

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



TESIS

EXPRESIÓN DE PD-1 Y PD-L1 EN BIOPSIAS DE  
GLÁNDULAS SALIVALES DE PACIENTES CON  
DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE SÍNDROME DE  
SJÖGREN.

POR:  
DR. ODILÓN SUÁREZ ALFARO

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE  
ESPECIALISTA EN ANATOMÍA PATOLÓGICA Y  
CITOPATOLOGÍA

MARZO 2023.

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



**HOSPITAL UNIVERSITARIO  
"DR. JOSÉ ELEUTERIO GONZÁLEZ"  
SERVICIO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA Y CITOPATOLOGÍA**

TESIS

## **EXPRESIÓN DE PD-1 Y PD-L1 EN BIOPSIAS DE GLÁNDULAS SALIVALES DE PACIENTES CON DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE SÍNDROME DE SJÖGREN.**

**PRESENTA**

**Dr. ODILÓN SUÁREZ ALFARO**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA  
EN ANATOMÍA PATOLÓGICA Y CITOPATOLOGÍA**

**DIRECTOR: DR. MED LUIS ÁNGEL CECEÑAS FALCÓN  
CO DIRECTORES: DR. ÁLVARO BARBOSA QUINTANA,**

**DRA. JANETT RIEGA TORRES, DRA. BRENDA ROXANA  
VÁZQUEZ FUENTES.**

MONTERREY, N.L., MÉXICO MARZO, 2023

**I.1.- Título del proyecto:**

**EXPRESIÓN DE PD-1 Y PD-L1 EN BIOPSIAS DE GLÁNDULAS SALIVALES DE PACIENTES CON DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE SÍNDROME DE SJÖGREN.**

**I.2.- Datos personales:**

- **Nombre del tesista:** Odilón Suárez Alfaro.
- **Institución de Procedencia:** Facultad de Medicina, UANL.
- **Departamento:** Anatomía patológica y citopatología.

APROBACIÓN DE TESIS



DIRECTOR DE TESIS  
DR. LUIS ANGEL CECENAS FALCÓN




CODIRECTOR DE TESIS  
DR. ALVARO BARBOSA QUINTANA



CODIRECTOR DE TESIS  
DRA. JANETT RIEGA TORRES



CODIRECTOR DE TESIS  
DRA. BRENDA ROXANA VÁZQUEZ FUENTES



JEFE DE SERVICIO O DEPARTAMENTO  
DRA. MED. ORALIA BARBOZA QUINTANA



COORDINADOR DE ENSEÑANZA  
DRA. NATALIA VILCHES CISNEROS



DR. MED. FELIPE ARTURO MORALES MARTINEZ  
SUBDIRECTOR DE ESTUDIOS DE POSGRADO

## AGRADECIMIENTOS:

Muchas gracias a todos en el departamento de patología por aportar algo en mi formación como patólogo y en esta tesis.

A las secretarias que son el frente del departamento, siempre con mucho entusiasmo y alegría.

A los técnicos del laboratorio central y todo personal del laboratorio de inmunohistoquímica, que con gran esfuerzo a pesar de todo el trabajo diario me apoyaron con las peticiones para el desarrollo de este trabajo.

A los profesores, los nuevos y los jubilados durante mi estancia en este departamento, me llevo lo mejor de todos y cada uno de ustedes.

Al Dr. Luis Ángel por sus grandes consejos, una persona a quien admiro por su trayectoria y elegancia.

Gracias al departamento de reumatología por todos sus aportes y sabiduría, el orden con el que ustedes trabajan y la empatía que tienen con cada paciente reflejan su excelencia.

A mis compañeros residentes.

A mis padres y hermanos que están por siempre en mi corazón.

Y en especial a cada paciente que forma parte de este trabajo.

# Dedicatoria

En memoria de Jesús Alejandro Arizpe Niño.

No se puede pasar desapercibido.

Tu estancia corta en nuestro departamento concluyó una etapa en tu formación como médico que hubiera sido grandiosa, de eso estoy seguro.

Gracias por todos tus aportes en este trabajo, que sin ti no pudo haber sido y en especial gracias por alegrar todos los días que estuvimos trabajando juntos, recordaré cada momento con cariño y nos volveremos a ver en algún otro punto del universo, que en paz descanses amigo.

# EXPRESIÓN DE PD-1 Y PD-L1 EN BIOPSIAS DE GLÁNDULAS SALIVALES DE PACIENTES CON DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE SÍNDROME DE SJÖGREN.

**PRESENTA**  
**Dr. ODILÓN SUÁREZ ALFARO**

Este trabajo se realizó en el **Servicio de Anatomía Patológica y Citopatología** del **Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”** bajo la dirección del Dr. Med. Luis Ángel Ceceñas Falcón.

Con la ayuda del

Servicio de Reumatología del Hospital Universitario



---

Dra. Med. Oralía Barboza Quintana.  
Jefe del Servicio de Anatomía Patológica y Citopatología.

Marzo 2023.

# ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	10
MARCO TEORICO	11
HISTORIA	11
DEFINICIÓN	12
SÍNDROME DE SJÖGREN	13
PD1 Y PDL1	14
EPIDEMIOLOGÍA	15
FISIOPATOLOGÍA	16
DIAGNÓSTICO	16
JUSTIFICACIÓN	19
OBJETIVOS	19
HIPOTESIS	20
MATERIAL Y METODOS	21
CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN	21
TAMAÑO DE LA MUESTRA	22
ANALISIS ESTADÍSTICO	23
METODOLOGÍA	23

INTERPRETACIÓN	26
ASPECTOS ÉTICOS	29
RESULTADOS	30
DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN	39
BIBLIOGRAFÍA	40



## Indice de tablas y figuras pag

Tabla 1. Criterios ACR/EULAR 2016 contra criterios 2002 AECG.....	17
Tabla 2. Tamaño de muestra.....	22
Tabla 3. Asociación PD1 y PDL1 con AntiRo y AntiLA positivos.....	38
Tabla 4. Asociación PD1 y PDL1 con biopsia positiva.....	38
Figura 1. Metodología de selección de bloques.....	25
Figura 2. Positividad para PDL1.....	27
Figura 3. Controles utilizados.....	27
Figura 4. Total de casos.....	30
Figura 5. Análisis descriptivo del infiltrado inflamatorio.....	31
Figura 6. Niveles de anticuerpos en Síndrome de Sjögren primario.....	32
Figura 7. Niveles de anticuerpos en Síndrome seco.....	32
Figura 8. Inicio y duración de Síntomas.....	33
Figura 9. Frecuencia de Test de Schirmer.....	34
Figura 10. Frecuencia de Tinción conjuntival.....	34
Figura 11. Frecuencia de flujo salival.....	34
Figura 12. Casos positivos.....	35
Figura 13. Casos negativos.....	35
Figura 14. Positividad en Síndrome de Sjögren.....	36
Figura 15. Positividad en Síndrome Seco.....	36
Figura 16. Positivos de PDL1 en síndrome seco.....	37
Figura 17. Positivos de PD1 en síndrome seco.....	37

# Resumen

## ANTECEDENTE

El Síndrome de Sjögren es una enfermedad autoinmune que afecta las glándulas salivales y lagrimales, la cual clínicamente se manifiesta con fatiga, ojos secos y resequedad oral, afecta de 0.3 a 3% de la población, con una predilección de afectación en mujeres. El diagnóstico de este síndrome se realiza por medio de algunos parámetros clínicos e histopatológicos que en conjunto otorgan una puntuación, la interpretación de ambas ayuda a sugerir la presencia de este síndrome en el paciente, dependiendo de la cantidad del puntaje otorgado, el paciente puede o no ser diagnosticado con síndrome de Sjögren.

## JUSTIFICACIÓN

Actualmente existen pocos estudios histopatológicos que utilizan técnicas de inmunohistoquímica en las biopsias de pacientes con síndrome de Sjögren. Si bien la fisiopatología de la enfermedad no esta comprendida del todo, muchos de los mecanismos desencadenantes de esta tienen que ver con la regulación del proceso de inflamación.

## OBJETIVO

Esto desde el punto de vista celular se pretende estudiar mediante las técnicas de inmunohistoquímica para PD1 y PDL1, los cuales son mediadores marcados por inmunohistoquímica que regulan la respuesta inmunitaria del cuerpo, aunado a esto se pretende como un objetivo secundario, ver como esta expresión en las biopsias de los pacientes con síndrome de sjögren se relaciona con la clasificación clínica del paciente.

## MATERIAL Y METODOS

Se incluyeron 38 biopsias de pacientes con diagnóstico de síndrome de Sjögren y 46 biopsias de pacientes con diagnóstico de Síndrome Seco de 2014 a 2020, sobre los cuales se realizo por IHQ tinción para PD1 y PDL1 y se relaciono concriterios clinicos para el diagnostico de síndrome de Sjögren.

## RESULTADOS

Pudimos observar positividad en 37 casos para PDL1 y 35 para PD1 en pacientes con Síndrome de Sjögren de los 38 evaluados; para Síndrome Seco se observo positividad solo en 10 casos para PDL1 y 18 para PD1, de los 46 evaluados. Teniendo 78% de los casos negativos para PDL1 y 61% negativos para PD1.

## CONCLUSIÓN

Existe una asociación entre expresión de PDL1 y PD1 con criterios mayores y menores estadísticamente significativo con  $P < 0.001$ . Lo cual ayuda a comprender mejor la fisiopatología de la enfermedad y posteriormente el uso de terapias blanco en estos pacientes.

# Marco teórico

## Antecedentes

### Historia.

El síndrome de Sjögren lleva el nombre de Henrik Sjögren (1899-1986), quien a mediados de 1900 fuera oftalmólogo sueco que identificó en un grupo de mujeres y correlacionó la tríada de queratoconjuntivitis sicca, xerostomía y poliartritis.<sup>1</sup>

En 1925 identificó los síntomas clásicos de su primer paciente que llevarían su nombre y cuyo nombre lleva el epónimo. En 1933 escribió su tesis "Zur Kenntniss der Keratoconjunctivitis Sicca" en la cual reconocía 19 pacientes con queratoconjuntivitis sicca.<sup>2</sup>

Sicca es una palabra latina definida como sequedad y se usó junto con la queratoconjuntivitis para acuñar el término queratoconjuntivitis sicca que define la sequedad de la córnea y la conjuntiva, la manifestación de la tríada de la enfermedad de Sjögren.

No fue si no hasta 18 años mas tarde posterior a su trabajo inicial, que el Dr H. Sjögren obtuvo reconocimiento por la publicación de su trabajo inicial en ingles, la cual se llevo a cabo en 1943 otorgandole además el título de profesor honorario en la universidad de Gotemburgo.

