante de un estudio de investigación podrá comunicarse con el Dr. Yonathan Garfias Becerra, presidente del Comité de Ética del Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana al teléfono: **5442-1700 Ext. 3212**.

AL FIRMAR A CONTINUACIÓN USTED DECLARA QUE:

1. He leído cuidadosamente (o me han leído mi representante legal) y he entendido el consentimiento informado.
2. Se me ha brindado información clara y tiempo suficiente para leer el consentimiento informado y aclarado todas mis dudas.
3. Mi participación es voluntaria y entiendo que soy libre de retirarme del estudio en cualquier momento que lo decida.
4. No he sido sometido a ningún tipo de presión para participar en el estudio.
5. Libremente otorgo mi consentimiento para participar en este estudio.
6. Es de mi conocimiento que acudiré a valoraciones médicas en el Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana y a valoración ultrasonográfica al Instituto Nacional de Rehabilitación.
7. Entiendo que la atención médica y los estudios clínicos que forman parte del protocolo especificados en esta forma de consentimiento informado durante el estudio serán de manera gratuita.
8. Entiendo que con mi firma o huella dactilar en este documento, autorizo al médico del estudio a realizarme biopsia de glándula salival menor y resto de procedimiento que se describen en este documento.
9. Confirmando que he recibido un original de este documento firmado y fechado y el otro original es resguardado por el médico del estudio.

Muestras para investigaciones futuras (opcional):

Aceptó mis muestras sean almacenadas para investigaciones futuras:

Sí _____ No _____

Nombre del participante: _____

Firma _____

Fecha _____ Hora: _____

Representante legal o tutor del paciente (Sí aplica).

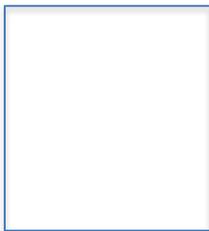
Nombre _____

Firma _____

Fecha _____ Hora: _____

Relación con el paciente: _____

Huella digital del dedo índice derecho (en caso de no saber leer y escribir u otra situación que lo amerite)



Persona que conduce proceso de consentimiento informado:

Nombre de quien obtiene el consentimiento: _____

Firma _____

Fecha _____ Hora: _____

Testigo 1:

Nombre _____

Firma _____

Fecha _____ Hora: _____

Relación con el paciente: _____

Dirección _____

Testigo 2:

Nombre _____

Firma _____

Fecha _____ Hora: _____

Relación con el paciente: _____

Dirección _____

**CONSENTIMIENTO INFORMADO
VOLUNTARIOS SIN SÍNDROME DE SJÖGREN**

Título protocolo “Caracterización inmunofenotípica de linfocitos T y B en pacientes con Síndrome de Sjögren primario: correlación clínico-inmunológica”

Este documento fue revisado y aprobado por el Comité de Ética del Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana. Número de Registro protocolo COFEPRIS 13 CEI 09 015 095

Identificación del PARTICIPANTE (llenado por el médico)

Iniciales del participante (con mayúsculas): _____

Número de Identificación del participante: _____

Edad del participante ____ años

Identificación del Médico del Estudio

Nombre del investigador principal: Erika María Vera Pérez

Sitio de Investigación: Unidad de Investigación del Instituto de Oftalmología Fundación de Asistencia Privada Conde de Valenciana IAP.

Domicilio: Chimalpopoca No. 14, Col. Obrera, Del. Cuauhtémoc, C. P. 06800, México D. F. Tel. 5442-1700 Ext. 3725.

Lo estamos invitando a participar en un estudio de investigación que busca caracterizar las células de defensa en relación a una enfermedad llamada Síndrome de Sjögren, usted está siendo invitado a participar en el estudio porque no tiene diagnóstico de Síndrome de Sjögren primario o secundario (más adelante se le explica que es esta enfermedad) ni otra enfermedad autoinmune (cuando las defensas atacan al propio cuerpo), alérgica (como Rinitis Alérgica, Asma, Conjuntivitis Alérgicas, etcétera) u otra que podría alterar su sistema inmunológico (defensa) a criterio del investigador. Antes de que decida participar, usted debe entender por qué se está realizando este estudio, qué va a involucrar y cuáles son los riesgos y beneficios asociados. La información que se proporciona a continuación, le ayudará a tomar una decisión informada. Por favor tome su tiempo para leerla cuidadosamente y realizar todas las preguntas que surjan. Este documento también le informará sobre cómo se utilizará su expediente médico y quién podrá tener acceso a él. Una vez que haya leído el documento y se le hayan aclarado todas sus dudas, se le pedirá que lo firme si decide participar en el estudio. De igual forma, se le entregará un original de este documento.

¿QUÉ ESTUDIO SE VA A REALIZAR Y POR QUÉ?

NOMBRE DEL ESTUDIO: “Caracterización inmunofenotípica de linfocitos T y B en pacientes con Síndrome de Sjögren primario. Correlación clínico-inmunológica.”

¿QUÉ ES EL SÍNDROME DE SJÖGREN?

El Síndrome de Sjögren (SS) es una enfermedad autoinmune sistémica, en la que sus defensas atacan a su cuerpo, principalmente a sus glándulas que producen saliva y lágrimas por lo que las principales manifestaciones clínicas son resequedad de boca y ojos, pero pueden afectarse otras glándulas como las de la piel que pueden producir resequedad de piel y otros órganos o sistemas como las articulaciones que pueden producir dolor y ocasionalmente inflamación articular, existen otras manifestaciones poco frecuentes que pueden ocurrir en el pulmón, el riñón, la piel, los nervios, etcétera.

¿CUÁL ES EL OBJETIVO DE ESTE ESTUDIO?

Queremos evaluar el tipo de células y sus subtipos que están alteradas en la enfermedad Síndrome de Sjögren y relacionarlas con las manifestaciones a nivel de los ojos, la boca y sistémicas (otros órganos del cuerpo) y compararlas con participantes sin la enfermedad como usted.

¿CÓMO PODRÁ SER ELEGIDO EL PARTICIPANTE?

