

# Cambios en la expresión inmunohistoquímica del protooncogen Bcl2 y apoptosis por acción de estimulación colinérgica en pacientes con síndrome de Sjögren primario (SSp)

M. Fourcade<sup>1,2,3</sup>, C. Aua<sup>1</sup>, E. Romanini<sup>1</sup>, M. Mamani<sup>1</sup>, A. Mónaco, A. Bedoya<sup>3</sup>, A. Secco<sup>1</sup>, M. L. Fonseca<sup>1</sup>, L. Villalón<sup>2</sup>, A. Berra<sup>2</sup>, A. Catalán Pellet<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Reumatología, Hospital Rivadavia; <sup>2</sup>Laboratorio de Microbiología e Inmunología Ocular, Departamento de Patología, Facultad de Medicina, UBA; <sup>3</sup>Departamento de Biología, CBC – UBA.

## RESUMEN

El síndrome de Sjögren es una enfermedad reumática autoinmune, sistémica, que supone la destrucción de la glándula exocrina y órganos internos por medio de grandes infiltraciones mononucleares asociadas con los anticuerpos Ro/SSA, La/SSB y factores reumáticos, ambos síntomas principales de los factores celulares y humorales de la xerofthalmia y la xerostomía. Los infiltrados mononucleares más comunes son los linfocitos CD4, CD8 y B. Los pacientes que sufren de síndrome de Sjögren corren el riesgo de desarrollar linfoma no Hodgkin. El linfoma folicular es el resultado de una traslocación no homóloga cromosómica 14; 18 produciendo la desregulación de la transcripción y síntesis de la proteína Bcl2. Las proteínas de la familia Bcl2 son reguladores clave de la apoptosis, que estimulan la supervivencia de la célula. Otros grupos de la familia Bcl2 son estimuladores pro-apoptóticos. El comportamiento de las células dependerá de la concentración de los dos miembros de la familia.

**Objetivos:** Los niveles de expresión y apoptosis de Bcl2 en la glándula salival menor pre y pos-tratamiento con agonistas colinérgicos.

**Pacientes y métodos:** Diagnóstico del síndrome de Sjögren según los criterios europeos. Se reclutaron 10 pacientes, a quienes se estudió durante 5 meses y se los trató con 15 mg de clorhidrato de pilocarpina en cápsulas orales de 5 mg cada 8 horas. Se llevaron a cabo biopsias pre-tratamiento y pos-tratamiento desde el día cero (antes del tratamiento) hasta el quinto mes (después del tratamiento). Antes de ingresar al estudio clínico, los pacientes SSp voluntarios firmaron el consentimiento informado y el estudio se realizó según las normas de buenas prácticas clínicas. Se evaluó la expresión Bcl2 mediante técnicas de inmunohistoquímica y la apoptosis nucleotidil transferasa-peroxidasa mediante técnicas in situ.

**Diseño del estudio:** Abierto, longitudinal, autocontrolado.

## SUMMARY

Sjögren syndrome is a systemic autoimmune rheumatic disease that involves exocrine gland destruction and internal organs by means large mononuclear infiltrates in association with autoantibodies Ro/SSA, La/SSB and Rheumatoid factor; both cellular and humoral factors leading symptoms of xerophthalmia and xerostomia. Classical mononuclear infiltrates consist in CD4, CD8 and B lymphocytes. Patients suffering from Sjögren syndrome have a risk to develop lymphoma no Hodgkin. Follicular lymphoma results from non homologous chromosomal translocation 14 :18 disregulating transcription and synthesis of Bcl2 protein. Bcl2 family proteins are apoptotic key regulators, promoting cell survival, other Bcl2 family group are pro-apoptotic promoters. The cell behavior shall depend of the concentration of two family members.

**Objetives:** Bcl2 expression and apoptosis level in minor salivary gland pre and post-treatment with cholinergic agonists.

**Patients and Methods:** Sjögren syndrome diagnosis according to european criteria. 10 patients were recruited, studied during 5 months, treated with 15 mg/day oral Pilocarpine Chlorhydrate capsules, 5 mg/8h. Pre and post-treatment biopsies were performed during day zero (pre-treatment) to fifth month (post-treatment). Previously enter to clinical study, voluntary SSp patients signed informed consent and conducted under GCP guidelines. Bcl2 expression was evaluated by immunochemistry and apoptosis by means nucleotidil transferase-peroxidase in situ technique.