Algunos registros de lo que actualmente conocemos como síndrome de Sjögren se pueden encontrar previo a Henrik Sjögren; en 1871 se reconoce el primer caso de ojo y boca secos de Dr. W. B. Hadden (1856–1893) y J.W. Hutchinson.<sup>3</sup> El alemán Theodor Karl Gustav von Leber (1840-1917) describió por primera vez una inflamación seca de la superficie ocular bajo el nombre de "queratitis filamentosa" en 1882. El cirujano polaco Jan Mikulicz-Radecki describió el caso de un hombre con agrandamiento bilateral de las glándulas parótida y lagrimal asociadas con un infiltrado de células pequeñas y redondas<sup>4, 10</sup>

## Definición.

La inflamación se reconoce como una respuesta del organismo frente a diferentes lesiones ya sean infecciones o agentes externos, que aporta células y moléculas del mismo huésped desde su circulación para atacar y eliminarlos; aunque en condiciones normales su propósito es protegernos, hay circunstancias donde la reacción inflamatoria es la causante principal de la enfermedad misma. Si bien la inflamación termina cuando el agente que infringe daño se retira, en algunas ocasiones hay falla en mediación de la inflamación.

La inflamación se divide en inflamación aguda con tres propósitos principales: dilatación vascular y aumento de flujo, aumento en permeabilidad vascular para facilitar la salida de moléculas en circulación y finalmente migración de leucocitos al sitio lesivo con su posterior activación y eliminación del agente causal.

Después tenemos a la inflamación crónica la cual es de respuesta más bien prolongada de semanas a meses y se combina la inflamación con daño tisular e intentos de reparación.

Por lo tanto el sistema inmunitario es el encargado de defender el cuerpo de los patógenos mediante la respuesta inmunitaria la cual se divide en respuesta innata o nativa (proporcionan una primera línea de defensa compuesta de barreras epiteliales así como linfocitos NK, fagocitos y células dendríticas) y la respuesta adquirida o específica (se divide en dos la respuesta humoral o extracelular mediada por anticuerpos de productos de linfocitos B y la respuesta celular o mediada por linfocitos T, ambos con función más especializada y potente que la primera línea de defensa) que tiene la participación de linfocitos T CD4+ colaboradores que ayudan a producir anticuerpos, activan macrófagos y regulan la respuesta inmunitaria, además la participación de linfocitos T CD8+ citotóxicos que directamente matan a las células con expresión de antígenos. Es importante mencionar que las respuestas mediadas por linfocitos T están reguladas por un

equilibrio entre sus receptores que son co-estimuladores como CD28 y otros que son co-inhibidores como CTLA-4 y PD-1.

Autoinmunidad es un termino que se refiere a reacciones inmunes contra antigenos propios, este termino se comparte con un grupo de enfermedades en las cuales existe un fallo en la tolerancia inmunitaria, ya que en individuos normales la tolerancia inmunitaria otorga una falta de respuesta frente a antigenos propios, estas enfermedades estan mayormente destinados a pacientes con genes predisponentes como los ligados a locus HLA-DR y HLA-DQ en cuyos casos su asociación con estas confiere una mayor probabilidad de padecer una enfermedad autoinmune que un sujeto que no la haya heredado; en cuanto a los factores ambientales mas que nada se encuentran las infecciones, radiación UV, el tabaco y frecuentemente el sexo femenino.<sup>7</sup>

El síndrome de Sjögren (SS) es una enfermedad sistémica crónica caracterizada por la infiltración mononuclear de las glándulas exocrinas, especialmente las glándulas salivales y lagrimales, responsables del síndrome seco y manifestaciones sistémicas.

El SS puede ser "primario" si ocurre solo (pSS) o "secundario" (sSS) cuando se asocia con otra enfermedad autoinmune.<sup>5</sup>

Existen otras formas de presentación de la enfermedad como lo son en debutar con complicaciones de manifestaciones sistémicas tales como alteraciones cutáneas, nefritis intersticial, síndrome constitucional, artralgias, debilidad muscular, neuropatías, linfadenopatía e incluso riesgo de linfoma B en 15 a 20 más veces que la población general, debido a una activación crónica de células B, entre muchas otras.<sup>12</sup>

Los puntos de control inmunitario son especialistas inhibitorios del sistema inmune los cuales son de vital importancia para el mantenimiento de la auto-tolerancia y prevención de autoinmunidad mediante el control de la extensión, duración e

intensidad de la respuesta inmune montada, previamente se comentó de CTLA-4 y PD-1 como co-inhibidores.

## PD-1 y PDL1

PD-1 o CD279 y PDL1 o CD274 son ambas proteínas transmembrana expresadas en múltiples células inflamatorias que se activan por citocinas pro-inflamatorias, posteriormente la unión de estas dos activa la regulación a la baja en las células receptoras por lo cual inhibe la proliferación, generación y respuesta de citocinas y citotoxicidad de las células T, previniendo así el ataque dañino de autoantígenos durante una respuesta inmune.

Actualmente se estudian los microambientes tumorales en búsqueda de PDL1 y PD1 ya que algunos tumores utilizan esta vía para escapar del sistema inmunitario, y si bien PD1 y PDL1 no son los únicos co-inhibidores que utiliza el sistema inmunitario, si son un potencial blanco terapéutico en la actualidad y es por eso por lo que hoy en día cobran mucha importancia. Sin embargo, para fines de este estudio no se mencionan más los fármacos anti-PDL1 ni su conteo en microambientes tumorales.

PDL1 y PD-1 se pueden medir con diferentes métodos incluso en sangre, aunque la forma comercial más accesible hoy en día sea mediante técnicas de inmunohistoquímica, la FDA aprueba 4 diferentes anticuerpos que son 22-C3, 28-8, SP142 y SP263 en dos diferentes plataformas ya sea DAKO o VENTANA, cada una con sistema de puntajes diferente los cuales son aprobados para su uso específico en tumores con cada clona a utilizar mediante ensayos preestablecidos. Por lo cual la interpretación de esta técnica solo está pre-establecida en su uso en neoplasias para la designación posterior de algún fármaco. <sup>8</sup>

En cuanto a la asociación con PD1 y PDL1 Existe evidencia de que:

PD-1 se expresa en linfocitos infiltrantes de glándulas salivales de pacientes con Síndrome de Sjögren y PD-L1 se expresa fuertemente en el epitelio acinar y ductal de la glándula salival de pacientes con Síndrome de Sjögren, incluso distante al

foco de infiltrado inflamatorio, y este es paralelo al grado de infiltrado detectado con el método Greenspan (puntaje por focos), no observando positividad en glándulas salivales normales. Usando la clona 18B7 en población china.<sup>14</sup>

Zamani menciona una señal alterada en diferentes estudios entre PD1 y PDL1 con distintas enfermedades autoinmunes, ya que juegan un papel importante en homeostasis y señala un panorama prometedor con el uso de biológicos y terapias moduladores en respuesta a enfermedades autoinmunes en estudios experimentales.<sup>15</sup>

CMTM 6 es una proteína que se expresa en la superficie celular, participando en la regulación epigenética, el desarrollo embrionario y la tumorigénesis. CMTM6 regula la expresión de PD-L1 disminuyendo su ubiquitinación y promoviendo su vida media. Así como la sobreexpresión de PD1 y PDL1 vista en pacientes con síndrome de Sjögren, el aumento de niveles de CMTM6 supone un agotamiento de la tolerancia periférica con esta vía y una disregulación subsecuente, teniéndolo como un efecto compensatorio y según Qian como un blanco terapéutico en estos pacientes.<sup>16</sup>

## Epidemiología

pSS afecta 0.1% a 4.8% de la población con una relación mujer-hombre de 9:1, la prevalencia más comúnmente aceptada es de 0.5–1%. Mientras un metaanálisis de 7 estudios mostro que la tasa de prevalencia es realmente de 0.043%

Existe una heterogeneidad manifiesta de la incidencia de SS entre varios estudios que abarca de 3.9 a 6.9 casos por 100,000 habitantes.<sup>6, 9</sup>

Fisiopatología.

La etiología no está del todo bien comprendida, su fisiopatología se debe a pérdida de la función de las glándulas mediada por el sistema inmunológico, específicamente de las glándulas salivales y lagrimales, ciertamente explica los síntomas comunes de la boca y los ojos secos. En este ambiente inflamatorio, las células T median una destrucción directa del tejido glandular y la activación de las células B, lo que lleva a la producción de autoanticuerpos.

Actualmente existen pocos estudios histopatológicos que utilizan técnicas de inmunohistoquímica en las biopsias de pacientes con síndrome de Sjögren. Si bien la fisiopatología de la enfermedad no está comprendida del todo, muchos de los mecanismos desencadenantes de esta tienen que ver con la regulación del proceso de inflamación, ciertos mecanismos desencadenan una inflamación crónica perpetua que afecta al mismo organismo.<sup>13</sup>

Más de 20 autoanticuerpos podrían estar involucrados en las SS, pero los más comúnmente utilizados para las SS y son utilizados como diagnóstico son anti-Ro/SSA y anti-La/SSB

## DIAGNÓSTICO

Histológicamente el SS se presenta con un infiltrado inflamatorio de predominio crónico que afecta el epitelio glandular de las biopsias de glándulas salivales menores.

Inmunológicamente los anticuerpos más comunes y estudiados en pacientes con SS son los dirigidos contra los autoantígenos Ro/SSA y La/SSB. Estos dos anticuerpos se detectan en el 50% al 70% de los pacientes con SS primaria, pero el anti-La/SSB por sí solo se observa en tan sólo el 2% de los pacientes.<sup>6</sup>

No existe una prueba diagnóstica única para confirmar el diagnóstico de pSS.



Varios consensos han definido criterios de clasificación que permiten una definición común de qué es pSS, que son específicos, pero con falta de sensibilidad:

Los criterios de clasificación de American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism (ACR-EULAR) son el resultado de una colaboración internacional que finalmente son bien validados para establecer el criterio diagnóstico de pacientes con síndrome de Sjögren primario<sup>10</sup>, los cuales se pueden observar en la tabla 1. Y se puede ver comparado con criterios previamente usados en 2002 por el consenso grupal Americo-Europeo (AECG).<sup>11</sup>

Tabla 1. Criterios ACR/EULAR 2016 contra criterios 2002 AECG.

	2002 AECG	2016 ACR/EULAR	puntaje
Elementos:	1. Síntomas de sequedad ocular	Focos de inflamación con infiltración linfocítica en la glándula salival labial y $\geq 1$ foco en 4 mm <sup>2</sup> ; valoración según Daniels y cols.	3
	2. Síntomas de sequedad oral	Presencia de anticuerpos anti-SS-A/Ro.	3
	3. Síntomas oculares: Test de Schirmer $\leq 5$ mm/5 m; Puntuación $\geq 4$ en tinción rosa de Bengala (escala Bijsterveld).	Tinción conjuntival y corneal $\geq 5$ en escala de Whitcher y cols. o $\geq 4$ en escala de van Bijsterveld por lo menos en un ojo.	1
	4. Histopatología Biopsia de glándula salival (escala de Chisholm y Mason).	Prueba de Schirmer $\leq 5$ mm pasados 5 min por lo menos en un ojo.	1
	5. Alteraciones de glándulas salivales Flujo salival sin estimular	Secreción salival no estimulada valorada con el método de Navazesh y Kumar $\leq 0,1$ ml/min.	1

	de 1,5 ml o menos en 15 segundos.		
	6. Inmunología Anti-Ro/SS-A Anti-Ro/SS-B		
<b>Reglas para la clasificación</b>			
	Ausencia de criterios de exclusión	<b>Casos excluyentes:</b> irradiación anterior de cabeza y cuello, infección activa por VHC (confirmada mediante PCR), SIDA, sarcoidosis, amiloidosis, reacción de injerto contra huésped, enfermedad sistémica asociada a IgG4.	
	<b>Interpretación:</b> Presencia de 4 de cualquiera de los 6 criterios con al menos los criterios 4 o 6.	<b>Interpretación:</b> Un resultado $\geq 4$ puntos sugiere síndrome de Sjögren primario.	

