

UTILIDAD CLÍNICA DE BETA2MICROGLOBULINA EN PACIENTES CON SÍNDROME DE SJÖGREN PRIMARIO.

CLINICAL USEFULNESS OF BETA2MICROGLOBULIN IN PATIENTS WITH PRIMARY SJÖGREN SYNDROME.

Rozzatti M S, Fontaneto E, Pedano V, Racca A, Pelosso M, Gobbi C, Alba P, Demarchi M.

Resumen:

Las manifestaciones extraglandulares y desórdenes linfoproliferativos son complicaciones que pueden comprometer el curso benigno del Síndrome de Sjögren Primario (SSp). Existen escasos marcadores serológicos con comprobada utilidad para predecirlas y/o diagnosticarlas.

Objetivos: Evaluar la utilidad de Beta2microglobulina (β 2m) en pacientes con SSp y correlacionarlos con parámetros séricos predictivos de manifestaciones extraglandulares y enfermedades linfoproliferativas (Factor Reumatoideo (FR), Inmunoglobulinas séricas (Igs), C3 y C4).

Materiales y métodos: Se realizó una revisión retrospectiva de historias clínicas de pacientes que consultaron en la Unidad de Reumatología del Hospital Córdoba desde enero de 2010 a octubre 2013 y que fueron derivados a la Sección de Inmunología del Servicio de Bioquímica para la determinación de pruebas de laboratorio. Los pacientes fueron clasificados de acuerdo a los Criterios Diagnósticos de patologías autoinmunes en pacientes con diagnóstico de SSp según el Grupo Consenso Americano-Europeo, otras enfermedades autoinmunes y los controles sanos. Se estudiaron las IgG, IgA e IgM, factores del complemento C3, C4 séricos y FR por inmunoturbidimetría y β 2m por ELISA.

Resultados: 19 pacientes con SSp (Grupo SSp), 28 pacientes con patologías autoinmunes distintas a SSp (Grupo PAD), y 24 controles sanos (Grupo C) fueron incluidos en este estudio. Se evidenció un aumento estadísticamente significativo de β 2m en el Grupo SSp respecto al Grupo C (6.19mg/dl vs 2.53mg/dl $p < 0.001$) y respecto al Grupo PAD (6.19 vs 4.38mg/dl $p < 0.01$). En el grupo SSp se observó aumento estadísticamente significativo de IgA ($p < 0.05$) y G ($p < 0.001$) y disminución de C4 ($p < 0.05$) respecto al Grupo C. No se observó correlación entre β 2m y el resto de parámetros séricos determinados.

Conclusión: β 2m permitió discriminar pacientes con SSp de aquellos con otras patologías autoinmunes y sujetos sanos. El aumento de β 2m en pacientes con SSp podría reflejar la hiperactivación de células B y podría ser un marcador asociado con las manifestaciones extraglandulares y desórdenes linfoproliferativos.

Abstract

The extraglandular manifestations and lymphoproliferative disorders are complications in pSS. There are few serological markers that they are useful in these conditions.

Objetives: to evaluate the usefulness of the β 2microglobulin level in patients with pSS and its relation to extra glands manifestations, lymphoproliferative disorders and the presence of Rheumatoid factor (RF), serum immunoglobulins (Igs), and C3 and C4 levels.

Material and Methods: we retrospectively studied patients with pSS, OAD and healthy controls. Ig G, Ig A and Ig M levels, serum complement C3 and C4 and RF were performed by immunoturbidimetry, and β 2microglobulin protein by the ELISA technique in all patients.

Results: 19 patients with pSS (Group SSp), 28 patients with other autoimmune diseases different from pSS (Group PAD) and 24 healthy controls (Group C). There was a significant increase of β 2m values in Groups SS and OAD vs Group C (6.19 mg/dl vs. 2.53 mg/dl $p < 0.001$) and (4.38 mg/dl vs. 2.53 mg/dl $p < 0.01$). On the other hand, mean β 2m levels in Group SS were higher than in Group OAD (6.19 vs. 4.38 mg/dl $p < 0.01$). There was not a relationship between β 2m level and Ig G, A, M, complement levels and the presence of RF.

Conclusion: β 2m can discriminate patients with pSS from those with other autoimmune diseases and healthy subjects. Increased β 2m level in patients with pSS could reflect hyperactivation of B cells and it could be a potential marker associated with extraglandular manifestations and cell lymphoproliferative disorders.

Palabras claves: Beta2microglobulina, Síndrome de Sjögren.