**Study design:** Open, longitudinal, autocontrolled.

**Results:** Pre-treatment showed intense mononuclear infiltrates in interstitial and periductal glandular tissue with high Bcl2 expression (4 +++++). Post-treatment showed a decrease of mononuclear infiltrates from scores 4 to 2 and some cases 4 to 1. Presence of

**Resultados:** El pre-tratamiento mostró un intenso infiltrado mononuclear en el tejido intersticial y periductal con una alta expresión de Bcl2 (4++++). El estudio pos-tratamiento mostró una disminución de infiltrado mononuclear de 4 a 2 y en algunos casos de 4 a 1. Presencia de cuerpos apoptóticos en la fase previa al tratamiento, principalmente en áreas periductales e intersticiales con infiltrado mononuclear (4++++). El estudio pos-tratamiento mostró una disminución de 4 a 2 en las áreas mencionadas, 70%  $p < 0,05$ , a pesar de que el ducto mantuvo marcadas expresiones de cuerpos apoptóticos.

**Conclusión:** La estimulación colinérgica no sólo afecta a las glándulas exocrinas sino que también podemos suponer una actividad parasimpaticomimética en las células linfoides mononucleares por medio de señales de transducción de apoptosis no esclarecida aún. El tratamiento con agonistas colinérgicos como la Pilocarpina evidencian una mejoría de la histopatología y de aspectos clínicos en los pacientes SSp.

## Introducción

El síndrome de Sjögren (SS) es una afección reumática autoinmune, sistémica, se caracteriza por infiltrados mononucleares en asociación con la producción de autoanticuerpos mediando la destrucción de glándulas exocrinas y endocrinas, se puede clasificar en primario (SSp) cuando se presenta solo o secundario cuando acompaña a una enfermedad del tejido conectivo (SSs)<sup>1</sup>. La infiltración progresiva linfoplasmocitaria de glándulas salivales y lacrimales resultante conlleva a la destrucción glandular disminuyendo el flujo salival (xeroftomía) y lacrimal (xeroftalmia), siendo estos los aspectos más prevalentes del SS<sup>2</sup>. Síntomas adicionales del SS representan manifestaciones glandulares y extraglandulares, hipergammaglobulinemia, producción de autoanticuerpos como anti Ro/SSA, La/SSB y factor reumatoideo, normalmente detectados en el suero, saliva y en glándulas salivales in situ<sup>3</sup>. Los linfocitos infiltrantes de glándulas salivales y lacrimales en el SS, consiste predominantemente en linfocitos T CD4 45-50%, 20% linfocitos T CD8, 20% linfocitos B<sup>4</sup>.

Los pacientes con síndrome de Sjögren tienen un marcado aumento del riesgo en desarrollar linfoma B no Hodgkin a nivel de glándulas salivales y lacrimales respecto de otras enfermedades autoinmunes<sup>5,7</sup>. El linfoma B no Hodgkin representa la mayor complicación en la evolución de los pacientes con SS. El riesgo de desarrollar linfoma

apoptotic bodies in pre-treatment phase mainly in mononuclear infiltrates, periductal and interstitial areas (4++++), Post-treatment decreased from 4 to 2 mentioned areas, 70%  $p < 0.05$ , despite ductus, kept strong apoptotic bodies expression.

**Conclusion:** Cholinergic stimulation affects not only exocrine glands but also we can speculate parasimpatomimetic activity on mononuclear lymphoid cells throughout apoptosis signal transduction pathways no yet cleared. Cholinergic agonist treatment as Pilocarpine evidenced histopathological and clinical improvement in SSp patients.

es equivalente tanto para SSp o SSs, fue estimado 44 veces mayor comparado con la población normal<sup>8</sup>. Estudios de cohortes han demostrado una fuerte asociación (Odds Ratio=13) de aparición de linfoma no Hodgkin en pacientes con SSp<sup>9</sup>. Ignoramos si este mismo porcentaje se cumple en nuestro país.