## JUSTIFICACIÓN

Debido a que existen pocos marcadores por inmunohistoquímica estudiados en las biopsias que se relacionen directamente con el desarrollo del síndrome de Sjögren y a pesar de esto, algunos de estos marcadores cobran gran importancia para el diagnóstico y pronóstico en estos pacientes.

En la actualidad no se ha publicado la asociación entre los parámetros histológicos, los criterios clínicos y de laboratorio junto con la expresión de PD1/PDL1, para el síndrome de Sjögren.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO PRIMARIO

Determinar la expresión de PD1 y PD-L1 en las biopsias de glándulas salivales menores en pacientes con síndrome de Sjögren.

### OBJETIVO SECUNDARIO

Relacionar la expresión de PD-1 Y PD-L1 en biopsias de glándulas salivales menores con los criterios clínicos para la clasificación clínica en pacientes con síndrome de Sjögren.

## HIPOTESIS

- **Existe asociación en la expresión de PD-1 Y PD-L1 en biopsias de glándulas salivales menores con los criterios clínicos positivos para síndrome de Sjögren.**

## HIPOTESIS NULA

- **No existe asociación en la expresión de PD-1 Y PD-L1 en biopsias de glándulas salivales menores con los criterios clínicos positivos para síndrome de Sjögren.**

# MATERIAL Y METODOS

Tipo de estudio:

- Observacional
- Transversal.
- Descriptivo.

## Criterios de inclusión:

- Pacientes con reporte histopatológico por **biopsia de glándula salival menor** recibidos con diagnóstico clínico de Síndrome de Sjögren.
- Se obtendrá toda la información del **sistema Pathox** dentro el cual los pacientes están registrados con su número interno.
- Que se encuentren disponibles en nuestro archivo las laminillas y los **bloques con tejido suficiente**.
- Que se cuente con la **información clínica** suficiente para clasificarlo:
- Cuenten con parámetros de laboratorio (anti-Ro, anti-La), tinción conjuntival, prueba de Schirmer, flujo salival

## Criterios de exclusión:

- Bloque no disponible.
- Tejido insuficiente o con defectos de fijación.
- Casos sin información clínica.

Grupo1

Por clínica y/o estudios de laboratorio reúne criterios para síndrome de Sjögren

Biopsia: focos de inflamación >1 Sd. Sjögren

Grupo control

Por clínica y estudios de laboratorio NO reúne criterios para síndrome de Sjögren

Biopsia: focos de inflamación <1 = síndrome seco

## Tamaño de la muestra

Tabla 2. Tamaño de muestra

DIFERENCIA DE DOS PROPORCIONES				
$n = \frac{(p_1q_1 + p_2q_2)(K)}{(p_1 - p_2)^2}$				
valor P1	0.64	0.2304		n = 37.116025
valor Q1	0.36		0.0961	
valor P2	0.33	0.2211		
valor Q2	0.67			
valor K	7.9			

Se utilizó una fórmula de diferencia de dos proporciones, con el objetivo primario de: Determinar la expresión de PD1/PDL1 en las biopsias de glándulas salivales menores en pacientes con síndrome de Sjögren

Esperando una expresión de PD1/PDL1 en el 64% con síndrome de Sjögren y del 33% en pacientes sin síndrome de Sjögren, con una significancia bilateral del 5%, y un poder del 80%, se necesitan por lo mínimo 37 sujetos de estudio por grupo.

Los parámetros fueron establecidos en base a esta referencia: Qian, S., Xu, J., Zhao, S., Yang, P., & Yang, C. (2022). CMTM6: increased circulating level and up-regulated expression in labial salivary glands in patients with primary Sjogren's syndrome. *Clinical and experimental immunology*, 207(1), 65–71. <https://doi.org/10.1093/cei/uxab003>

## PLAN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En la estadística descriptiva se reportarán frecuencias y porcentajes para variables categóricas. Para las variables cuantitativas se reportarán medidas de tendencia central y dispersión (media/mediana; desviación estándar/rango intercuartil).

En la estadística inferencial se evaluará la distribución de la muestra por medio de la prueba de Kolmogórov-Smirnov.

Se compararán variables categóricas por medio de la prueba de Chi cuadrado de Pearson o test exacto de Fisher. Para las comparar grupos independientes se utilizarán las pruebas de t-Student y/o U de Mann Whitney. Se utilizarán modelos de regresión logística para predecir la mortalidad entre los grupos.

Se considerará un valor de  $p \leq 0.05$  y un intervalo de confianza al 95% como estadísticamente significativo. Se utilizará el paquete estadístico SPSS versión 25.

## Descripción de metodología del estudio:

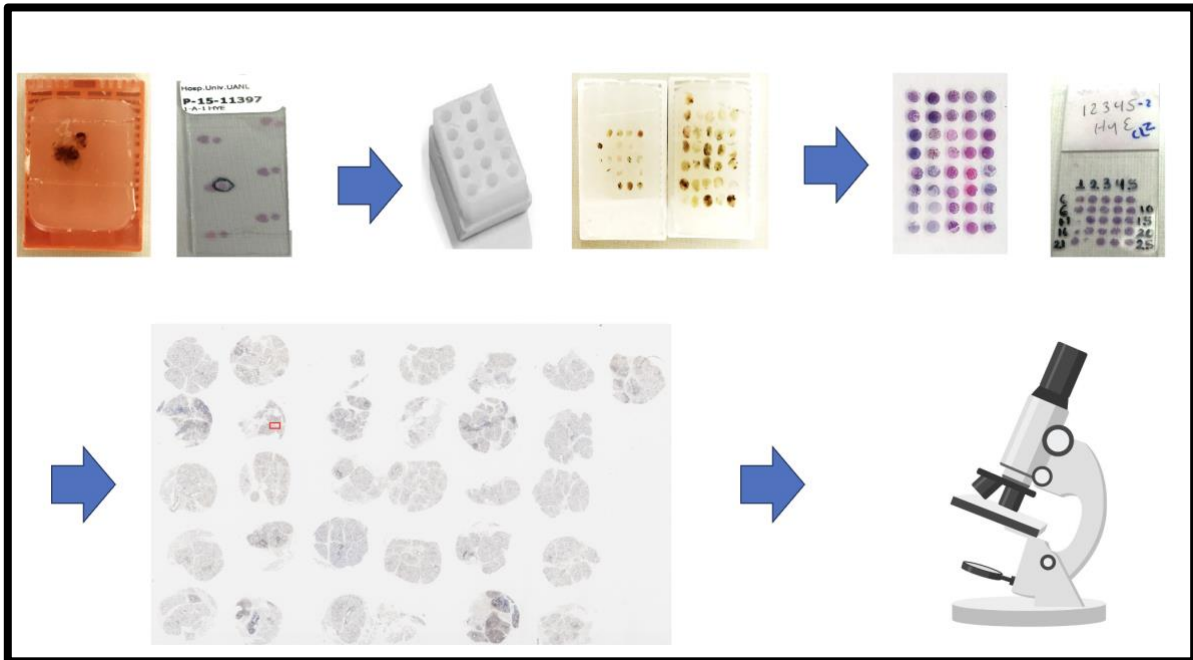
Se realizó una búsqueda retrospectiva de casos en el sistema Pathox (TesiUpDate®) del servicio de Anatomía Patológica y Citopatología del Hospital Universitario José Eleuterio González misma que se complementó con la base de datos del servicio de Reumatología de los pacientes con diagnóstico clínico de Síndrome de Sjögren primario desde 2014 al 2020, se incluye todas las biopsias con datos clínicos suficientes y material disponible (que cuenten con bloques con material suficiente para realizar los estudios por inmunohistoquímica de este trabajo

y de tal forma que no se acabe el tejido y puedan ser utilizados en el futuro), se valoró nuevamente corroborando el previo diagnóstico emitido y mediante la técnica de histoarreglos se procede a organizar el material para cortar y teñir con hematoxilina y eosina, además de utilizar las tinciones de inmunohistoquímica de PDL1 SP142 y PD1 con plataforma y metodología estandarizada previamente por nuestro laboratorio. Se utiliza el sistema de tinción de inmunohistoquímica automatizado Ventana BenchMark XT, además se incluye un segundo grupo como control: los pacientes con diagnóstico de síndrome seco que tengan biopsias y que no fueron diagnosticados como síndrome de Sjögren por el servicio de Reumatología del Hospital Universitario, por no cumplir con los suficientes criterios tanto por clínica como por patología, dicho grupo se realizó de igual manera ambas tinciones de inmunohistoquímica de PDL1 SP142 y PD1 utilizando el mismo método y separando diferentes bloques y laminillas teniendo al final 433 casos de pacientes con síndrome de Sjögren y síndrome Seco con biopsias, sin embargo para ser incluidos en este trabajo de investigación, los pacientes con suficientes datos tanto por clínica ( por contar con datos como edad, laboratorios Anti-Ro, Anti-La, tiempo de duración de síntomas, pruebas de tinción conjuntival, test de Schirmer y prueba de flujo salival) así como contar con biopsias ( con material suficiente para volver a hacer un corte para hematoxilina y eosina, uno para PD1 y otro para PDL1) se obtienen al final 38 sujetos con diagnóstico de síndrome de Sjögren y 46 sujetos con diagnóstico de Síndrome Seco incluidos en el estudio.

Se obtienen 4 bloques donde se incluyen histoarreglos circulares de 3 milímetros cada uno, de cada bloque que en promedio tiene 2 biopsias las cuales en promedio miden 4 milímetros. De estos cuatro bloques se procedió a hacer cortes con microtomo de 4 micras en promedio dejando 4 laminillas para ser utilizadas de la siguiente manera: 1 para tinción de Hematoxilina y eosina, 1 para tinción de PD1, 1 para tinción de PDL1 y dejando una en blanco. Ver figura 1.



Figura 1. Metodología de selección de bloques:



**Fig1.** Se observa un bloque original del cual sobre su laminilla se selecciona el tejido para hacer un bloque conjunto con otros bloques, para en uno tener identificados varios tejidos y hacer tinciones de hematoxilina e inmunohistoquímica, para su posterior evaluación.