Key Words: Beta2microglobulin, Sjogren Syndrome

Introducción

El Síndrome de Sjögren Primario (SSp) es una enfermedad autoinmune crónica caracterizada por infiltración linfocítica periepitelial de los órganos blancos afectados, principalmente glándulas exocrinas resultando en manifestaciones clínicas tales como xerostomía y xeroftalmia¹⁻⁴. El SSp generalmente se caracteriza por una evolución estable de los síntomas y signos. Las excepciones a este curso benigno son el desarrollo de manifestaciones extraglandulares y una alta incidencia de linfomas, que ensombrecen el pronóstico y son una de las principales causas de mortalidad⁸⁻¹¹. El principal factor asociado a estas dos condiciones clínicas es un aumento de la actividad inmunológica con hiperactividad policlonal de células B que se refleja a nivel sérico con la presencia de autoanticuerpos^{12,13}, hipocomplementemia^{14,18}, crioglobulinas^{22,28}, hipergammaglobulinemia y modificación en los niveles séricos de β 2 mi-

croglobulina (β 2m)^{25,26}. Diferentes estudios realizados⁵⁻⁷ muestran que en la actualidad son escasos los marcadores serológicos de utilidad para predecir las complicaciones extraglandulares y el desarrollo de patologías linfoproliferativas, por lo que es de suma importancia poder contar con marcadores humorales alternativos que reflejen en pacientes con SSp estas condiciones. Pocos estudios han evaluado el uso de la determinación de β 2m en el diagnóstico y/o seguimiento clínico de pacientes con SSp. La β 2m se encuentra en concentraciones bajas en suero, líquidos corporales y secreciones pero en pacientes con SSp éstas se encuentran aumentadas, y en pacientes con síndrome Sicca son uno de los factores predictivos de evolución a SSp. Asimismo se han detectado valores elevados en las glándulas salivales de pacientes con SSp, sugiriendo una posible correlación con la infiltración linfocitaria. Finalmente se han correlacionado concentraciones elevadas

de $\beta 2m$ en pacientes con SSp asociado a linfoma^{30,31}.

Por ello la medición de $\beta 2m$ sérica podría utilizarse como un parámetro de laboratorio en esta patología, ya que el incremento en la proliferación y el aumento de masa linfocítica se correlaciona con los valores de $\beta 2m$. Esto podría ayudar a identificar pacientes con SSp en riesgo de desarrollar manifestaciones extraglandulares y linfoma de células B que necesitarían una monitorización más estricta, un seguimiento reforzado y el uso de agentes inmunosupresores más agresivos^{32, 33}.

Objetivos:

*Determinar los niveles séricos de $\beta 2m$ en pacientes con SSp Ro/SSA positivos y correlacionarlos con los parámetros séricos predictivos de manifestaciones extraglandulares y enfermedades linfoproliferativas (Factor Reumatoideo (FR), Inmunoglobulinas séricas (Igs), C3 y C4).

* Comparar los niveles de $\beta 2m$, Igs, C3, C4 y FR en los pacientes con SSp Ro/SSA positivos, con pacientes Ro/SSA positivos con otras patologías autoinmunes y sujetos sanos.

Materiales y métodos

Se realizó una revisión retrospectiva de historias clínicas de pacientes que consultaron en la Unidad de Reumatología del Hospital Córdoba desde enero de 2010 a octubre 2013 y que fueron derivados a la Sección de Inmunología del Servicio de Bioquímica para la determinación de pruebas de laboratorio. Se seleccionaron 47 muestras ANA positivos, Ro/SS-A positivos. Los ANA se detectaron por IFI sobre células Hep-2000 y se realizaron pruebas confirmatorias por LIA (inmunoensayo lineal) para los autoanticuerpos anti Ro 60 y Ro 52.

Los pacientes fueron clasificados de acuerdo a los Criterios Diagnósticos de patologías autoinmunes en Grupo SSp, pacientes con diagnóstico de SSp según el Grupo Consenso Americano-Europeo⁴⁰,

Grupo PAD: pacientes con otras patologías autoinmunes distintas a SSp clasificados de acuerdo a los criterios diagnósticos correspondientes (LES según Colegio Americano de Reumatología 1997, AR según Colegio Americano de Reumatología 2010, SSc según Colegio Americano de Reumatología 1980, HAI según Grupo Internacional de la Hepatitis Autoinmune 1992) y el grupo C: sujetos como controles normales, en los que se excluyeron patologías de etiología autoinmune.