Antes de poder ser incluido en esta investigación, se le deberá realizar lo siguiente a cada participante:

4. Historial médico para confirmar:
 - No tiene diagnóstico de Síndrome de Sjögren primario (sin asociación a otras enfermedades autoinmunes) o secundario (si tiene dudas pregunta al médico del estudio).
 - No tiene diagnóstico de alguna enfermedad autoinmune como Artritis Reumatoide, Lupus Eritematoso Sistémico, Enfermedad Inflamatoria Intestinal, Esclerosis Múltiple, Esclerosis Sistémica, Espondiloartritis, etcétera (si tiene dudas pregunta al médico del estudio).
 - No tiene diagnóstico de alguna enfermedad alérgica como Rinitis Alérgica, Asma, Conjuntivitis Alérgica, etcétera (si tiene dudas pregunta al médico del estudio).
 - No tiene diagnóstico de alguna otra enfermedad en la que podría estar alterado su sistema inmunológico (defensa) a criterio del investigador como vitíligo, alopecia, etcétera (si tiene dudas pregunta al médico del estudio).
 - No estar tomando medicamentos inmunosupresores (que bajan sus defensas) por cualquier causa.
5. Ser mayor de 18 años.
6. Aceptar y firmar este documento, al firmar este procedimiento usted autoriza realizar todas las pruebas que son mencionadas en el documento.

Una vez realizados estos pasos y en caso de haber cumplido con estos criterios usted podrá ser incluido en el estudio.

¿EN QUÉ CONSISTE EL ESTUDIO?

A los participantes que cumplan los criterios para ser incluidos en el estudio, se les realizará lo siguiente:

1. Interrogatorio y exploración física para integrar su expediente.
2. Se le tomarán muestras de sangre para medir células de defensa que podrían estar alteradas en el Síndrome de Sjögren llamadas linfocitos T y linfocitos B, usando marcadores especiales se determinará el inmunofenotipo (tipo de células inmunes que son) que incluirán: inmunofenotipo de LT CD4+ circulantes y posterior estimulación policlonal e inmunofenotipo de LB periféricos y posterior a estimulación policlonal (la estimulación policlonal se realizará en el laboratorio a sus células, no se hará en usted).
 - Además se le medirán sustancias que determinan el tipo de respuesta de su sistema inmunológico (defensa) en sangre y lágrimas que incluirán: interleucina séricas, sobrenadante de cultivo y lacrimales Th1/ Th2/ TH17 (IL-2, IL-4, IL- 6, IL-10, IL-17A, TNF, IFN- gamma).

Sus muestras podrían ser almacenadas y usadas para investigaciones futuras si usted acepta.

¿CUÁLES SON LOS RIESGOS DE PARTICIPAR EN EL ESTUDIO?

Las muestras de sangre para las pruebas mencionadas anteriormente se obtendrán mediante punción de una vena de su brazo, se le extraerán de 5-10 mililitros (1-2 cucharaditas) aproximadamente de sangre, los principales riesgos de las muestras de sangre son dolor en el sitio de punción, hemorragia, formación de hematoma (moretón o colección de sangre), desmayos, y en casos muy raros infección o lesión de estructuras cercanas como nervios.

¿CUÁLES SON LOS POSIBLES BENEFICIOS AL PARTICIPAR EN ESTE ESTUDIO?

Participar en este estudio tiene los siguientes posibles beneficios: los estudios realizados no tendrán ningún costo para usted. Todos los resultados se le darán a conocer si usted lo solicita.

Además usted podrá contribuir en los avances del conocimiento médico acerca de la causa del Síndrome de Sjögren que podría ayudar en un futuro a otros pacientes y podría contribuir en el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico, tratamiento y seguimiento de esta enfermedad.

Usted no recibirá ningún pago por participar en el estudio.

¿TENGO QUE PARTICIPAR EN ESTE ESTUDIO? ¿CUÁLES SON LAS ALTERNATIVAS?

La participación en este estudio es completamente **voluntaria**. Si por alguna razón usted se negara a participar en él, esto no tendría ninguna repercusión en su atención brindada en el Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana. Usted tendrá el derecho de recibir el tratamiento habitual que se brinda en Instituto. En caso de participar y de juzgarlo necesario, podría retirarse del estudio en el momento que lo desee y sin repercusión en su seguimiento futuro.

¿CÓMO SERÁ GUARDADA LA INFORMACIÓN? ¿TENDRÉ ACCESO A ELLA?

La información que se obtenga será **estrictamente confidencial y anónima**, es decir sus datos serán guardados de manera que sólo el personal del estudio de investigación y personal autorizado tendrá acceso a ella y no se vincularán sus datos ni se le identificará personalmente en caso de que los resultados de la investigación sean publicados en congresos, cursos o revistas científicas. Su información será utilizada exclusivamente para fines de investigación. Como ya se mencionó, los resultados se le darán a conocer si usted lo solicita.

¿QUÉ SUCEDE SI SURGE ALGUNA DUDA?

Cualquier duda adicional que surja en el futuro será oportunamente aclarada. En caso de dudas favor de comunicarse con la Dra. Erika María Vera Pérez, investigador principal, o con el Dr. Marco Polo Peralta Álvarez al teléfono: **5442-1700 Ext. 3725**, los días martes de 15:30hrs a 18:00hrs con la Dra Vera y de lunes a Viernes de 08:00 a 13:00hrs con el Dr. Peralta.

Si tiene dudas sobre sus derechos como participante de un estudio de investigación podrá comunicarse con el Dr. Yonathan Garfias Becerra, presidente del Comité de Ética del Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana al teléfono: **5442-1700 Ext. 3212**.

AL FIRMAR A CONTINUACIÓN USTED DECLARA QUE:

1. He leído cuidadosamente (o me han leído mi representante legal) y he entendido el consentimiento informado.
2. Se me ha brindado información clara y tiempo suficiente para leer el consentimiento informado y aclarado todas mis dudas.
3. Mi participación es voluntaria y entiendo que soy libre de retirarme del estudio en cualquier momento que lo decida.
4. No he sido sometido a ningún tipo de presión para participar en el estudio.
5. Libremente otorgo mi consentimiento para participar en este estudio.
6. Es de mi conocimiento que acudiré a valoraciones médicas en el Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana y a valoración ultrasonográfica al Instituto Nacional de Rehabilitación. Entiendo que la atención médica y los estudios clínicos que forman parte del protocolo especificados en esta forma de consentimiento informado durante el estudio serán de manera gratuita.
7. Entiendo que con mi firma o huella dactilar en este documento, autorizo al médico del estudio a realizarme los procedimientos que se describen en este documento.
8. Confirmando que he recibido un original de este documento firmado y fechado y el otro original es resguardado por el médico del estudio.

Muestras para investigaciones futuras (opcional):

Aceptó mis muestras sean almacenadas para investigaciones futuras:

Sí _____ No _____

Nombre del participante: _____

Firma _____

Fecha _____ Hora: _____

Representante legal o tutor del paciente (Sí aplica).