De cada una de las biopsias se cuenta en archivo una laminilla donde se realizó el diagnóstico original y cada una de las biopsias tiene un comentario donde se identifica el número de lóbulos glandulares observados así como, el número de infiltrado linfocítico mayor de 50 células definido como criterio mayor por Chisholm y Mason en caso de contar con este último y si estas tienen atrofia, infiltrado adiposo, fibrosis y dilatación ductal independientemente del infiltrado inflamatorio.

El servicio de reumatología además nos proporciona datos clínicos de cada paciente, así como sexo, edad, síntomas, duración de estos, tratamientos o diagnósticos agregados, estudios de laboratorio: Anti-Ro, anti-La, factor reumatoide, ANA, además de prueba de Schirmer, tinción conjuntival, flujo salival y si cumplían con criterios para diagnóstico de síndrome de Sjögren o no.

Para la realización de nuestra base de datos se toman en cuenta los siguientes parámetros antes descritos:

Biopsia con el número de infiltrados inflamatorios (linfocítico) mayor a 50 células definido con escala de Chisholm y Mason de 1 a 4, anticuerpos Anti-Ro, anti-La, prueba de Schirmer, tinción conjuntival, flujo salival con parámetros ACR/EULAR 2016 usados por el servicio de reumatología para definir positivo o negativo.

### Interpretación

El uso actual de PDL1 y PD1 así como su interpretación se basan en pruebas de ensayos para el uso de terapias blanco, por lo que las interpretaciones de estos son distintas y varían dependiendo del órgano que se está estudiando, pero su uso en su intensa mayoría se ven limitados a interpretación en tumores malignos y respuesta a terapias blanco frente a estos anticuerpos.

Por este motivo nosotros nos vemos limitados a la poca información que se tiene respecto a estas tinciones en tejidos sanos o sin tumores malignos y más específico en tejido glandular salival menor para definir como positividad.

Dentro del manual de operación e interpretación incluido en cualquier ensayo con aprobación de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA), se incluye una correcta interpretación de positividad así como control de calidad para cada prueba, la utilización de controles de tejido sano (amígdala o placenta), teniendo por definición como aceptable una positividad de moderada a intensa en células inflamatorias (linfocito o macrófago). Mismo criterio que se utiliza en nuestras biopsias para definir como positivo. Ver figura 2.

Figura 2. Positividad para PDL1:



. Criterios de evaluación de control de tejido de amígdalas.							
  <b>VENTANA PD-L1 (SP142) Assay</b> <b>REF</b> 740-4859 07709374001 <b>IVD</b>  50	<table border="1"> <thead> <tr> <th style="text-align: center;">Aceptable</th> <th style="text-align: center;">Inaceptable</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Elementos tisulares positivos: Moderados a tinción fuerte de PD-L1 observada en linfocitos y macrófagos en centros germinales, con tinción difusa en células epiteliales de criptas reticuladas.</td> <td>Fondo inespecífico excesivo tinción que oscurece la identificación de Células positivas para PD-L1.</td> </tr> <tr> <td>Elementos tisulares negativos: PD-L1 células inmunitarias negativas en el regiones interfoliulares con negativo epitelio escamoso superficial.</td> <td>Tinción de PD-L1 débil o nula observada en linfocitos y macrófagos en centros germinales y cripta reticulada células epiteliales.</td> </tr> </tbody> </table>	Aceptable	Inaceptable	Elementos tisulares positivos: Moderados a tinción fuerte de PD-L1 observada en linfocitos y macrófagos en centros germinales, con tinción difusa en células epiteliales de criptas reticuladas.	Fondo inespecífico excesivo tinción que oscurece la identificación de Células positivas para PD-L1.	Elementos tisulares negativos: PD-L1 células inmunitarias negativas en el regiones interfoliulares con negativo epitelio escamoso superficial.	Tinción de PD-L1 débil o nula observada en linfocitos y macrófagos en centros germinales y cripta reticulada células epiteliales.
Aceptable	Inaceptable						
Elementos tisulares positivos: Moderados a tinción fuerte de PD-L1 observada en linfocitos y macrófagos en centros germinales, con tinción difusa en células epiteliales de criptas reticuladas.	Fondo inespecífico excesivo tinción que oscurece la identificación de Células positivas para PD-L1.						
Elementos tisulares negativos: PD-L1 células inmunitarias negativas en el regiones interfoliulares con negativo epitelio escamoso superficial.	Tinción de PD-L1 débil o nula observada en linfocitos y macrófagos en centros germinales y cripta reticulada células epiteliales.						

Fig2. Manual de proceso para la clona SP142 de ventana en pagina de la FDA, definicion de positividad en tejido control.

Cada uno de los bloques se incluye tejidos de amígdala con controles aceptados para comprobar la positividad de cada una de las biopsias estudiadas. Ver figura 3.

Figura 3. Controles utilizados:

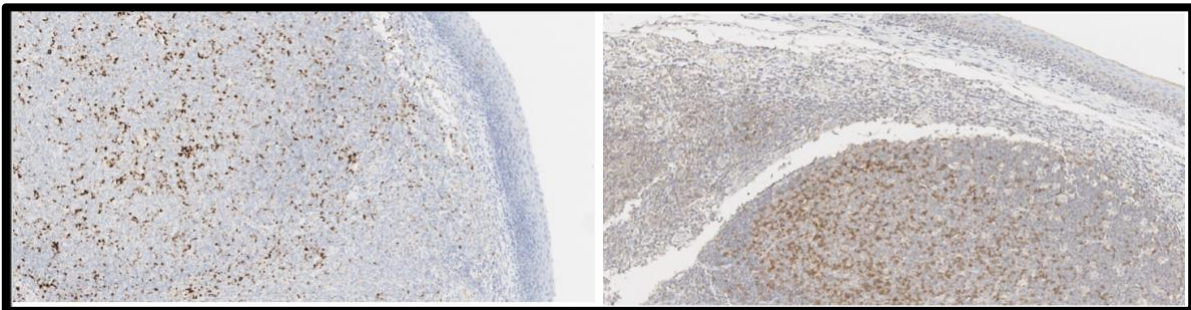


Fig3. Estos son los controles adecuados (tejido amígdala) que se utilizaron para PDL1 y para PD1, interpretando positividad para cualquier célula inmune con tinción moderada a intensa (ver figura 2).

Esta interpretación queda a cargo de dos patólogos con experiencia en la interpretación técnicas de inmunohistoquímica así como en biopsias de glándulas salivales menores.

# VARIABLES

## Variables dependientes

- Diagnóstico clínico de síndrome de sjögren.

## Variables independientes

- Expresión de PD1 y PDL1 por inmunohistoquímica.
- Infiltrado inflamatorio en biopsias mediante el grado de CHISHOLM Y MASON evaluado por patología.
- Niveles de anticuerpos en sangre de Anti-Ro y Anti-La.
- Test de Schirmer, flujo salival y tinción conjuntival.

Sin texto

## Aspectos éticos y mecanismo para proteger la confidencialidad de la información:

Siguiendo lo establecido por la ley general de salud en materia de investigación para la salud, La Norma Oficial Mexicana (NOM-012-SSA3-2012) se protege la confidencialidad de los sujetos del proyecto de investigación por medio de un sistema de numeración interna que el servicio de patología utiliza una vez que recibe el espécimen hasta emitir el diagnóstico, de tal forma que sin tener que utilizar información personal del paciente, y solo por el personal de patología, se puede identificar las muestras utilizadas en el estudio. Ningún dato personal como nombre, dirección o teléfono estarán en la base de datos y/o publicación que se derive.

Sin texto

## Resultados

De un total de 433 casos con material desde 2014 a 2021. 50 pacientes con diagnóstico de síndrome de Sjögren y 50 pacientes con diagnóstico de Síndrome seco fueron incluidos por tener suficientes datos clínicos, sin embargo por cuestión técnica solo se pudo evaluar 38 SSP y 46 SS (ver figura 4).

Figura 4. Total de casos

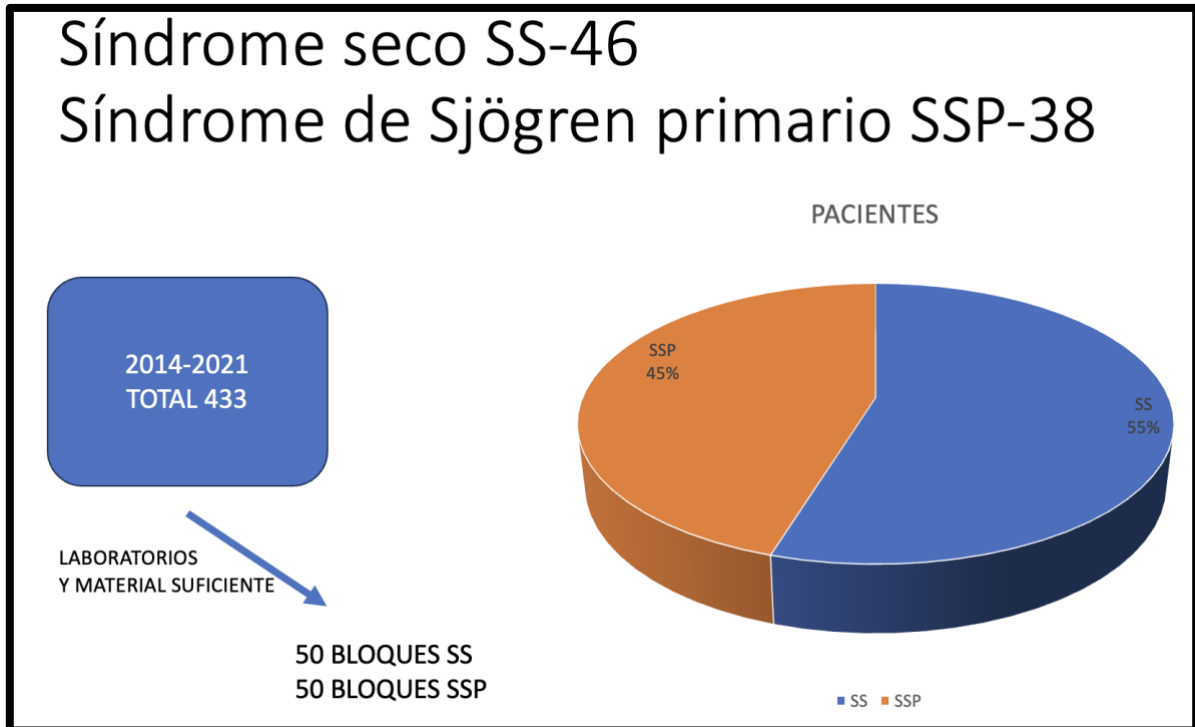


Fig4, de 50 bloques de pacientes con SS y SSP, 46 y 38 respectivamente fueron capaces de ser evaluados por inmunohistoquímica.

SS. Síndrome seco. SSP. Síndrome de Sjögren primario.