El protocolo de trabajo fue aprobado por el Comité Institucional de Ética en Investigación en Salud

Muestras biológicas en estudio: Se procesaron muestras de suero alicuotadas y conservadas a $-20^{\circ}C$ obtenidas de los pacientes durante su visita al laboratorio para la realización de estudios inmunológicos de rutina posterior a la consulta médica.

Determinación de inmunoglobulinas Ig G, Ig A e Ig M, factores del complemento C3 y C4 séricos y F R: se realizaron por la técnica de inmunoturbidimetría en Hitachi Cobas C311 / Sistemas Roche. (2012-05, V8 Español)

Determinación de proteína $\beta 2$ microglobulina: se realizó por técnica de ELISA de origen comercial. Las muestras fueron procesadas según especificaciones del fabricante, el título de corte propuesto es de 3 mg/dl.

Análisis estadísticos: Los datos obtenidos fueron analizados utilizando los programas estadísticos Instat y Meldcalc. Para la comparación de las medias se utilizaron test paramétricos (ANOVA) y no paramétricos (Kruskal Wallis) según la distribución de los datos analizados. La sensibilidad y especificidad diagnóstica fueron calculadas por medio de curvas ROC. Para evaluar la correlación se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson.

Resultados

Se incluyeron 19 pacientes en el grupo SSp, 28 pacientes en el grupo PAD y 24

en grupo C.

Niveles de β 2microglobulina sérica:

Como se observa en el Gráfico 1, al analizar los valores obtenidos de β 2m, se evidenció un aumento estadísticamente significativo en los Grupos SSp y PAD respecto al Grupo C (6.19mg/dl vs 2.53mg/dl $p < 0.001$) y (4.38mg/dl vs 2.53mg/dl $p < 0.01$). Por otra parte la media de β 2m en el Grupo SSp fue mayor que en Grupo PAD (6.19 vs 4.38mg/dl $p < 0.01$).

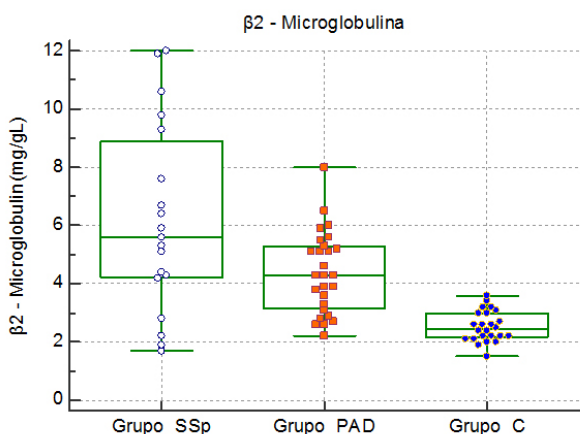


Gráfico 1: Niveles de β 2 microglobulina en suero. El análisis estadístico mostró un aumento significativo en el Grupo SSp (pacientes con SSp) respecto al Grupo PAD (pacientes con patologías autoinmunes diferentes) a $p < 0.01$ y Grupo C (sujetos controles) b $p < 0.001$

A los fines de evaluar la utilidad diagnóstica de β 2m sérica como parámetro sérico en pacientes con SSp, se determinaron la sensibilidad y especificidad diagnóstica frente a la población de pacientes sin la patología. Los resultados se muestran en el Cuadro 1. Los valores de sensibilidad y especificidad (78.9 y 70.6) obtenidos fueron buenos con un valor de corte para nuestra serie de pa-

cientes de 3,9 mg%, ligeramente superior al establecido por los fabricantes (3 mg/dl). Con este título de corte el 83% de los pacientes del Grupo SSp presentó β 2m aumentada mientras que el Grupo PAD solo el 54%, no alcanzando significación estadística.

Determinación de factores de complemento C3 y C4 séricos:

Al comparar los niveles del factor C3 del complemento en los tres grupos estudiados, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en nuestra serie de pacientes. En relación al C4 los resultados mostraron una disminución estadísticamente significativa en los Grupos SSp (17.1 \pm 7.9 mg/dl) y PAD (15.7 \pm 9.3 mg/dl) respecto al Grupo C (25.3 \pm 7.3 mg/dl) ($p < 0,05$ y $p < 0,001$ respectivamente), no observándose diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de pacientes (Gráfico 2).