Nombre _____

Firma _____

Fecha _____ Hora: _____

Relación con el paciente: _____

Huella digital del dedo índice derecho (en caso de no saber leer y escribir u otra situación que lo amerite)



Persona que conduce proceso de consentimiento informado:

Nombre de quien obtiene el consentimiento: _____

Firma _____

Fecha _____ Hora: _____

Testigo 1:

Nombre _____

Firma _____

Fecha _____ Hora: _____

Relación con el paciente: _____

Dirección _____

Testigo 2:

Nombre _____

Firma _____

Fecha _____ Hora: _____

Relación con el paciente: _____

Dirección _____

Anexo 2**Hoja de Recolección de Datos Demográficos, Afección Glándulas Salivales, Sistémicos e Inmunológicos**

Título protocolo **“Caracterización inmunofenotípica de linfocitos T y B en pacientes con Síndrome de Sjögren primario: correlación clínico-inmunológica”**

Criterio de Clasificación Síndrome de Sjögren del Consenso Americano- Europeo (2002)

- 1) Síntomas oculares positivos consistentes en resequeadad ocular diaria persistente por más de 3 meses, sensación recurrente de arenilla o grava en los ojos y/o uso de sustitutivos de lágrimas más de 3 veces al día.
Cumple criterio: ___ Sí ___ No
- 2) Síntomas orales consistentes en sensación diaria de resequeadad oral por más de 3 meses, inflamación de glándulas salivales recurrente o persistente del adulto y/o si requiere beber líquidos frecuentemente para ayudar a tragar alimentos secos.
Cumple criterio: ___ Sí ___ No
- 3) Signos oculares con evidencia objetiva y positiva en al menos uno de éstos: prueba Schirmer sin anestesia positiva, calificación de rosa de bengala u otra validada de ojo seco.
Cumple criterio: ___ Sí ___ No
- 4) Histopatología con sialodentitis linfocítica focal con calificación mayor a un foco linfocitario positivo (1 foco se considera más de 50 linfocitos en un área de 4mm²).
Cumple criterio: ___ Sí ___ No
- 5) Signo de afección de glándula salival con evidencia objetiva de al menos uno de los siguientes: flujo salival no estimulado menor a 1.5ml en 15 minutos, sialografía parotídea con sialectasias difusas (patrón punteado, cavitario o destructivo) sin obstrucción de ductos mayores, cintillografía salival con retraso de captura, concentración disminuida y/o excreción retardada del trazador. *En el protocolo sólo se realizará la prueba de flujo salival no estimulado.
Cumple criterio: ___ Sí ___ No
- 6) Anticuerpos Anti- Ro (anti- SSA) y/o anti- La (anti- SSB) positivos.
Cumple criterio: ___ Sí ___ No
- 7) Criterios de exclusión: no tener antecedente de radioterapia de cuello o cabeza, infección activa por virus hepatitis C (VHC), enfermedad de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), antecedente de linfoma, sarcoidosis, enfermedad injerto contra huésped o uso de medicamentos anticolinérgicos.
Cumple criterio: ___ Sí ___ No

Se considera cumple con criterios de clasificación al tener 4 de éstos 6 criterios positivos pero debe incluir el criterio de histopatología o serología (anticuerpos positivos) o si tiene positivo 3 de los 4 criterios objetivos (signos oculares, histopatología, afección glandular objetiva o positividad de anticuerpos) y cumplir con los siguientes.

Cumple criterios de clasificación: ___ Sí ___ No

No. Paciente Protocolo: _____

Fecha de evaluación clínica: _____

Nombre: _____

Dirección: _____

Teléfono: _____

Características Demográficas

Edad: _____ **Fecha de Nacimiento:** _____
Expediente Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana (si lo tiene): _____
Lugar Nacimiento: _____

Género: 0 ____ Femenino 1 ____ Masculino
Raza: 0 ____ caucásico 1 ____ mestizo 2 ____ indígena

Ocupación: 0 ____ Empleado por su cuenta hogar. 1 ____ Comercio formal.
 2 ____ Comercio informal. 3 ____ Asalariado. 4 ____ Jubilado.
 5 ____ Estudiante. 6 ____ Desempleado. 7 ____ Discapacidad.

Actividad Física 0 ____ No realiza 1 ____ Aeróbica 2 ____ No Aeróbica
Tiempo que realiza: ____ horas/semana

Peso: ____ kg **Talla:** ____ m **IMC:** ____ kg/m²

Escolaridad (años): 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 >15

Tabaquismo: 0 ____ Negativo. 1 ____ Positivo **Índice Tabáquico:** _____
Cuántos cigarros al día (promedio): _____
Años tabaquismo: _____

Co- morbilidades (tiempo evolución, tratamiento, complicaciones):

- a) _____

 b) _____

 c) _____

 d) _____

 e) _____

 f) _____

 g) _____

 h) _____

 i) _____

 j) _____

0 ____ Ninguno 1 ____ DM2 2 ____ HAS 3 ____ Dislipidemia mixta
 4 ____ Hipertrigliceridemia 5 ____ Hipercolesterolemia 6 ____ Hiperuricemia
 7 ____ Hipotiroidismo 8 ____ Otra

Fecha aproximada diagnóstico: _____
Edad al diagnóstico enfermedad: _____
Tiempo evolución enfermedad (inicio síntomas, no diagnóstico): _____
Edad al inicio síntomas de la enfermedad: _____

Tiempo entre inicio síntomas e inicio tratamiento FARME: _____

Edad al inicio tratamiento FARME: _____

Tratamiento FARME previo (si tuvo inicio, suspension):

- 1) _____
- 2) _____
- 3) _____
- 4) _____
- 5) _____
- 6) _____
- 7) _____
- 8) _____
- 9) _____
- 10) _____

Tratamiento FARME actual:

- 1) _____
- 2) _____
- 3) _____
- 4) _____
- 5) _____
- 6) _____
- 7) _____
- 8) _____
- 9) _____
- 10) _____

Manifestaciones extragalndulares durante evolución (si las hay en SSp):

- 1) _____
- 2) _____
- 3) _____
- 4) _____
- 5) _____
- 6) _____
- 7) _____
- 8) _____
- 9) _____
- 10) _____

Manifestaciones principales en SS secundario de enfermedad asociada:

- 1) _____
- 2) _____
- 3) _____
- 4) _____
- 5) _____
- 6) _____
- 7) _____
- 8) _____
- 9) _____
- 10) _____

Comentarios de HC importantes:

Afección de glándulas salivales

- 1) **Flujo salival no estimulado (15min):** _____ ml 0 _____ Negativa (>1.5ml) 1 _____ Positiva (>1.5ml).
- 2) **Biopsia de glándula salival:** 0 _____ Grado 0: sin infiltrado linfocitario. 1 _____ Grado 1: infiltrado linfocitario/plasmocitario leve difuso (<50 células/4mm²). 2 _____ Grado 2: infiltrado moderado o menos de un foco de infiltrado linfocitario/plasmocitario (<1 foco de 50 células/4 mm²). 3 _____ Grado 3: infiltrado linfocitario/plasmocitario (1 foco de 50 células/4 mm²) y atrofia glandular (fibrosis, pérdida marcada de acinos, ductos dilatados). 4 _____ Grado 4: más de un foco

Exploración Física

TA _____ mmHg FC _____ x' SatO2 _____ %AA

Linfadenopatías: Normal _____ Anormal _____ Especificaciones: _____

Glándulas: Normal _____ Anormal _____ Especificaciones: _____

Articulaciones: Normal _____ Anormal _____ Especificaciones: _____

Pie: Normal _____ Anormal _____ Especificaciones: _____

Pulmón: Normal _____ Anormal _____ Especificaciones: _____

Músculo: Normal _____ Anormal _____ Especificaciones: _____

Sistema nervioso periférico: Normal _____ Anormal _____ Especificaciones: _____

Sistema nervioso central: Normal _____ Anormal _____ Especificaciones: _____

Índice de actividad de la enfermedad de Síndrome de Sjögren EULAR (ESSDAI)

| <i>Dominio</i> | <i>Nivel de actividad</i> | <i>Descripción</i> |
|----------------|---------------------------|--------------------|
|----------------|---------------------------|--------------------|

| | | |
|---|--|---|
| <i>Constitucional (descartar infecciones o pérdida peso voluntaria)</i> | 0 No 3 Baja 6 Moderada | Baja: Fiebre leve o intermitente (37.5-38.5°C)/ diaforesis y/o pérdida peso 5- 10%. Moderada: fiebre >38.5°C, diaforesis nocturna, pérdida peso >10%. |
| <i>Linfadenopatía (excluir infecciones)</i> | 0 No 4 Baja 8 Moderada 12 Alto | Baja: linfadenopatía ≥1cm en cualquier región o ≥2cm región inguinal. Moderada: ≥2cm cualquier región o ≥3cm inguinal y/o esplenomegalia (clínica o imagen). Alta: malignidad trastorno proliferativo LB. |
| <i>Glandular (excluir infección o litiasis)</i> | 0 No 2 Baja 4 Moderada | Baja: incremento tamaño ≤3cm parótida o limitado a glándulas submandibulares o lagrimales. Moderada: incremento tamaño parótida ≥3cm o importante de glándulas submandibulares o lacrimales. |
| <i>Articular (excluir Osteoartritis)</i> | 0 No 2 Baja 4 Moderada 6 Alta | Baja: artralgiás de manos, carpos, tobillos y pies con rigidez articular matinal >30min. Moderada: artritis 1-5 articulaciones (conteo articular 28). Alta: artritis ≥6 articulaciones (conteo articular 28). |
| <i>Cutáneo</i> | 0 No 3 Baja 6 Moderada 9 Alta | Baja: eritema multiforme. Moderada: vasculitis cutánea limitada (vasculitis urticariana, púrpura limitada a pies o tobillo, lupus subagudo). Alta: vasculitis cutánea difusa (vasculitis urticariana, purpura difusa, úlceras). |
| <i>Pulmonar</i> | 0 No 5 Baja 10 Moderada 15 Alta | Baja: tos persistente o afección bronquial sin evidencia por imagen de daño o enfermedad pulmonar intersticial por radiología o TACAR*, sin disnea o función pulmonar normal. Moderada: afección pulmonar activa moderada (TACAR fibrosis pulmonar con disnea ejercicio NHYA II ó pruebas de función pulmonar anormal: DL _{CO} >70% pero no <40% o FVC >80% pero no ≤60%. Alta: fibrosis pulmonar TACAR con disnea en reposo (NHYA III o IV) o pruebas de función pulmonar anormales FVC <60% o DL _{CO} <40%. |
| <i>Renal</i> | 0 No 5 Baja 10 Moderada 15 Alta | Baja: acidosis tubular renal sin falla renal o afección glomerular (proteinuria 0.5-1gr/día) sin hematuria ni falla renal (TFG≥60ml/min). Moderada: acidosis tubular renal al (TFG<60ml/min) o afección glomerular (proteinuria 1- 15gr/día sin hematuria ni falla renal o evidencia histológica de GMN extra membranosa o infiltrado intersticial). Alta: afección glomerular (proteinuria >1.5gr/día o hematuria) o falla renal (TFG <60ml/min) o cambios histológicos de GMN proliferativa o crioglobulinemia). |
| <i>Muscular (exclusión miopatía por glucocorticoide)</i> | 0 No 6 Baja | Baja: miositis por EMG anormal o biopsia sin debilidad o CPK normal. |

| | | |
|--|--|---|
| | 12 Moderada 18 Alta | Moderada: miositis activa por EMG anormal o biopsia con debilidad muscular (4/5) o CPK elevada más del doble pero menos de 4 veces. Alta: miositis activa alta por EMG anormal o biopsia con debilidad ($\leq 3/5$) o CPK elevada más de 4 veces. |
| <i>Sistema nervioso periférico (SNP)</i> | 0 No 5 Baja 10 Moderado 15 Alta | Baja: polineuropatía axonal sensitiva pura (estudios neuroconducción) o neuralgia trigémino. Moderada: neuropatía motora- sensorial axonal, neuropatía sensorial pura con vasculitis crioglobulinémica, ganglionopatía, polineuropatía demielinizante inflamatoria (estudios neuroconducción) o afección craneal de origen periférico. Alta: neuropatía motora- sensorial axonal (déficit motor $\leq 3/5$) afección nervios periféricos por vasculitis, ganglionopatía con ataxia severa, polineuropatía demielinizante inflamatoria (déficit motor $\leq 3/5$). |
| <i>Sistema nervioso central (SNC)</i> | 0 No 10 Moderada 15 Alta | Moderada: afección nervio craneal origen central, neuritis óptica o síndrome tipo esclerosis múltiples (sensibilidad o cognitivo). Alta: vasculitis cerebral con EVC o ataque isquémico transitorio, convulsiones, mielitis transversa, meningitis linfocítica, síndrome tipo esclerosis sistémica (motor). |
| <i>Hematológica (sólo citopenias de origen autoinmune)</i> | 0 No 2 Baja 4 Moderada 6 Alta | Baja: Neutropenia >1000 pero <1500 anemia Hb >10 pero <12 , trombocitopenia $>100,000$ pero $<150,000$. Moderada: Neutropenia >500 pero <1000 anemia Hb >8 pero <10 , trombocitopenia $>50,000$ pero $<100,000$. Alta: Neutropenia <500 anemia Hb <8 , trombocitopenia $<50,000$. |
| <i>Biológico</i> | 0 No 1 Baja 2 Moderada | Baja: complemento C3 y C4 bajo, hipergammaglobulinemia, IgG >16 pero <20 g/L. Moderada: crioglobulinemia, hipergammaglobulinemia, IgG >20 g/L y/o hipogammaglobulinemia reciente o reducción reciente nivel IgG (<5 g/L). |