De estos pacientes previamente se realizó un análisis del infiltrado inflamatorio como criterio mayor definiendo el grado de CHISHOLM Y MASON, estos autores en 1968 describieron en autopsias de pacientes con síndrome de Sjögren tener un foco de al menos 50 células (linfocitos) haciendo un puntaje de entre 0 a 4, entendiendo como 0, sin focos. 1, infiltrado discreto y menor a un foco. 2, infiltrado moderado y menor a un foco. 3, un foco de 50 linfocitos. 4 infiltrado intenso y mayor a un foco. Por lo tanto 3 y 4 son considerados como un criterio mayor positivo y 0-2 negativo.<sup>17</sup> Ver figura 5

Figura 5. Análisis descriptivo del infiltrado inflamatorio:

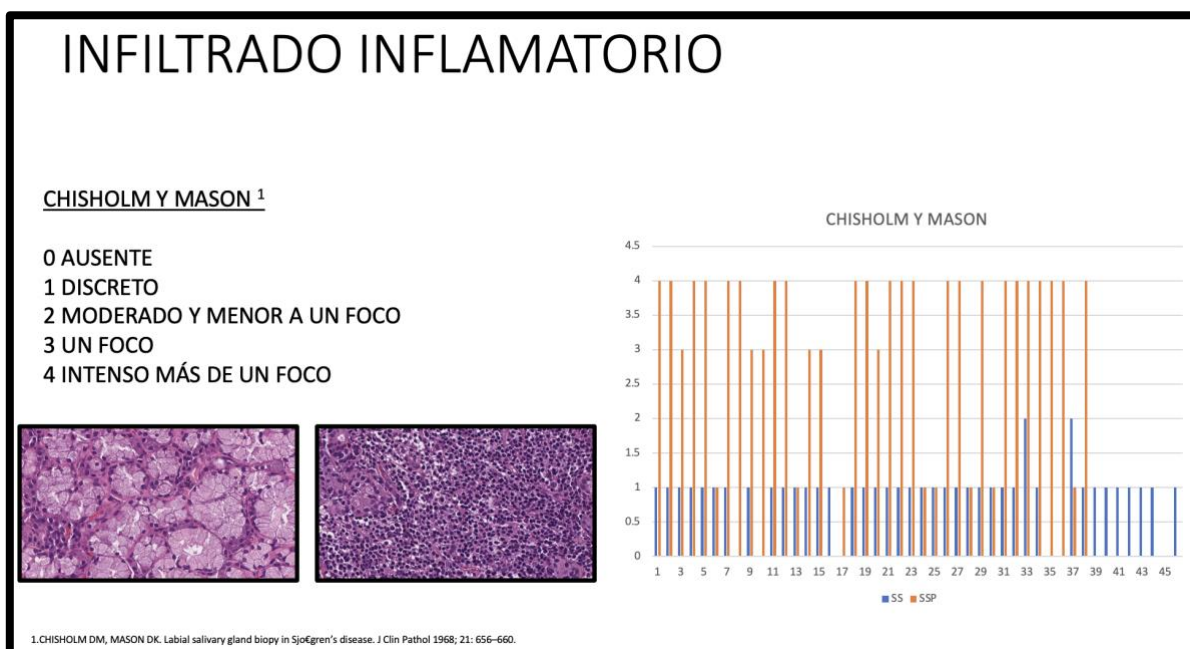


Fig5, Imagen histológica representativa de un caso negativo y un caso positivo, respectivamente en HyE, mediante el uso del método Chisholm y Mason. En la gráfica se observa en color naranja los casos que fueron diagnosticados como Síndrome de Sjögren primario (SSP) y en azul como Síndrome Seco (SS).

La medición de los anticuerpos en suero de los pacientes que fueron diagnosticados como Síndrome seco y Síndrome de Sjögren primario pueden verse en las figuras 6 y 7.

Figura 6 niveles de anticuerpos en Síndrome de Sjögren primario:

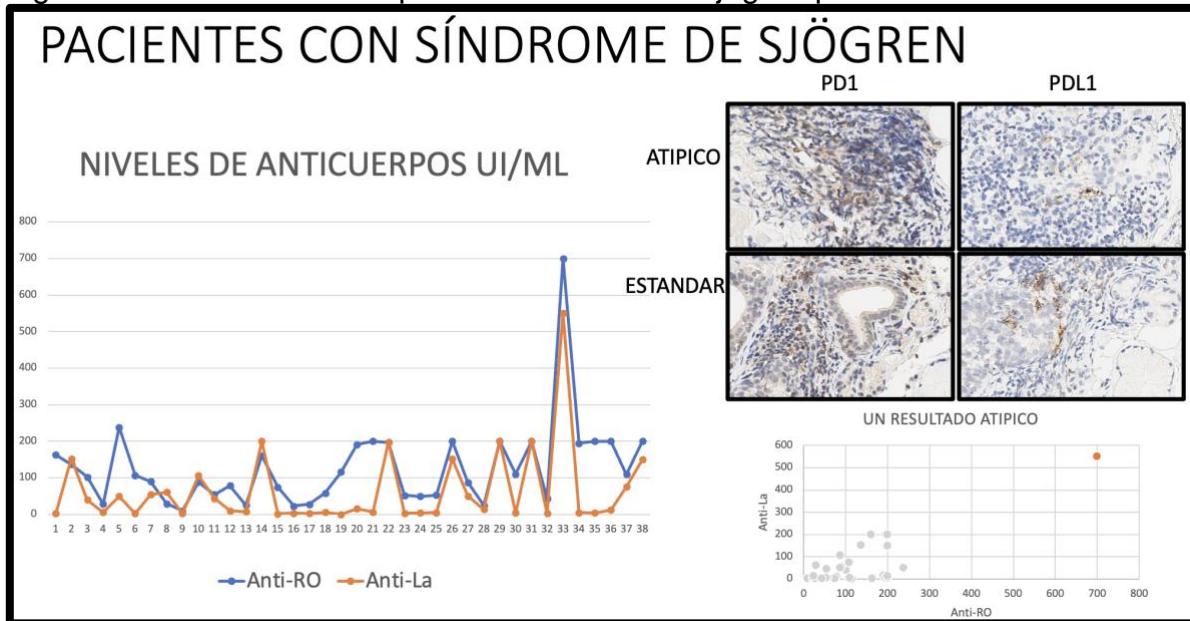


Figura 7. Niveles de anticuerpos en Síndrome seco:

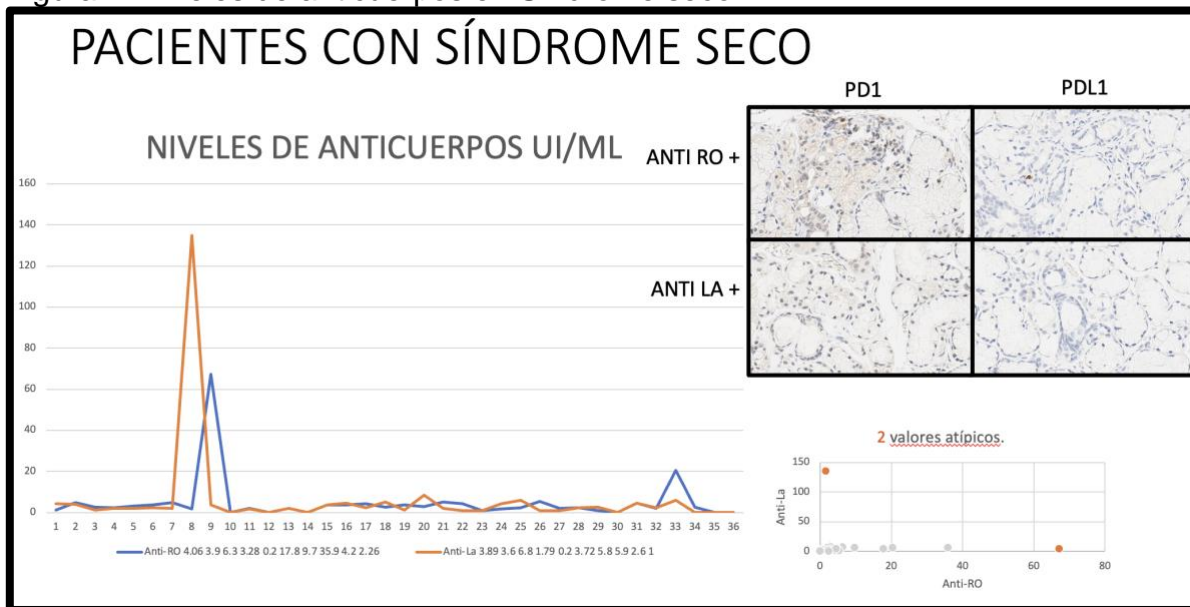


Fig6, en Síndrome de Sjögren primario se ven valores desde 9 hasta 700 UI/ML para anti-Ro y de 0 a 550 UI/ML para anti-La con valores atípicos muy altos vistos también en inmunohistoquímica.  
 Fig7, en Síndrome Seco se ven valores desde 0 hasta 67 UI/ML para anti-Ro y de 0 a 134 UI/ML para anti-La con valores atípicos muy altos vistos también en inmunohistoquímica.



En cuanto a inicio y duración de los síntomas no hay mucha diferencia entre pacientes con síndrome de Sjögren y pacientes con Síndrome seco (ver figura 8)

Figura 8, inicio y duración de Síntomas:

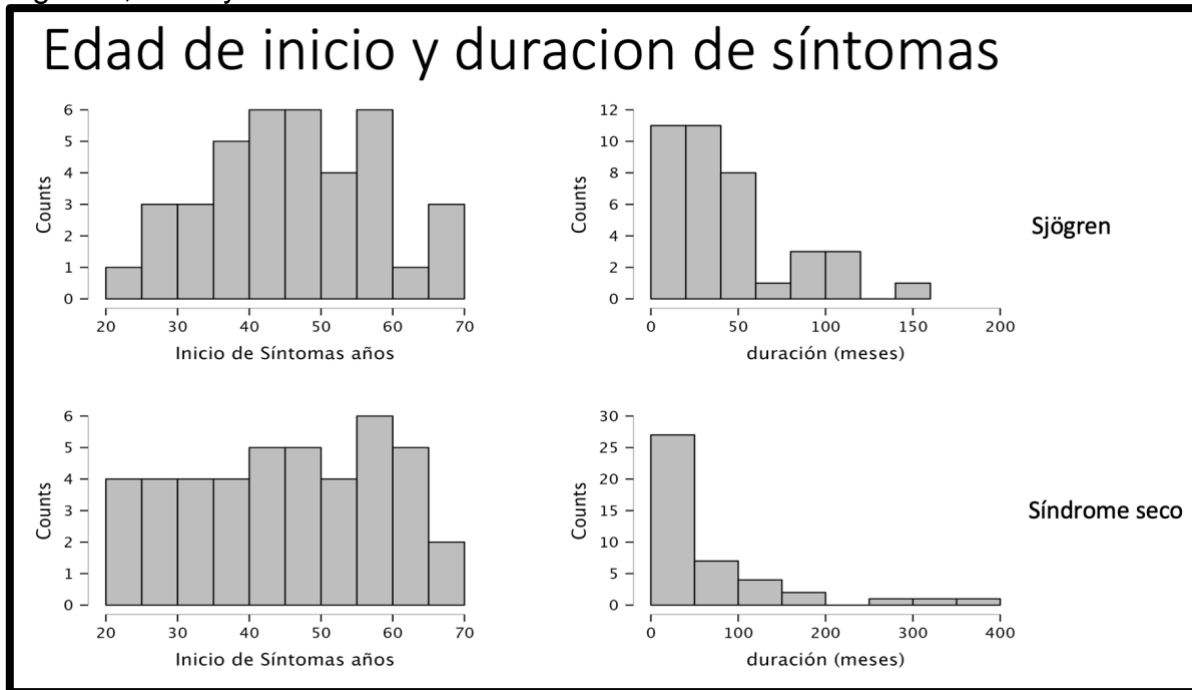


Fig8, gráficas de distribución de edad a la cual fueron diagnosticados (entre 20 y 70 años) y cuanto tiempo duraban los pacientes con síntomas (entre 3 meses a 400 meses).