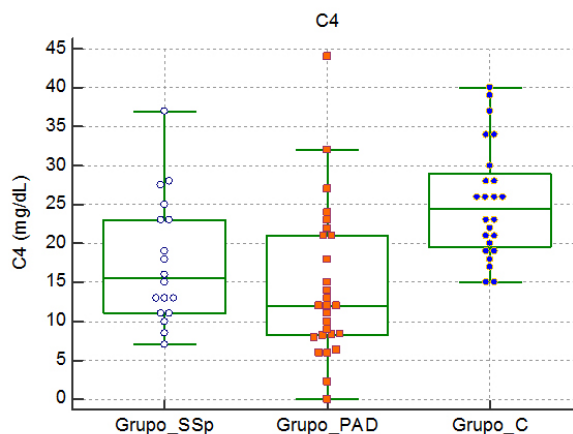


Gráfico 2: Niveles de C4 en suero. El análisis estadístico mostró valores medios menores al Grupo 3 en ambos grupos de pacientes Grupo SSp (pacientes con SSp) a $p < 0.05$ y Grupo PAD (pacientes con patologías autoinmunes diferentes) b $p < 0.001$

	Área bajo la curva	Cut-off	IC	Sensibilidad	Especificidad	LR+	LR -
β 2m	0.752 *	3,9 mg%	0.635-0.848	78.9	70.6	2.68	0.30
C4	0.540 *	19 mg%	0.416-0.661	66.7	51.0	1.36	0.65

Cuadro 1: exactitud diagnóstica de β 2m y C4 séricos

Si bien las medias obtenidas se encuentran dentro de los valores de referencia (10-40mg/dl), se observaron en el Grupo SSp y en el Grupo PAD pacientes con valores de C4 menores o iguales a 10 mg/dl (Grupo 1: 21% y Grupo 2: 32% de los pacientes respectivamente). También fue evaluada la utilidad diagnóstica del componente del complemento C4 obteniéndose valores de sensibilidad y especificidad bajos con un área bajo la curva de 0.54 (Cuadro 1).

Comparación de curvas ROC: Al comparar las áreas bajo la curva correspondientes a $\beta 2m$ y C4 se observó una diferencia estadísticamente significativa entre ambas (0.75 vs 0.54, $p=0.022$). En el caso de C4, el intervalo de confianza fue de 0.416-0.661. Por otra parte $\beta 2m$ mostró ser más sensible y específica que C4 en nuestra serie de pacientes ($S=78.9$ vs 66.7 y $E=70.6$ vs 51.0) comportándose como mejor parámetro sérico que el C4 para discriminar pacientes con SSp de aquellos con otras patologías autoinmunes y pacientes sanos (Gráfico 3).

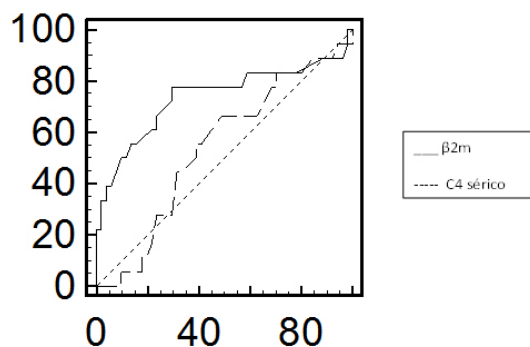


Gráfico 3: curvas ROC correspondientes a $\beta 2m$ sérico y C4 sérico

Determinación de Inmunoglobulinas séricas: Los resultados obtenidos de Igs se muestran en la Tabla 1. El Grupo SSp presentó un aumento estadísticamente significativo de Ig A e Ig G respecto al Grupo C. El Grupo PAD sólo presentó aumento estadísticamente significativo de Ig G respec-

to al Grupo C. Los niveles de Ig M fueron comparables en los tres grupos analizados. Factor Reumatoideo: Para el análisis de los valores de FR se tomó como valor de corte 14 UI/ml según especificaciones del fabricante. Cuando analizamos los valores alcanzados en los tres grupos, obtuvimos un 60% de pacientes con valores positivos en el grupo SSp, 52% en el grupo PAD y 0% en el grupo C. Al comparar las medias en los tres grupos analizados no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas, a pesar que el Grupo SSp presentó niveles aumentados de FR (55 ± 60 UI/ml) con respecto al Grupo PAD (29 ± 50 UI/ml) y al Grupo C (9 ± 1 UI/ml). Se debió utilizar un test no paramétrico para la comparación entre los grupos debido a una diferencia extremadamente significativa en las DS (desviaciones estándares) con la presencia de valores muy altos y muy bajos de FR en ambos grupos de pacientes.

Análisis de Correlación: No se observó correlación estadísticamente significativa entre la $\beta 2m$ y los parámetros predictivos (Igs A, G y M, C3, C4 y FR).