- 1) **Constitucional:** ____ puntos.
- 2) **Linfadenopatía:** ____ puntos.
- 3) **Glandular:** ____ puntos.
- 4) **Articular:** ____ puntos.
- 5) **Cutáneo:** ____ puntos.
- 6) **Pulmonar:** ____ puntos.
- 7) **Renal:** ____ puntos.
- 8) **Muscular:** ____ puntos.
- 9) **SNP:** ____ puntos.
- 10) **SNC:** ____ puntos.
- 11) **Hematológica:** ____ puntos.

12) **Biológico:** _____ puntos.

Resultados Laboratorio e Inmunológicos

- 1) ANA: _____
 2) Anti- Ro (SSA): _____
 3) Anti-La (SSB): _____
 4) Factor Reumatoide: _____ 0 ____ Negativo 1 ____ Títulos Bajos 2 ____ Títulos Altos
 5) IgG: _____
 6) IgA: _____
 7) IgM: _____
 8) IgE: _____
 9) IgG1: _____
 10) IgG2: _____
 11) IgG3: _____
 12) IgG4: _____
 13) Crioglobulinas: 0 ____ Ausente 1 ____ Presente
 14) Complemento C3: _____
 15) Complemento C4: _____

Valor de referencia en caso alteración

- 16) Hemoglobina _____
 17) Hematocrito _____
 18) VCM _____
 19) HCM _____
 20) Leucos _____
 21) Neutrófilos _____
 22) Linfocitos _____
 23) Monocitos _____
 24) Eosinófilos _____
 25) Basófilos _____
 26) Plaquetas _____
 27) Glucosa _____
 28) Urea _____
 29) Creatinina _____
 30) Proteína C reactiva _____
 31) VSG _____
 32) Colesterol _____
 33) Triglicéridos _____
 34) Ácido úrico _____
 35) Albúmina _____
 36) Albúmina orina _____
 37) Creatinina orina _____
 38) UACR _____ mg/g => albumina orina (mg/dL)/ creatinine orina (g/dL)
 39) EGO:
 PH _____
 Densidad _____
 Nitritos _____
 Leucocitos _____
 Eritrocitos _____
 Bacterias _____
 Cristales _____
 Píocitos _____
 Otros _____

Inmunofetipo

1) LT CD4 circulantes.

- a) T memoria central/periférica: CCR7 _____
 CD27 _____
 CD45RA _____
 CD45R0 _____
- b) Homing: CCR3 (Th2) _____
 CCR4 (Treg) _____
 CCR9 (mucosas) _____
 CCR5 (Th1) _____
- c) ThF: CXCR5 _____
 CD57 _____
 CD28 _____
- d) Tregs CD4 _____
 CD25 _____
 FOXP3 _____

2) LT CD4 circulantes posterior activación policlonal.

- a) T memoria central/periférica: CCR7 _____
 CD27 _____
 CD45RA _____
 CD45R0 _____
- b) Homing: CCR3 (Th2) _____
 CCR4 (Treg) _____
 CCR9 (mucosas) _____
 CCR5 (Th1) _____
- c) ThF: CXCR5 _____
 CD57 _____
 CD28 _____
- d) Tregs CD4 _____
 CD25 _____
 FOXP3 _____

3) LB circulantes.

- a) LB CD19 _____
 CD21 _____
 CD27 _____
 IgM _____
 IgD _____
 CD38 _____
- b) LB reg _____

4) LB circulantes posterior estimulación policlonal.

- c) LB CD19 _____
 CD21 _____
 CD27 _____
 IgM _____
 IgD _____
 CD38 _____
- d) LB reg _____

Citocinas

- 1) Séricas: IL-2 _____
 IL-4 _____
 IL-6 _____
 IL-10 _____

IL-17^a _____
TNF alfa _____
IFN- gamma _____

2) Lacrimales: IL-2 _____

IL-4 _____
IL- 6 _____
IL-10 _____
IL-17^a _____
TNF alfa _____
IFN- gamma _____

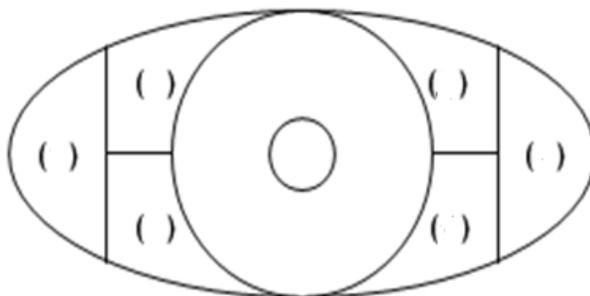
3) Sobrenadante de cultivo: IL-2 _____

IL-4 _____
IL- 6 _____
IL-10 _____
IL-17^a _____
TNF alfa _____
IFN- gamma _____

- 3 ____ Grado 3
 c) Área 2 conjuntiva 0 ____ Negativo 1 ____ Grado 1 2 ____ Grado 2
 3 ____ Grado 3

TOTAL _____

*Grado 1 puntilleo escaso separado. Grado 2 puntilleo moderado separado. Grado 3 puntilleo confluyente.



5) Daño Córnea.



6) **Tiempo ruptura película lacrimal posterior a tinciones:** _____ segs

7) **Prueba Schirmer I:** ____ mm 0 ____ Negativa (<5mm en 5min) 1 ____ Postiva
Prueba Schirmer II: ____ mm 0 ____ Negativa (<5mm en 5min) 1
 Postiva

TIRAS SCHIRMER

8) **Grado demanda gotas oftálmicas:** 0 ____ Negado. 1 ____ Una vez al día. 2 ____ Dos veces al día. 3 ____ Tres veces al día. 4 ____ Cuatro veces al día. 5 ____ Más de 4 veces al día.