Otros datos descriptivos (criterios menores) como:

- Prueba de Schirmer  $\leq 5$  mm pasados 5 min por lo menos en un ojo.
- Tinción conjuntival y corneal  $\geq 5$  en escala de Witcher y cols. o  $\geq 4$  en escala de van Bijsterveld por lo menos en un ojo.
- Secreción salival no estimulada valorada con el método de Navazesh y Kumar  $\leq 0,1$  ml/min.

Se pueden observar con las siguientes graficas de frecuencias en las figuras 9,10 y 11.

Sin texto

Figura 9. Frecuencia de Test de Schirmer.

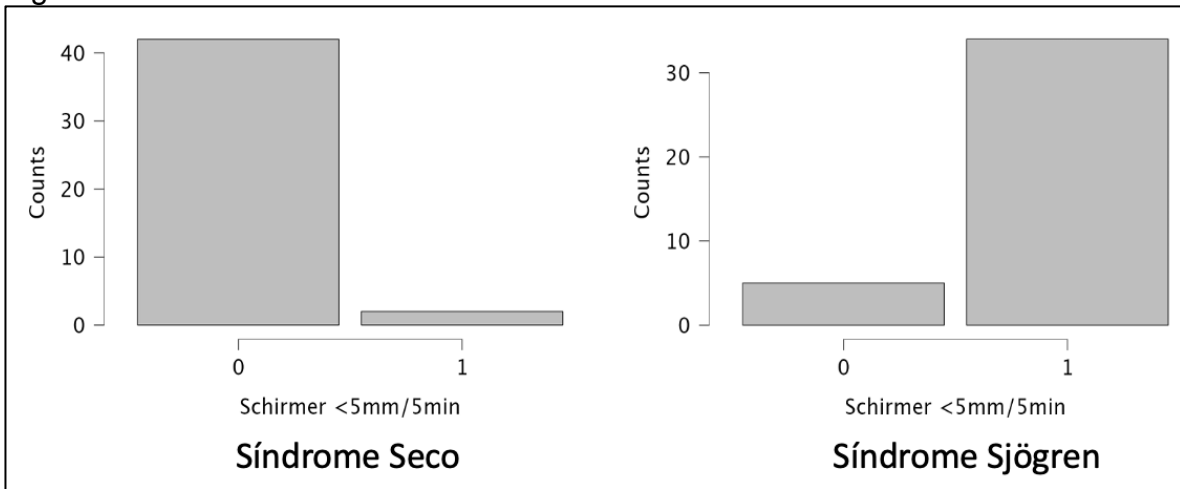


Figura 10. Frecuencia de Tinción conjuntival.

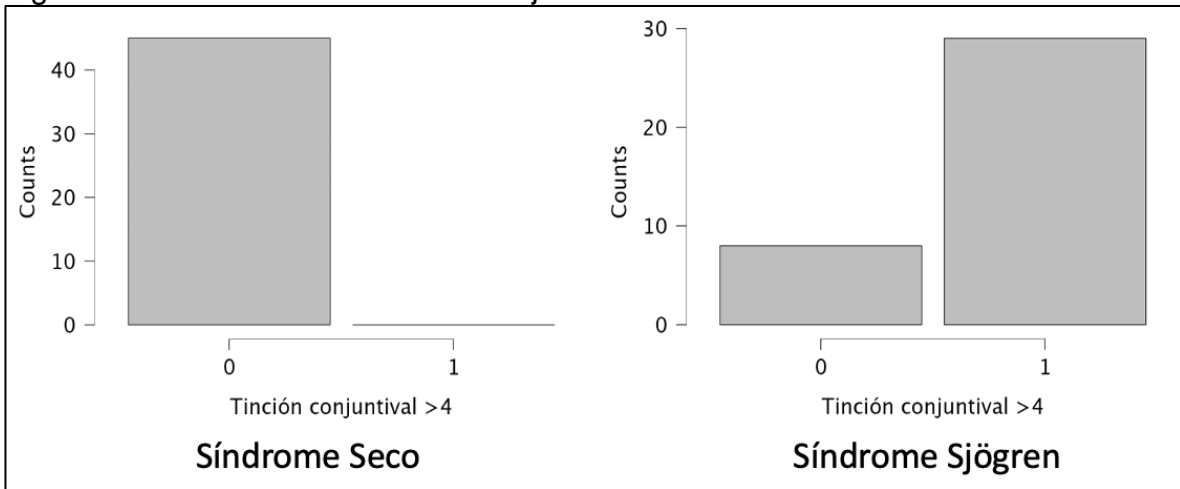
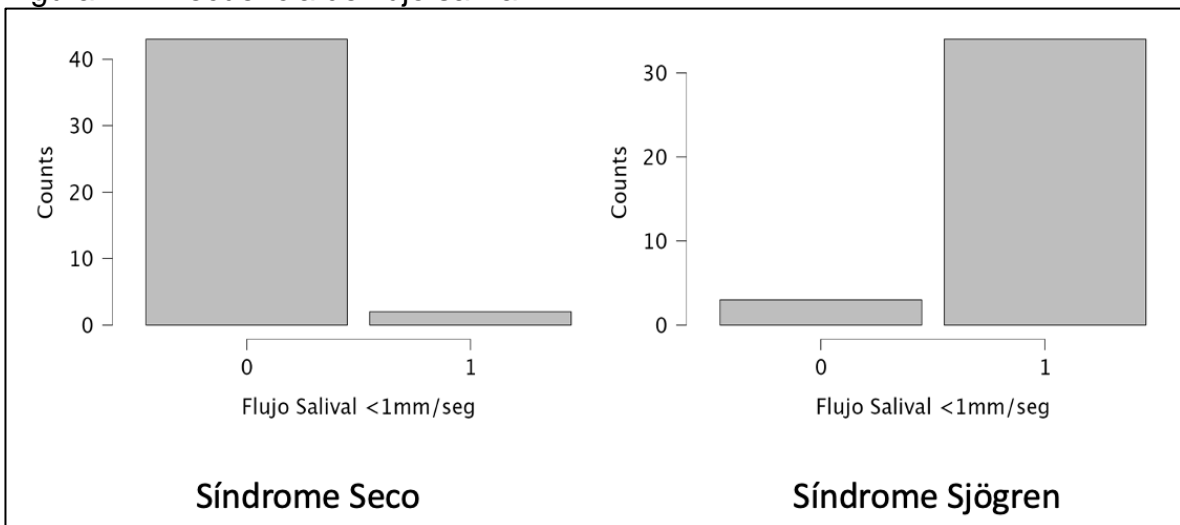


Figura 11. Frecuencia de flujo salival.



Del total de las biopsias se pone un ejemplo de casos definidos como positivos y como negativos (ver figuras 12 y 13)

Figura 12. Casos positivos.

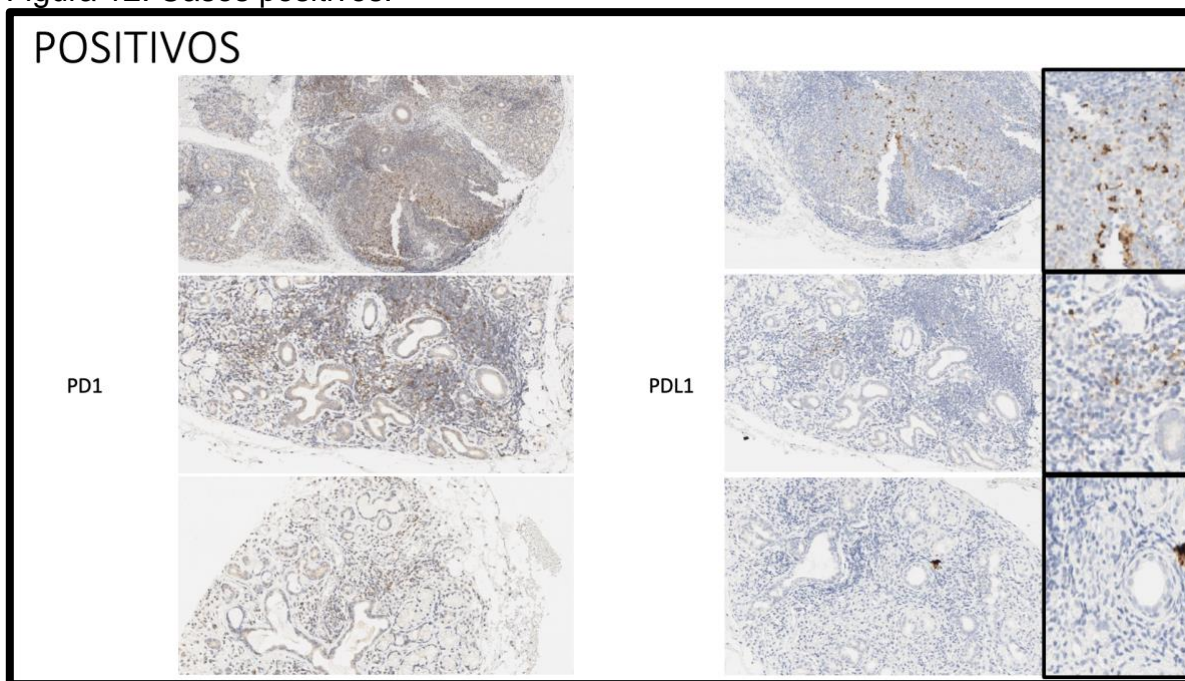


Fig12, Ejemplo de un caso con infiltrado inflamatorio prominente, un caso con infiltrado mayor a 1 foco y un caso sin focos, todos con positividad tanto para PD1 y para PDL1

Figura 13. Casos negativos.