Discusión:

A pesar de que el factor inicial desencadenante de la compleja interacción inmune en el SSp permanece desconocido, existe evidencia de que durante su curso existiría un permanente estado de hiperactividad de las células B (actividad policlonal), lo cual podría reflejarse en un perfil humoral característico en los pacientes que la padecen. Dicho perfil incluye niveles modificados de $\beta 2m$ sérica y FR, hipocomplementemia, una marcada hipergammaglobulinemia y presencia de múltiples autoanticuerpos⁴¹ y crioglobulinas³⁸.

En el Grupo de pacientes con SSp, el 83% presentó niveles elevados de $\beta 2m$ con un aumento estadístico con respecto al Grupo Control y al grupo de pacientes con otras patologías autoinmunes (LES, AR, SSc, HAI). Si bien también se observó aumento

	Ig A media	mg% mediana	Ig G media	mg% mediana	Ig M media	mg% mediana
Grupo SSp	324.3	359 a	1988.5 b	1937	187.0	161
N= 18	±108.7	(108-487)	±532.5	(966-3357)	±134.7	(56-589)
Grupo PAD	316.8	282	1873.2 c	1872	139.0	127
N= 27	±160,3	(97-745)	±558.2	(752- 3062)	±76.2	(11-304)
Grupo C	233.9	209 a	1094.4 b, c	1051	134.2	149
N= 24	±91,6	(135-450)	±229.9	(686- 1458)	±53.9	(29 – 217)

Cuadro1: Niveles de Inmunoglobulinas Ig A, Ig G e IgM a p<0,05 b, c p< 0,001

de β 2m en el Grupo de pacientes con otras patologías autoinmunes, este fue inferior al observado en SSp.

Estudios previos han descripto aumento de β 2m sérica en pacientes con SSp³⁵ y los niveles de esta proteína se han considerado como un factor predictivo de evolución a SSp en pacientes con síndrome seco²². En un estudio realizado en 49 pacientes con sospecha de SS se encontró una concentración elevada en saliva de la β 2microglobulina (4 g/ml) en 35 % de ellos, todos diagnosticados como SSp, mientras que el 65% restante, presentó un SS asociado o bien un síndrome seco²⁴. También se han encontrado niveles significativos de esta proteína en suero de pacientes con diversas afectaciones extraglandulares, especialmente a nivel pulmonar, renal y linfoproliferativo^{35, 36}. Algunos autores³⁴ proponen la detección de β 2m en suero y en saliva para estimar el grado de infiltración linfocitaria activa en los órganos afectados en el SS y como respuesta al tratamiento ya que el incremento en la proliferación y el aumento de masa linfoidea se correlaciona con los niveles de β 2m.

A raíz del aumento encontrado en el grupo con SSp decidimos evaluar la utilidad diagnóstica de β 2m sérica mediante el análisis de curvas ROC, y así conocer la capacidad de dicha prueba de discriminar correctamente a estos pacientes de aque-

llos sin esta patología. Para poder proponer la inclusión de esta prueba en la práctica de laboratorio rutinaria es necesario demostrar su capacidad de reducir la incertidumbre asociada a esta situación clínica. A partir de este análisis se observó que el área bajo la curva de 0,752 y su intervalo de confianza (IC= 0,635-0,848) indican una exactitud diagnóstica media. A valores de sensibilidad cercana al 80% y de exactitud de 70% se obtuvo un cutt-off de 3.9 mg/dl para discriminar pacientes con SSp de aquellos sin SSp. Los resultados obtenidos posiblemente han reflejado la pequeña serie de pacientes (N=19) como así también los diferentes estados clínicos que presentaban los pacientes al momento de la obtención de la muestra. Por lo tanto, sería interesante aumentar el tamaño muestral y de esta forma obtener resultados estadísticos más sólidos que demuestren un comportamiento diferencial en las distintas patologías. Por ello también proponemos realizar un seguimiento prospectivo en dichos pacientes considerando el tiempo de evolución de la enfermedad, tipo de tratamiento y presencia de manifestaciones clínicas lo que permitirá evaluar la utilidad potencial de la β 2m sérica como marcador pronóstico de la enfermedad.