9) **Citología de impresión:** 0 ____ Negativa 1 ____ Positiva Grado:
Observaciones:

10) **Altura del menisco:** ____ mm. 0 ____ Negativa (>0.1mm) 1 ____ Positiva (<0.1mm)

11) **Reborde palpebral observaciones:** _____

Línea Marx:

Número parpadeo por minuto: _____

Cierre adecuado: 0 ____ No 1 ____ Sí

12) **Sensibilidad: Presente** 0 ____ No 1 ____ Sí

Disminuida 0 ____ No 1 ____ Sí

OJO IZQUIERDO**1) Agudeza visual:**

2) Biomicroscopia (observaciones):

3) Tinción superficie ocular

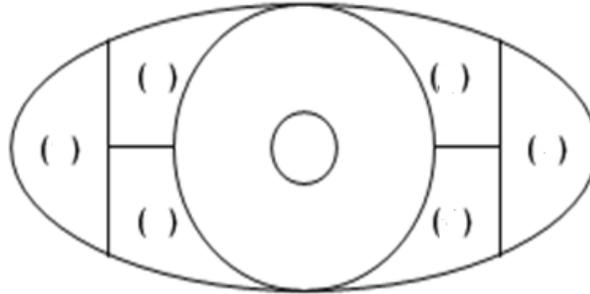
- a) Rosa de bengala 0 ____ Negativa 1 ____ Positiva
 b) Fluoresceína 0 ____ Negativa 1 ____ Positiva

4) Calificación van Bijsterveld.

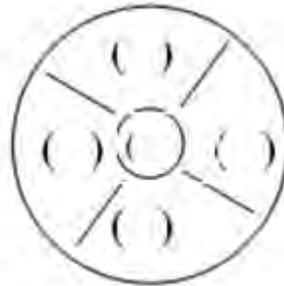
- a) Córnea 0 ____ Negativo 1 ____ Grado 1 2 ____ Grado 2
 3 ____ Grado 3
 b) Área 1 conjuntiva 0 ____ Negativo 1 ____ Grado 1 2 ____ Grado 2
 3 ____ Grado 3
 c) Área 2 conjuntiva 0 ____ Negativo 1 ____ Grado 1 2 ____ Grado 2
 3 ____ Grado 3

TOTAL _____

*Grado 1 puntilleo escaso separado. Grado 2 puntilleo moderado separado. Grado 3 puntilleo confluyente.



5) Daño Córnea.



Puntuación total 0

6) Tiempo ruptura película lacrimal posterior a tinciones: _____ segs

7) Prueba Schirmer I: _____ mm 0 _____ Negativa (<5mm en 5min) 1 _____ Postiva
 Prueba Schirmer II: _____ mm 0 _____ Negativa (<5mm en 5min) 1 _____ Postiva

TIRAS SCHIRMER

8) **Grado demanda gotas oftálmicas:** 0 ____ Negado. 1 ____ Una vez al día. 2 ____ Dos veces al día. 3 ____ Tres veces al día. 4 ____ Cuatro veces al día. 5 ____ Más de 4 veces al día.

9) **Citología de impresión:** 0 ____ Negativa 1 ____ Positiva Grado:
Observaciones:

10) **Altura del menisco:** ____ mm. 0 ____ Negativa (>0.1mm) 1 ____ Positiva (<0.1mm)

11) **Reborde palpebral observaciones:** _____

Línea Marx:

Número parpadeo por minuto: _____

Cierre adecuado: 0 ____ No 1 ____ Sí

12) **Sensibilidad: Presente** 0 ____ No 1 ____ Sí

Disminuida 0 ____ No 1 ____ Sí

Cuestionario OSDI

¿Ha experimentado alguna de las siguientes alteraciones durante la última semana?

| | FRECUENCIA | | | | |
|-----------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|
| | En todo momento | Casi en todo momento | El 50% del tiempo | Casi en ningún momento | En ningún momento |
| Sensibilidad a la luz | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| Sensación de arenilla en los ojos | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| Dolor de ojos | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| Visión borrosa | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| Mala visión | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |

Anexo 4**Hoja de Recolección de Ultrasonido de Glándulas Mayores**

Título protocolo "Caracterización inmunofenotípica de linfocitos T y B en pacientes con Síndrome de Sjögren primario. Correlación clínico-inmunológica"

No. Paciente Protocolo: _____

Fecha de evaluación clínica: _____

Nombre: _____

| <i>Parámetro</i> | Glándulas | 0 | 1 | 2 | 3 |
|--|--------------------------|--|-------------------------------|----------------------|--------------------|
| <i>Ecogenicidad parénquima comparado con tiroides*</i> | Parótida y submandibular | Comparable | Disminuido | - | -- |
| <i>Falta de Homogeneidad</i> | Parótida y submandibular | Homogéneo | Leve | Evidente | Severo |
| <i>Áreas hipoecoicas</i> | Parótida y submandibular | Ausente | Pocas aisladas | Varias | Numerosas |
| <i>Ecos hiperecoicos</i> | Parótida | Ausente | Pocos escasos | Severo | Numerosos |
| <i>Claridad de bordes glandulares</i> | Submandibular | Ausente | Presente | - | - |
| | Parótida y submandibular | Claro, bordes regulares bien definidos | Parcialmente bordes definidos | Bordes mal definidos | Bordes no visibles |

1) **Ecogenicidad parénquima parótida derecha:** 0 ____ Grado 0 1 ____ Grado 1
Ecogenicidad parénquima parótida izquierda: 0 ____ Grado 0 1 ____ Grado 1
Ecogenicidad parénquima submandibular derecha: 0 ____ Grado 0 1 ____ Grado 1
Ecogenicidad parénquima submandibular izquierda: 0 ____ Grado 0 1 ____ Grado 1

2) **Falta homogeneidad parótida derecha:** 0 ____ Grado 0 1 ____ Grado 1
 2 ____ Grado 2 3 ____ Grado 3
Falta homogeneidad parótida izquierda: 0 ____ Grado 0 1 ____ Grado 1
 2 ____ Grado 2 3 ____ Grado 3
Falta homogeneidad submandibular derecha: 0 ____ Grado 0 1 ____ Grado 1
 2 ____ Grado 2 3 ____ Grado 3
Falta homogeneidad submandibular izquierda: 0 ____ Grado 0 1 ____ Grado 1
 2 ____ Grado 2 3 ____ Grado 3