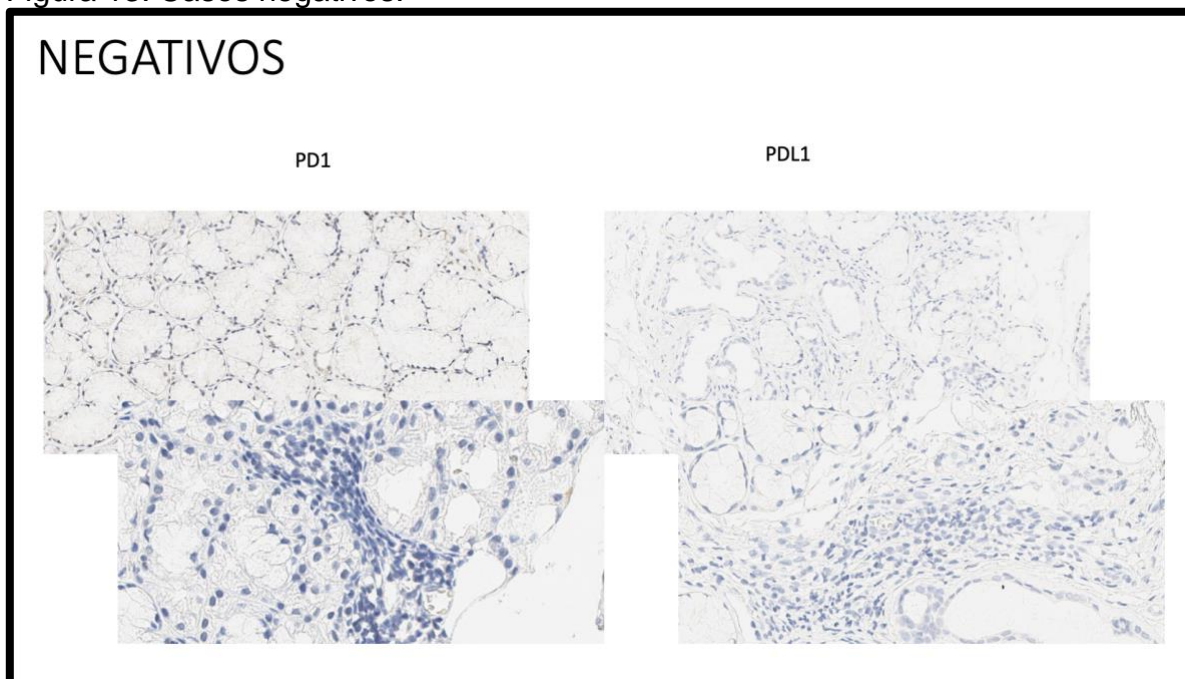
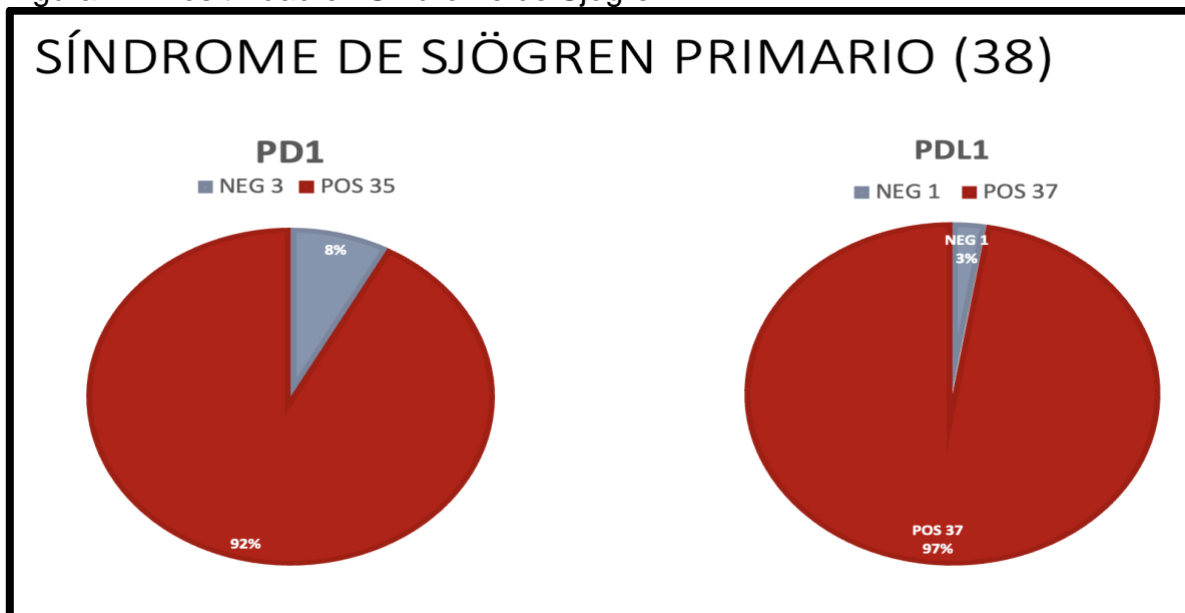


Fig13, casos completamente negativos para PD1 y PDL1 un ejemplo sin infiltrado y otro con infiltrado inflamatorio de un foco.

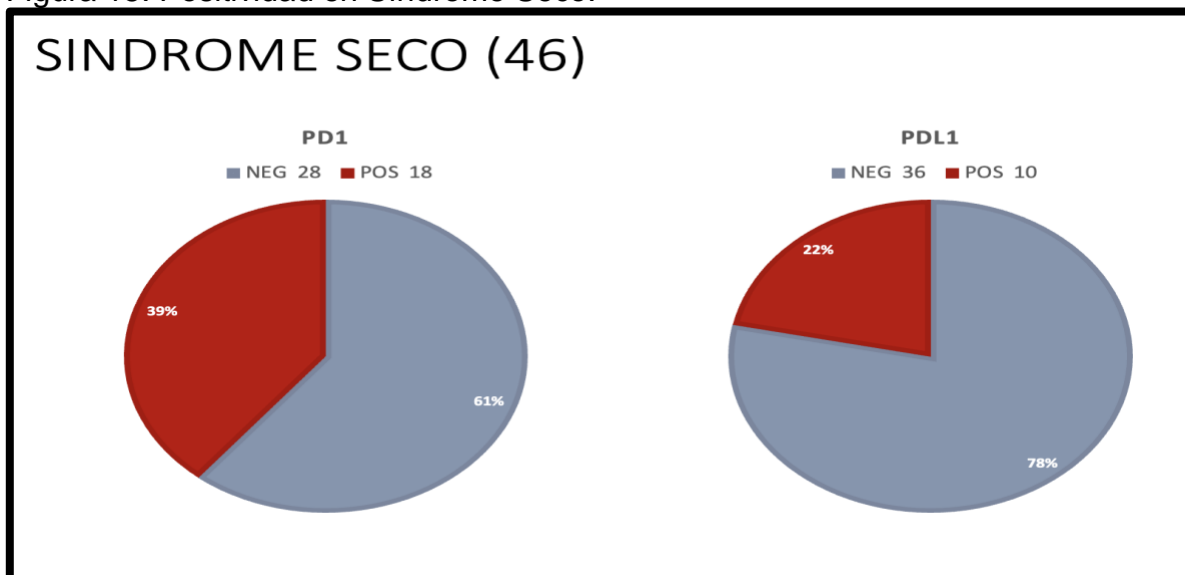
En cuanto a positividad por grupos:  
 Pudimos observar positividad en 37 casos para PDL1 y 35 para PD1 en pacientes con Síndrome de Sjögren de los 38 evaluados, definiendo un porcentaje de positividad del 97% y 92% para PDL1 y PD1 respectivamente. Ver figura 14.

Figura 14. Positividad en Síndrome de Sjögren.



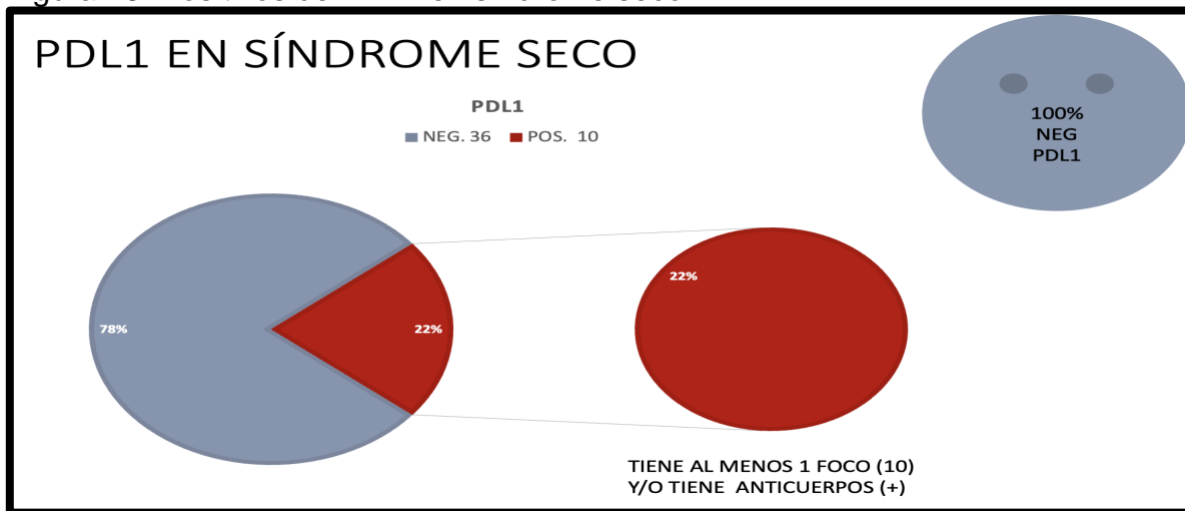
Además para Síndrome Seco se observó positividad solo en 10 casos para PDL1 y 18 para PD1, de los 46 evaluados. Teniendo 78% de los casos negativos para PDL1 y 61% negativos para PD1. Ver figura 15.

Figura 15. Positividad en Síndrome Seco.