Respecto a los factores del complemento, en el caso del factor C4 al comparar las medias observamos una disminución en am-

bos grupos de pacientes (SSp y PAD) con respecto a los controles sanos. En la mayoría de los estudios la hipocomplementemia ha mostrado ser el factor inmunológico asociado a un mayor riesgo de desarrollo de linfoproliferación. La disminución sérica de C4 y/o C3 ha sido descrita por diferentes autores^{9,21, 27,37} como un factor de riesgo para el desarrollo de linfomas, una menor supervivencia y presencia de manifestaciones extraglandulares. De esta forma los resultados obtenidos aseveran estas observaciones previas siendo necesarios análisis futuros para identificar en nuestros pacientes a que factores clínicos está asociada la hipocomplementemia observada. Si bien aún no ha sido analizado convenientemente, la estrecha relación entre la hipocomplementemia y el desarrollo de linfomas en SSp podría estar directamente relacionada con la presencia concomitante de crioglobulinemia³⁸. En nuestro trabajo no pudo ser evaluada la presencia de crioglobulinas ya que es limitante la etapa preanalítica³⁹ (obtención de la muestra) si se quieren lograr resultados confiables, en nuestro caso se utilizaron sueros conservados a -20° C lo que imposibilita la detección de crioglobulinas. La disminución de C4 sérico en el grupo de pacientes con otras patologías autoinmunes se debió al importante porcentaje de pacientes con LES incluidos en este grupo. La evaluación de la exactitud diagnóstica para C4 sérico fue baja con un Área Bajo la Curva de 0,54 (IC= 0.416-0.661) que no permite discriminar a los pacientes con SSp de otras patologías autoinmunes y de sujetos sanos a diferencia de lo observado para β 2m. La diferencia significativa entre ambos marcadores permite sugerir la importancia de la cuantificación de β 2m en esta población de pacientes.

Por último las Igs séricas reflejan un aumento policlonal a expensas de Ig A sérica e Ig G sérica en pacientes con SSp a diferencia de lo observado en los pacientes con otras patologías autoinmunes donde solo se observó aumento de Ig G sérica. El

aumento de Ig A sérico solo en pacientes con SSp puede relacionarse con la activación a nivel de las mucosas producida por la lesión a nivel de las glándulas salivales. En trabajos previos, Anderson y Talal²⁸ observaron que en el momento de transición de un pseudolinfoma a linfoma había una disminución de los valores de Ig M y la desaparición del FR. Sin embargo, estudios recientes no han validado estos hallazgos y, por el contrario, se ha descrito una mayor cifra de inmunoglobulinas en pacientes con linfoma y SSp. Por ejemplo, Pertovaara y colaboradores²² encontraron valores medios más elevados de inmunoglobulinas A y M en los pacientes que desarrollaron un linfoma de células B. Es necesario realizar observaciones prospectivas para evaluar en nuestros pacientes la utilidad clínica de la cuantificación de Igs.

Recientemente se ha publicado la existencia de correlación entre la β 2m y el ESSDAI (índice de actividad de la enfermedad para Síndrome de Sjogren desarrollado por EULAR) para evaluar síntomas sistémicos⁴¹, ESSDAI también se correlacionó con la velocidad de sedimentación globular pero no se correlacionó con Ig G sérica ni con C4 sérico. Estos resultados apoyan hallazgos anteriores de que β 2m sérica es un biomarcador importante de la actividad inflamatoria sistémica en el SSp y que además de correlacionarse con ESSDAI, es útil en el seguimiento de los pacientes con SSp, ya que un aumento de los niveles β 2m alerta sobre complicaciones pulmonares, nefrológicas o linfoproliferativas^{32, 42,43}. A pesar de todas las observaciones realizadas, no obtuvimos correlación entre la β 2m y los otros parámetros evaluados (FR, Igs, C4 sérico).

Conclusiones: Los pacientes con SSp mostraron aumento de Ig G e Ig A, disminución de C4 y aumento de la β 2m que reflejaría un estado de activación de la célula B. La β 2m fue un mejor parámetro sérico que el C4 sérico para discriminar pacientes con

SSp de pacientes con otras patologías autoinmunes y sujetos sanos. La $\beta 2m$ podría ser un potencial marcador de utilidad en el seguimiento en SSp siendo necesarios estudios prospectivos longitudinales para determinar su papel.

Referencias

1-Christodoulou MI, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM: Characteristics of the minor salivary gland infiltrates in Sjogren's syndrome. *J Autoimmun* 2010, 34:400-407.

2-Stott DI, Hiepe F, Hummel M, Steinhauser G, Berek C: Antigen-driven clonal proliferation of B cells within the target tissue of an autoimmune disease. The salivary glands of patients with Sjogren's syndrome. *J Clin Invest* 1998, 102: 938-946.

3-Salomonsson S, Jonsson MV, Skarstein K, Brokstad KA, Hjelmstrom P, Wahren-Herlenius M, Jonsson R: Cellular basis of ectopic germinal center formation and autoantibody production in the target organ of patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2003, 48:3187-3201.