3) **Áreas hipoecoicas parótida derecha:** 0 ____ Grado 0 1 ____ Grado 1 2 ____ Grado 2 3 ____ Grado 3
Áreas hipoecoicas parótida izquierda: 0 ____ Grado 0 1 ____ Grado 1
 2 ____ Grado 2 3 ____ Grado 3
Áreas hipoecoicas submandibular derecha: 0 ____ Grado 0 1 ____ Grado 1
 2 ____ Grado 2 3 ____ Grado 3
Áreas hipoecoicas submandibular izquierda: 0 ____ Grado 0 1 ____ Grado 1
 2 ____ Grado 2 3 ____ Grado 3

- 4) **Ecos hiperecoicos glándula parótida derecha:** 0 ____ Grado 01 ____ Grado 1
2 ____ Grado 2 3 ____ Grado 3
Ecos hiperecoicos glándula parótida izquierda: 0 ____ Grado 0 1 ____
Grado 1 2 ____ Grado 2 3 ____ Grado 3
- 5) **Ecos hiperecoicos glándula submandibular derecha:** 0 ____ Grado 0 1 ____ Grado
1 **Ecos hiperecoicos glándula submandibular izquierda:** 0 ____ Grado 0 1
Grado 1
- 6) **Claridad de bordes regulares parótida derecha:** 0 ____ Grado 0 1 ____ Grado
1 2 ____ Grado 2 3 ____ Grado 3
Claridad de bordes regulares parótida izquierda: 0 ____ Grado 0 1
Grado 1 2 ____ Grado 2 3 ____ Grado 3
Claridad de bordes regulares submandibular derecha: 0 ____ Grado 0 1
Grado 1 2 ____ Grado 2 3 ____ Grado 3
Claridad de bordes regulares submandibular izquierda: 0 ____ Grado 0 1
Grado 1 2 ____ Grado 2 3 ____ Grado 3
- 7) **Doppler poder incrementado:** 0 ____ Negativo 1 ____ Positivo
- 8) **Elastografía glándula parótida derecha píxeles IImage:**
Media píxeles: ____ Píxeles glandular total. ____ Píxeles área con menos
indurada. ____ Píxeles área más indurada.
Píxel mínimo: ____ Píxeles glandular total. ____ Píxeles área con menos
indurada. ____ Píxeles área más indurada.
Píxel máximo: ____ Píxeles glandular total. ____ Píxeles área con menos
indurada. ____ Píxeles área más indurada.
- Elastografía glándula parótida izquierda píxeles IImage:**
Media píxeles: ____ Píxeles glandular total. ____ Píxeles área con menos
indurada. ____ Píxeles área más indurada.
Píxel mínimo: ____ Píxeles glandular total. ____ Píxeles área con menos
indurada. ____ Píxeles área más indurada.
Píxel máximo: ____ Píxeles glandular total. ____ Píxeles área con menos
indurada. ____ Píxeles área más indurada.
- Elastografía glándula submandibular derecha píxeles IImage:**
Media píxeles: ____ Píxeles glandular total. ____ Píxeles área con menos
indurada. ____ Píxeles área más indurada.
Píxel mínimo: ____ Píxeles glandular total. ____ Píxeles área con menos
indurada. ____ Píxeles área más indurada.
Píxel máximo: ____ Píxeles glandular total. ____ Píxeles área con menos
indurada. ____ Píxeles área más indurada.
- Elastografía glándula submandibular izquierda píxeles IImage:**
Media píxeles: ____ Píxeles glandular total. ____ Píxeles área con menos
indurada. ____ Píxeles área más indurada.

Píxel mínimo: _____ Píxeles glandular total. _____ Píxeles área con menos indurada. _____ Píxeles área más indurada.

Píxel máximo: _____ Píxeles glandular total. _____ Píxeles área con menos indurada. _____ Píxeles área más indurada.

Bibliografía

- ¹ Ramos Casals, M; Tzioufas, AG; Font, J. Primary Sjögren's síndrome: new clinical and therapeutic concepts. *Ann Rheum Dis*, 2005; 64: 347- 54.
- ² Seror, R; Ravaud, P; Mariette, X; et.al. EULAR Sjögren's Syndrome Patient Reported Index (ESSPRI): development of consensus patient index for primary Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis*, 2011; 70: 968- 72.
- ³ Haldorsen, K; Moen, K; Jacobsen, H; et. al. Exocrine function in primary Sjögren syndrome: natural course and prognostic factors. *Ann Rheum Dis*, 2008; 67: 949- 54.
- ⁴ Hatron, P; Tillie- Leblond, I; Launay, D; et. al. Pulmonary manifestations of Sjögren's syndrome. *Presse Med*, 2011; 40: 71- 86.
- ⁵ Kokosi, M; Riemer, EC; Highland, KB. Pulmonary involvement in Sjögren's Syndrome. *Clin Chest Med*, 2010; 31: 489- 500.
- ⁶ Qin, B; Wang, J; Yang, Z; et. al. Epidemiology of primary Sjögren's Syndrome: a systematic review and meta- analysis. *Ann Rheum Dis*, 2014; 205375 Published Online First: 17 June 2014.
- ⁷ Pijpe, J; Kalk, WWI; Bootsma, H; et. al. Progression of salivary glands dysfunction in patients with Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis*, 2007; 66: 107- 12.
- ⁸ Roguedas, AM; Misery, L; Sassolas, B; et. al. Cutaneous manifestations of primary Sjögren's syndrome are underestimated. *Clin Exp Rheumatol*, 2004; 22: 632- 36.
- ⁹ Mavragani, CP; Crow, MK. Activation of the type I interferon pathway in primary Sjögren's syndrome. *J Autoimm*, 2010; 35: 225- 31.
- ¹⁰ Voulgarelis, M; Tzioufas, AG. Pathogenic mechanisms in the initiation and perpetuation of Sjögren's síndrome. *Nat Rev Rheumatol*, 2010; 6: 529- 37.
- ¹¹ Hansen, A; Gosemann, M; Pruss, A; et. al. Abnormalities in Peripheral B Cell Memory of Patients With Primary Sjögren's Syndrome. *Arth Rheum*, 2004; 50: 1897- 1908.
- ¹² Hansen, A; Odendahl, M; Reiter, K; et. al. Diminished Peripheral Blood Memory B Cells and Accumulation of Memory B Cells in the Salivary Glands of Patients With Sjögren's Syndrome. *Arth Rheum*, 2002; 46: 2160- 71.
- ¹³ Szabo, K.; Papp, G; Dezso, B; et. al. The Histopathology of Labial Salivary Glands in Primary Sjögren's Syndrome: Focusing on Follicular Helper T Cells in the Inflammatory Infiltrates. *Med Inflamm*, 2014; Article ID 631787, 11 pages.
- ¹⁴ Szabo, K.; Papp, G; Barath, S; etl. al. Follicular helper T cells may play an important role in the severity of primary Sjögren's syndrome. *Clin Immunol*, 2013; 147: 95- 104.
- ¹⁵ Youinou, P; Pers, JO. Disturbance of cytokine networks in Sjögren's syndrome. *Arth Res Therap*, 2011; 13: 227.
- ¹⁶ Moriyama, M; Hayashida, JN; Toyoshima, T; et. al. Cytokine/ chemokine profiles contribute to understanding the pathogenesis and diagnosis of primary Sjögren's syndrome. *Clin Exp Immunol*, 2012; 169: 17- 26.
- ¹⁷ Campbell, JD; HayGlass, KT. T cell chemokine receptor expression in human Th1 and Th2 associated disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2000; 48: 451- 6.
- ¹⁸ Simpson, N; Gatenby, PA; Wilson, A; et. al. Expansion of Circulating T Cells Resembling Follicular Helper T Cells Is a Fixed Phenotype That Identifies a Subset of Severe Systemic Lupus Erythematosus. *Arth Rheum*, 2010; 62: 234- 44.
- ¹⁹ Li, X; Wu, Z; Ding, J; et. al. Role of the frequency of blood CD4⁺ CXCR5⁺ CCR6⁺ T cells in autoimmunity in patients with Sjögren's syndrome. *Biochemical Biophys Res Commun*, 2012; 422: 238- 44.
- ²⁰ Gong, YZ; Nititham, J; Taylor, K; et. al. Differentiation of follicular helper T cells by salivary gland epithelial cells in primary Sjögren's syndrome. *J Autoimmun*, 2014; 51: 57- 66.
- ²¹ Furuzawa- Carballeda, J; Hernández- Molina, G; Lima, G; et. al. Peripheral regulatory cells immunophenotyping in Primary Sjögren's Syndrome: a cross- sectional study. *Arth Res Therap*, 2013; 15: R68.
- ²² Vitali, C; Bombardieri, S; Jonsson, R; et. al. Classification criteria for Sjögren's síndrome: a revised versión of the European criteria proposed by the American- European criteria proposed by the American- European Consensus Group. *Ann Rheum Dis*, 2002; 61, 554- 558.
- ²³ Chisholm, D.; et. al. Labial salivary gland biopsy in Sjögren's disease. *J Clin Pathol*, 1968; 21: 656-60.