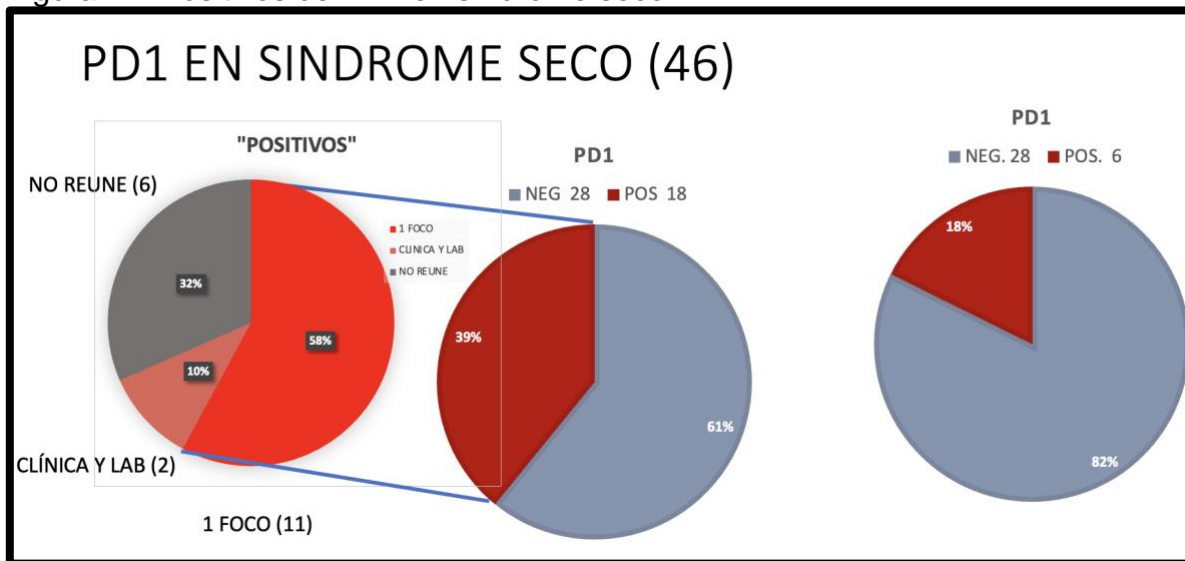
Al momento de observar los casos con positividad para PDL1 en pacientes que fueron diagnosticados como Síndrome Seco, se pudieron identificar 22% que fueron positivos, el total de estos tenía al menos un criterio mayor. Por lo tanto el total de los casos negativos podrían ser casos sin criterios para Sjögren. (Ver figura 16).

Figura 16. Positivos de PDL1 en síndrome seco:



En tanto a la positividad de PD1 en casos con síndrome seco del total de los 18 de 46 casos, osea 39% fueron positivos, de estos el 21% tenían al menos un criterio mayor, dejando solo un 18% del total de los 46 casos positivos sin criterios para Sjögren. (Ver figura 17)

Figura 17. Positivos de PD1 en síndrome seco:



Se compararon variables categóricas por medio de Chi cuadrado o test exacto de fisher, considerando un valor de  $p \leq 0.05$  y un intervalo de confianza al 95% como estadísticamente significativo y para definir como una asociación utilizando el paquete estadístico SPSS versión 25, Odds ratio  $<1$  poco probable; 1 no hay asociación; y  $>1$  hay asociación.

- “Se observó asociación entre expresión de PDL1/PD1 y criterios mayores (laboratorios AntiRo y AntiLa) del estudio,  $\chi^2(1) = 17.060$  y  $38.214$ ,  $p = < .001$ .” TABLA 3

Tabla 3. Asociación PD1 y PDL1 con AntiRo y AntiLA positivos.

Odds Ratio (razon de momios, probablidades) <b>PD1</b>				
		95% Confidence Intervals		
	Odds Ratio	Lower	Upper	p
Odds ratio	8.102	2.816	23.313	
Fisher's exact test	7.879	2.569	27.924	< .001

Odds Ratio (razon de momios, probablidades) <b>PDL1</b>				
		95% Confidence Intervals		
	Odds Ratio	Lower	Upper	p
Odds ratio	30.525	8.738	106.638	
Fisher's exact test	28.772	7.832	138.845	< .001

- “Se observó asociación entre expresión de PDL1/PD1 y criterios mayores (biopsia con CHISHOLM Y MASON positivos) del estudio,  $\chi^2(1) = 17.128$  y  $29.622$ ,  $p = < .001$ .” TABLA 4

Tabla 4. Asociación PD1 y PDL1 con biopsia positiva.

Odds Ratio (razon de momios, probablidades) <b>PD1</b>				
		95% Confidence Intervals		
	Odds Ratio	Lower	Upper	p
Odds ratio	15.058	3.258	69.592	
Fisher's exact test	14.628	3.162	139.240	< .001

Odds Ratio (razon de momios, probablidades) <b>PDL1</b>				
		95% Confidence Intervals		
	Odds Ratio	Lower	Upper	p
Odds ratio	53.053	6.690	420.701	
Fisher's exact test	50.695	7.268	2199.822	< .001

“Se observó asociación entre expresión de PDL1/PD1 y criterios menores”  
Test de schirmer, Flujo salival, Tinción conjuntival (datos no mostrados).

## Discusión

La expresión de Pd1 y PD-L1 se observa en células inflamatorias al tener un punto inhibitorio frente a citocinas por una respuesta inmune, pretendiendo así defender al organismo de una respuesta inflamatoria que lo ataque a sí mismo y poner el freno a la inflamación, si bien en las enfermedades autoinmunes se observa una disregulación de este sistema, son pocos los estudios que prueban esta relación en tejidos como los son las glándulas salivales menores de pacientes con síndrome de Sjögren, por lo cual este trabajo cobra importancia al probar una asociación con todos los criterios que en la actualidad son de uso para el diagnóstico.

## Conclusión

Existe asociación estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ) entre la expresión positiva por marcador de inmunohistoquímica para PD-1 Y PD-L1 en las biopsias de glándulas salivales menores, con los criterios clínicos positivos (ya sean mayores o menores) para síndrome de Sjögren, por lo cual se propone como un marcador más en el uso del diagnóstico de estos pacientes, así mismo los pacientes que no reúnen criterios para Síndrome de Sjögren son negativos para PDL1 y en su gran mayoría negativos para PD1. Si bien hay formas de medir PDL1 y PD1 en biopsias de glándulas salivales por inmunohistoquímica, en el futuro se propone que se podría medir por métodos no invasivos y ser de mayor utilidad en el diagnóstico de estos pacientes.

Estos marcadores en la actualidad cobran gran importancia, debido a la existencia de terapias contra puntos de control inhibitorio como lo son los anti-PD1 y anti-PDL1; se podría llegar a pensar en su uso al tener un mecanismo de acción en contra de estas moléculas de acción inhibitoria, sin embargo existe evidencia del uso de estos medicamentos los cuales en población con distintos tipos de cáncer fueron usados y Warnen menciona que debutaron un síndrome seco diferente al visto en pacientes con síndrome de Sjögren. Por lo tanto en este estudio mencionan que aunque no es contraindicatorio su uso en pacientes con enfermedades autoinmunes, estos pueden llegar a experimentar empeoramiento de sus síntomas, por lo cual sugieren una relación estrecha con reumatólogo<sup>18</sup>.

Más estudios son requeridos para definir cuales terapias en relación a este mecanismo serían de beneficio para los pacientes con síndrome de Sjögren.



## Bibliografía

- 1 Ghafoor M. Sjögren's Before Sjögren: Did Henrik Sjögren (1899-1986) Really Discover Sjögren's Disease? *J Maxillofac Oral Surg.* 2012 Sep;11(3):373-4. doi: 10.1007/s12663-011-0303-0. Epub 2011 Oct 15. PMID: 23997498; PMCID: PMC3428454.
- 2 Sjögren, Henrik. (2009). Zur Kenntnis der Keratoconjunctivitis Sicca. *Acta Ophthalmologica.* 13. 1 - 39. 10.1111/j.1755-3768.1935.tb04186.x.
- 3 Hadden WB: On “dry mouth”, or suppression of the salivary and buccal secretions. *Trans. ClinSocLondon.* 1888; 21: 176.
- 4 Mikulicz JH. Über eine eigenartige symmetrische Erkrankung der Tränen- und Mundspeicheldrüsen. In: Billroth GT, ed. *Beitr. Chir. Fortschr. Stuttgart*, 1892: 610–30.
- 5 Fox, R.I. Sjögren's syndrome. *Lancet* 2005, 366, 321–331. [[CrossRef](#)]
- 6 Parisi D, Chivasso C, Perret J, Soyfoo MS, Delporte C. Current State of Knowledge on Primary Sjögren's Syndrome, an Autoimmune Exocrinopathy. *J Clin Med.* 2020 Jul 20;9(7):2299. doi: 10.3390/jcm9072299. PMID: 32698400; PMCID: PMC7408693.
- 7 Kumar, V. (2018) *Robbins. Patología Humana*. 10th Edition Elsevier.
- 8 Akhtar, M., Rashid, S. & Al-Bozom, I.A. PD–L1 immunostaining: what pathologists need to know. *Diagn Pathol* **16**, 94 (2021). <https://doi.org/10.1186/s13000-021-01151-x>
- 9 Qin B, Wang J, Yang Z, *et al* Epidemiology of primary Sjögren's syndrome: a systematic review and meta-analysis *Annals of the Rheumatic Diseases* 2015;**74**:1983-1989.
- 10 Jonsson, R., Brokstad, K. A., Jonsson, M. V., Delaleu, N., & Skarstein, K. (2018). Current concepts on Sjögren's syndrome - classification criteria and biomarkers. *European journal of oral sciences*, 126 Suppl 1(Suppl Suppl 1), 37–48. <https://doi.org/10.1111/eos.12536>
- 11 Sebastian, A., Szachowicz, A., & Wiland, P. (2019). Classification criteria for secondary Sjögren's syndrome. Current state of knowledge. *Reumatologia*, 57(5), 277–280. <https://doi.org/10.5114/reum.2019.89520>
- 12 Mariette, X., & Criswell, L. A. (2018). Primary Sjögren's Syndrome. *The New England journal of medicine*, 378(10), 931–939. <https://doi.org/10.1056/NEJMcp1702514>.
- 13 Zhang, K., Zhou, Y., Cheng, X., Fu, X., Du, W., Feng, Y., Jia, J., Yang, X., Xiao, G., Zheng, Z., Zhu, P., & Wu, Z. (2019). Epithelial Cell Adhesion Molecule in Primary Sjögren's Syndrome Patients: Characterization and



- Evaluation of a Potential Biomarker. *Journal of immunology research*, 2019, 3269475. <https://doi.org/10.1155/2019/3269475>
- 14 Kobayashi M, Kawano S, Hatachi S, et al. Enhanced expression of programmed death-1 (PD-1)/PD-L1 in salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *J Rheumatol*. 2005;32(11):2156-2163.
  - 15 Zamani, M. R., Aslani, S., Salmaninejad, A., Javan, M. R., & Rezaei, N. (2016). PD-1/PD-L and autoimmunity: A growing relationship. *Cellular immunology*, 310, 27–41. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2016.09.009>
  - 16 Qian S, Xu J, Zhao S, Yang P, Yang C. CMTM6: increased circulating level and up-regulated expression in labial salivary glands in patients with primary Sjogren's syndrome. *Clin Exp Immunol*. 2022 Jan 28;207(1):65-71. doi: 10.1093/cei/uxab003. PMID: 35020842; PMCID: PMC8802174.
  - 17 Chisholm, D. M., & Mason, D. K. (1968). Labial salivary gland biopsy in Sjögren's disease. *Journal of clinical pathology*, 21(5), 656–660. <https://doi.org/10.1136/jcp.21.5.656>.
  - 18 Warner BM, Baer AN, Lipson EJ, et al. Sicca Syndrome Associated with Immune Checkpoint Inhibitor Therapy. *Oncologist*. 2019;24(9):1259-1269. doi:10.1634/theoncologist.2018-0823.