4- Barone F, Bombardieri M, Manzo A, Blades MC, Morgan PR, Challacombe SJ, Valesini G, Pitzalis C: Association of CXCL13 and CCL21 expression with the progressive organization of lymphoid-like structures in Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2005, 52:1773-1784.

5-Skopouli FN, Dafni U, Ioannidis JP, Moutsopoulos HM. Clinical evolution, and morbidity and mortality of primary Sjogren's syndrome. *Semin Arthritis Rheum* 2000; 29: 296-304.

6-Asmussen K, Andersen V, Bendixen G, et al. A new model for classification of disease manifestations in primary Sjögren's syndrome: evaluation in a retrospective long-term study. *Journal of Internal Medicine* 1996; 239(6):475-82.

7-Al-Hashimi I. Xerostomia secondary to Sjögren's syndrome in the elderly: recognition and management. *Drugs and Aging* 2005; 22(11):887-99.

8- Ramos-Casals M, Tzioufas AG, Font J. Primary Sjögren's syndrome: new clinical and therapeutic concepts. *Ann Rheum Dis*. 2005;64:347-54.

9- Skopouli FN, Dafni U, Ioannidis JP, Moutsopoulos HM. Clinical evolution, and morbidity and mortality of primary Sjögren's syndrome. *Semin Arthritis Rheum*. 2000;29:296-304.

10- Kruize AA, Hene RJ, Van der Heide A, Boedtsch C, De Wilde PC, VanBijsterveld OP, et al. Long-term follow-up of patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum*. 1996;39:297-303.

11- Gannot G, Lancaster HE, Fox PC. Clinical course of primary Sjögren's syndrome: salivary, oral, and

serologic aspects. *J Rheumatol*. 2000;27:1905-9.

12-García-Carrasco M, Ramos-Casals M, Rosas J, Pallarés L, Calvo-Alen J, Cervera R, et al. Primary Sjögren syndrome: clinical and immunologic disease patterns in a cohort of 400 patients. *Medicine (Baltimore)*. 2002;81:270-80.

13- Davidson BKS, Kelly CA, Griffiths ID. Primary Sjögren's syndrome in the North East of England: a long-term follow-up study. *Rheumatology*. 1999;38:245-53.

14-Tzioufas AG, Boumba DS, Skopouli FN, Moutsopoulos HM. Mixed monoclonal cryoglobulinemia and monoclonal rheumatoid factor cross-reactive idiotypes as predictive factors for the development of lymphoma in primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum*. 1996;39:767-72.

15-Ramos-Casals M, Cervera R, Yagüe J, García-Carrasco M, Trejo O, Jiménez S, et al. Cryoglobulinemia in primary SS: prevalence and clinical characteristics in a series of 115 patients. *Semin Arthritis Rheum*. 1998;28:200-5.

16-Tsokos M, Lazarou S, Moutsopoulos HM. Vasculitis in primary Sjögren's syndrome. *Am J Pathol*. 1987;88:26-31.

17- Molina R, Provost TT, Alexander EL. Two types of inflammatory vascular disease in Sjögren's syndrome. Differential association with seroreactivity to rheumatoid factor and antibodies to Ro (SS-A) and with hypocomplementemia. *Arthritis Rheum*. 1985;28:1251-8.

18- Alexander EL, Provost TT, Sanders ME, Frank MM, Joiner KA. Serum complement activation in central nervous system disease in Sjögren's syndrome. *Am J Med*. 1988;85:513-8.

19-Kassan SS, Thomas TL, Moutsopoulos HM, Hoover R, Kimberly RP, Budman DR, et al. Increased risk of lymphoma in sicca syndrome. *Ann Intern Med*. 1978;89:888-92.

20- Valesini G, Priori R, Bavoillot D, Osborn J, Danielli MG, Del Papa N, et al. Differential risk of non-Hodgkin's lymphoma in Italian patients with primary Sjögren's syndrome. *J Rheumatol*. 1997;24:2376-80.

21-Theander E, Henriksson G, Ljungberg O, Mandl T, Manthorpe R, Jacobsson LT. Lymphoma and other malignancies in primary Sjögren's syndrome: a cohort study on cancer incidence and lymphoma predictors. *Ann Rheum Dis*. 2006;65:796-803.

22- Pertovaara M, Pukkala E, Laippala P, Miettinen A, Pasternack A. A longitudinal cohort study of Finnish patients with primary Sjögren's syndrome: clinical, immunological and epidemiological aspects. *Ann Rheum Dis*. 2001;60:467-72.