Algunos investigadores han propuesto que la linfomagenesis es un proceso que involucra pasos secuenciales de activación de protooncogenes, mediante traslocaciones o mutaciones que alteran el funcionamiento regulatorio celular<sup>10,11</sup>. El linfoma folicular resulta de la traslocación no homóloga cromosómica 14; 18<sup>11</sup> produciendo la desregulación de la transcripción y síntesis del protooncogen Bcl2. Dicha traslocación confiere ventajas adaptativas de supervivencia celular previniendo la apoptosis. A pesar de la desregulación de Bcl2 parece ser ésta no suficiente para producir el fenotipo linfomatoso<sup>12</sup>. Los miembros de la familia de proteínas Bcl2 son reguladores clave de la apoptosis, programa de suicidio celular, crítico durante el desarrollo, balance homeostático de tejidos y protección contra patógenos. Bcl2 promueve la sobrevivencia celular inhibiendo ciertos tipos de adaptadores necesarios para la activación de proteasas (Caspasas), llevando estas últimas al desmantelamiento de la célula<sup>13</sup>. Por lo menos fueron identificados 15 miembros de la familia Bcl2 en células de mamífero y otros tantos en virus<sup>14</sup>.

Dentro de la familia Bcl2 existen miembros con actividad pro-apoptótica y anti-apoptótica, la promoción a apoptosis o sobrevida celular dependerá de la relativa concentración de los mismos, funcionando a modo de reostato en el mecanismo de muerte celular programada<sup>15,16</sup>, (Figura 1 Ref 17). El Bcl2 reside en la cara citoplasmática de la membrana externa mitocondrial, retículo endoplásmico y membrana nuclear, registrando posibles daños hacia esos compartimentos celulares. Afecta de este modo el comportamiento celular, mediante la modificación del flujo en la membrana mitocondrial de pequeñas moléculas o proteínas<sup>18</sup>.

Apoptosis o muerte celular programada es un importante mecanismo fisiológico para eliminar clones de linfocitos T autorreactivos así como defectos en la secuencia apoptótica podría ser un factor clave en el desarrollo de autoinmunidad<sup>19,20,21</sup>.

El Fas es una proteína de superficie de la super familia de los receptores de TNF y factores de crecimiento expresados constitutivamente o inducidos después de la activación de diferentes tipos celulares incluyendo linfocitos T.<sup>22</sup> La apoptosis mediada por Fas y en adición la vía mediada por perforinas constituyen los mecanismos asesinos de linfocitos T CD8 citotóxicos.<sup>21</sup>

En modelos murinos, defectos en las señales por mutaciones en la vía Fas o FasL, produce inactivación de la apoptosis desencadenando autoinmunidad como también linfadenopatía.<sup>22</sup>

La destrucción del tejido glandular y la pérdida de la función secretoria en el SS es dependiente de la activación de la apoptosis<sup>23</sup>.

La interacción de diferentes factores inhibitorios o inductores pueden llevar a la célula a la activación de la apoptosis o la sobrevida; la comprensión de la interacción de estos factores contribuye en una mejor comprensión sobre la gran variedad de diferentes estímulos que pueden alterar este delicado equilibrio, que contribuyen en la patogénesis autoinmune y en otras enfermedades donde la sobrevida celular se encuentra alterada como cáncer, infecciones virales, desórdenes neurodegenerativos, etc.<sup>24,25</sup> En el SSp se observa una marcada expresión de FAS y su ligando FASL y aumento de la tasa de apoptosis en el tejido epitelial de glándulas salivales. Dicha observación ha llevado a proponer que dicho mecanismo podría jugar un rol importante en la destrucción glandular exocrina en el SSp<sup>26,27</sup>.

En trabajos previos, hemos demostrado la posible acción inmunomoduladora de los agonistas colinérgicos en

pacientes con síndrome de Sjögren<sup>28</sup> (Resúmenes SAR 2002,2003,2005,2006). Investigadores han demostrado la presencia de receptores muscarínicos colinérgicos en células mononucleares<sup>29,30,31</sup>. Los receptores colinérgicos muscarínicos median funciones vitales, los eferentes nerviosos vagales periféricos están relacionados con el in-put inhibitorio de secreción de TNF en modelos animales de endotoxemia<sup>32</sup>. Los eferentes vagales distribuidos a través del sistema retículoendotelial, y otros órganos periféricos, transmiten las señales a células inmunocompetentes; sin embargo algunos trabajos no demostraron la acción de la muscarina intravenosa para inhibir la secreción de TNF en modelos de toxemia. Estos datos sugerirían que los receptores colinérgicos muscarínicos periféricos no tendrían un rol esencial durante el shock endotoxémico.