-
- ²⁴ Van Bijsterveld, OP. Diagnostic tests in the sicca syndrome. *Arch Ophthalmol*, 1969; 82: 10- 4.
- ²⁵ Hocevar, A; Ambrozic, A; Rozman, B; et. al. Ultrasonographic changes of major salivary glands in primary Sjögren's syndrome. Diagnostic value of a novel scoring system. *Rheumatol*, 2005, 44. 768- 72.
- ²⁶ Seror, R; Ravaud, P; Bowman, SJ; et. al. EULAR Sjögren's syndrome disease activity index: development of a consensus systemic disease activity index for primary Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis*, 2010; 69: 1103- 9.
- ²⁷ Akpek, EK; Klimava, A; Thorne, JE; et. al. Evaluation of Patients with Dry Eye for Presence of Underlying Sjögren's Syndrome. *Cornea*, 2009; 28: 493- 7.
- ²⁸ Alves, M; Sol Reinach, S; Silva Paula, J; et. al. Comparison Diagnostic Tests in Distinct Well- Defined Conditions Related to Dry Eye Disease. *PLoS ONE*, 9: e97921.
- ²⁹ Hochberg, M; et. al. *Rheumatology*. Editorial Elsevier Mosby. 5a edición, 2010.
- ³⁰ Ren, H; Wang, WM, Chen XN, et. al. Renal Involvement and Followup of 130 Patients with Primary Sjögren's Syndrome. *J Rheumatol*, 2008; 35: 278-84.
- ³¹ Maripuri, S; Grande, JP; Osborn, TG; et. al. Renal Involvement in Primary Sjögren's Syndrome: A Clinicopathologic Study. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2009; 4: 1423- 31.
- ³² Manganelli, P; Fietta, P; Quaini, F. Hematologic manifestations of primary Sjögren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol*, 2006; 24: 438- 48.
- ³³ Kim, SM; Park, E; Lee, JH; et. al. The clinical significance of anti- cyclic citrullinated peptide antibody in primary Sjögren's syndrome. *Rheumatol Int*, 2012; 32: 3963- 7.
- ³⁴ Saied, F; Korytkowska, MW, Maslinska, M; et. al. The usefulness of ultrasound in the diagnostics of Sjögren's Syndrome. *J Ultrasonograph*, 2013; 13: 202- 11.
- ³⁵ Christodoulou, MI; Kapsogeorgou, EK; Moutsopoulos, NM; et. al. Foxp3+ T- Regulatory Cells in Sjögren's Syndrome. Correlation with the Grade of Autoimmune Lesions and Certain Adverse Prognostic Factors. *Am J Pathol*, 2008; 173: 1389- 96.
- ³⁶ Szodoray, P; Papp, G; Horvath, IF, et. al. Cells with regulatory function of the innate and adaptive immune system in primary Sjögren's syndrome. *Clin Exp Immunol*, 2009; 157: 343- 9.
- ³⁷ Gottenberg, JE, Lavie, F; Abbed, K; et. al. CD4 CD25high regulatory T cells are not impaired in patients with primary Sjögren's syndrome. *J Autoimmun*, 2005; 24: 235- 42.
- ³⁸ Binard, A; Le Pottier, L; Devauchelle- Pensec, V; et. al. Is the blood B-cell subset profile diagnostic for Sjögren's syndrome? *Ann Rheum Dis*, 2009; 68: 1447- 52.
- ³⁹ Cornec, D; Saraux, A; Pers, JO; et. al. Diagnostic accuracy of blood B- cell subset profiling and autoimmunity markers in Sjögren's syndrome. *Arth Res Therap*, 2014; 16: R15.
- ⁴⁰ Cornec, D; Devauchelle- Pensec, V; Tobon, TJ; et. al. B cells in Sjögren's syndrome: From pathophysiology to diagnosis and treatment. *J Autoimmun*, 2012; 39: 161- 7.