23- Kauppi M, Pukkala E, Isomaki H. Elevated incidence of hematologic malignancies in patients with Sjögren's syndrome compared with patients with rheumatoid arthritis. *Cancer Causes Control*. 1997;8:201-4.

- 24-Lazarus MN, Robinson D, Mak V, Moller H, Isenberg DA. Incidence of cancer in a cohort of patients with primary Sjögren's syndrome. *Rheumatology (Oxford)*. 2006;45:1012-5.
- 25-Youinou and Pers . Disturbance of cytokine networks in Sjogren's síndrome. *Arthritis Research & Therapy* 2011, 13:227
- 26-Kang et al. Impact of interleukin-21 in the pathogenesis of primary Sjogren's syndrome: increased serum levels of interleukin-21 and its expression in the labial salivary glands *Arthritis Research & Therapy* 2011, 13:R179
- 27-Brito-Zerón P, Ramos-Casals M, Bove A, Sentis J, Font J. Predicting adverse outcomes in primary Sjögren's syndrome: identification of prognostic factors. *Rheumatology*. 2007;46:1359-62)
- 28-Anderson LG, Talal N. Thespectrum of benign to malignant lymphoproliferation in Sjögren's syndrome. *Clin Exp Immunol*. 1972;10:199-221.
- 29- Skopouli FN, Dafni U, Ioannidis JP, Moutsopoulos HM. Clinical evolution, and morbidity and mortality of primary Sjögren's syndrome. *Semin Arthritis Rheum*. 2000;29:296-304
- 30-M. Ramos Casals – M. García Carrasco. Significado clínico de las alteraciones analíticas en el Síndrome de Sjogren. *Rev Esp Reumatol* 2002; 29(7):343-55
- 31-Chiara Baldini, Laura Guisti. Proteomic analysis of saliva: a unique tool to distinguish primary Sjögren's syndrome from secondary Sjögren's syndrome and other sicca syndromes. Baldini et al. *Arthritis Research & Therapy* 2011, 13:R194
- 32-J-E Gottenberg, M Busson. Correlation of serum B lymphocyte stimulator and β 2microglobulin with autoantibody secretion and systemic involvement in primary Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2005;64:1050-1055. doi: 10. 1136/ard.2004.030643
- 33 -Jacques-Eric Gottenberg, Raphaele Seror. Serum Levels of β 2microglobulin and Free Light Chains of Immunoglobulins Are Associated with Systemic Disease Activity in Primary Sjögren's Syndrome. Data at Enrollment in the Prospective ASSESS Cohort. www.plosone.org May 2013 | Volume 8 | Issue 5 | e59868
- 34- Michalski JP, Daniels TE, Talal N, Grey HM. β 2 microglobulin and lymphocytic infiltration in Sjogren's syndrome. *N Engl J Med* 1975; 293:1228-31)
- 35- Bianucci G, Campana G, Maddali-Bongi S, D'Agata A, Pradella F, Colafranceschi M, Castagnoli A. Serum beta 2-microglobulin and HLA alloantigens in primary Gougerot-Sjogren syndrome . A possible relation with HLA-DR3 specificity *Rev Rhum Mal Osteoartic* 1991;58:339-4)
- 36- Lahdensuo A, Korpela M. Pulmonary findings in patients with primary Sjogren's syndrome. *Chest* 1995;102:316-9)
- 37- Ioannidis JP, Vassiliou VA, Moutsopoulos HM. Long-term risk of mortality and lymphoproliferative disease and predictive classification of primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum*. 2002;46:741-7.
- 38- Evolución y pronóstico del paciente con síndrome de Sjögren primario Pilar Brito-Zeróna y Manuel Ramos-Casals *Med Clin (Barc)*.2008;130(3):109-15).
- 39- A Critical Appraisal of Current Practice in the Detection, Analysis, and Reporting of Cryoglobulins Vermeersch P, Gijbels K, Godelieve M, Rod L, Egner W, White P and Bossuyt X *Clinical Chemistry* 54:1 39–43 (2008)
- 40- Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, et al. Classification criteria for Sjögren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis* 2002;61:554–8.
- 41- - Pertovaara M, Korpela M. Serum β 2 microglobulin correlates with the new ESSDAI in patients with Sjögren's syndrome *Ann Rheum Dis* 2011 Vol 70 No 12: 2236-2237
- 42- Pertovaara M, Korpela M, Pasternack A. Factors predictive of renal involvement in patients with primary Sjögren's syndrome. *Clin Nephrol* 2001;56:10–18
- 43- Lahdensuo A, Korpela M. Pulmonary findings in patients with primary Sjögren's syndrome. *Chest* 1995;108 :316–19.