La subunidad alfa 7 del receptor nicotínico es el único receptor colinérgico reconocido de mediar efectos antiinflamatorios a nivel periférico<sup>33</sup>.

Estudios de eficacia y seguridad de Clorhidrato de Pilocarpina oral han demostrado su efectividad en el tratamiento del complejo SICA en pacientes con SS.<sup>34,35</sup>

El presente trabajo se propuso investigar la expresión diferencial de la proteína Bcl2 y nivel de apoptosis con agonistas colinérgico-muscarínicos en pacientes con síndrome de Sjögren primario.

## Objetivo

Evaluar la expresión de Bcl2 y el grado de apoptosis en glándulas salivales pre y pos-tratamiento con agonistas colinérgicos.

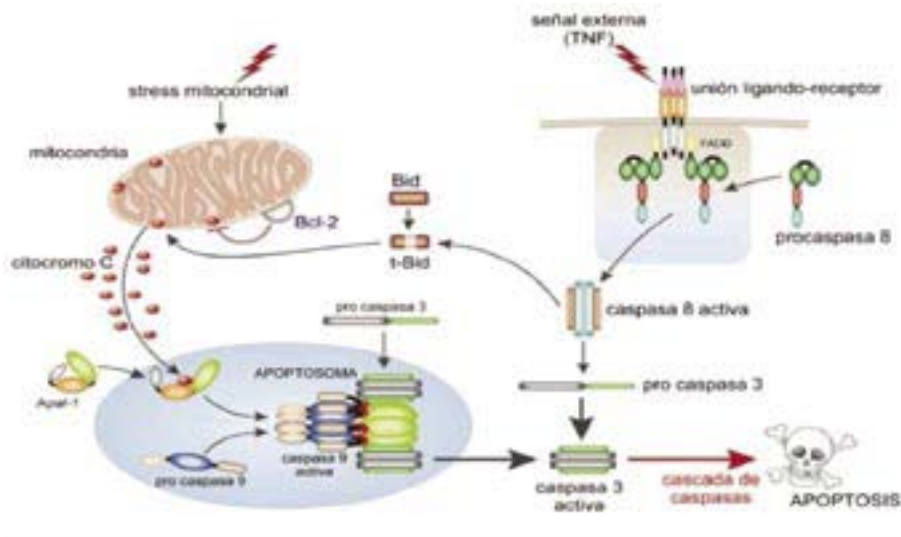
## Pacientes y métodos

El diagnóstico de SSp se efectuó según criterios europeos<sup>1</sup>. Se estudiaron 10 pacientes de sexo femenino  $61 \pm 5$  años, tiempo de evolución de la enfermedad: 10 años.

Los pacientes SSp recibieron Clorhidrato de Pilocarpina 15 mg/día en comprimidos, repartidos en tres tomas de 5 mg/ cada 8 hs, y se evaluaron los efectos del tratamiento durante 5 meses.

Previo al estudio, los pacientes voluntarios firmaron el consentimiento informado. El estudio fue conducido según las normas de buenas prácticas clínicas.

Se efectuaron biopsias de glándulas salivares menores pre-tratamiento y pos-tratamiento; a los cinco meses éstas



**Figura 1.** Acción del Bcl2. El Bcl2 inhibe el goteo de Citocromo C que permite la formación del apoptosoma y la consecuente inducción de apoptosis. Imagen modificada por Fourcade, MG. Ref.(17).

fueron congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Se realizó el score Chisholm<sup>6</sup> para determinar el grado de infiltrado mononuclear en glándulas salivales menores en el SS<sub>p</sub>. Por inmunohistoquímica se evaluó la expresión de Bcl2 y por la técnica de TUNEL se determinó la apoptosis según fabricante (ApopTag® Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit).

#### Diseño del estudio

Abierto, autocontrolado, longitudinal. Se aplicó test de rangos señalados de Wilcoxon para evaluar los datos, con una significancia  $p < 0,05$ , IC 95%; Programa Prisma GraphPad versión IV.

#### Marcación *in situ* de células apoptóticas

La fragmentación de DNA durante la apoptosis fue detectada *in situ* mediante TUNEL. Secciones de 5 mm de tejido glandular salival fueron cortadas por crióstato, deshidratadas y fijadas con 10% paraformaldehído/PBS por 30 minutos y lavados con TBS. La actividad endógena de la peroxidasa fue inactivada con 0,1% de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en TBS 2 veces de 15 minutos, seguido de lavado con TBS. Las secciones fueron equilibradas con buffer de thymidine-dioxynucleotidyl transferasa terminal (TdT) (0,5 M cacodylate, pH 6,8, 1 mM  $\text{CoCl}_2$ , 0,5 mM dithiothreitol (DTT), 0,05% BSA and 0,15M NaCl) a  $37^{\circ}\text{C}$  plus buffer TdT con 0,1 U/ml TdT y 8 nmol/ml de digoxigenina conjugada con dUTP, se

incubó en cámara húmeda por una hora a  $37^{\circ}\text{C}$ . La reacción fue bloqueada con lavado de TBS suplementado con 2% de suero fetal bovino seguido de antidigoxigenina IgG diluida en 5 mg/ml del suero de bloqueo en incubación de 1 hora. Después del lavado en TBS y 10% de un pool de suero humano en 2% de suero fetal bovino y TBS, las secciones fueron incubadas con anticuerpo conjugado HRP de conejo anti-cabra diluido 1:100 (DAKO A/S, Glostrup, Denmark) en suero de bloqueo durante 1 hora. Después del lavado con TBS, las células fueron visualizadas con buffer AEC conteniendo  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 15 minutos. Todos los pasos, excepto la incubación con TdT, se realizaron a temperatura ambiente. Las secciones fueron incubadas con hematoxilina para recuento celular.

Para evaluar la expresión de Bcl2 se puntuó el Score de 0 a 4 cruces y se analizó dichas muestras por medio de tres anatomopatólogos independientes entre sí.

#### Resultados

La inmunohistoquímica pre-tratamiento mostró un intenso infiltrado mononuclear intersticial y periductal con fuerte marcación para el protooncogen Bcl2 con un Score de 4 (++++); no se evidenció expresión Bcl2 en acinos. Post-tratamiento se observó una significativa disminución de la expresión Bcl2 en el infiltrado mononuclear inflamatorio

que cambió de 4 a 2 cruces y en algunos casos a 1 cruz. El epitelio ductal sostuvo la expresión de Bcl2.

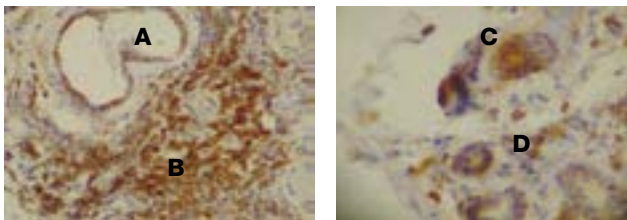
La presencia de cuerpos apoptóticos se evidenció en núcleos de infiltrados mononucleares, epitelio periductal e intersticial con score de 4 (++++), también a nivel del epitelio ductal y acinar pre-tratamiento. Pos-tratamiento descendió la expresión de grado 4 (++++) a grado 2 (++) o 1 (+) tanto de Bcl2 como la presencia de cuerpos apoptóticos en el infiltrado inflamatorio e intersticio, 70% ( $p < 0,05$ ), sin embargo Bcl2 mantuvo su nivel de expresión a nivel ductal.

Los pacientes tuvieron mejoría significativa de la lesión histológica y de parámetros clínicos tanto objetivos como subjetivos post-tratamiento, clínica, test oculares y lagrimales.

#### *Expresión inmunohistoquímica de Bcl2 en glándulas salivales menores SSp (40x)*

**Izquierda:** infiltrado mononuclear con alto grado de expresión Bcl2 en epitelio de glándula salival, correspondiente a SSp Grado 4, previo al tratamiento.

**Derecha:** epitelio de la glándula salival tras cinco meses del tratamiento descrito en Materiales y métodos. La expresión Bcl2 ha disminuido notablemente. La condición corresponde a SSp Grado 1.



**Figura 2.**

**A.** Glándula salival SSp, pre-tratamiento. Expresión periductal e intersticial de Bcl2.

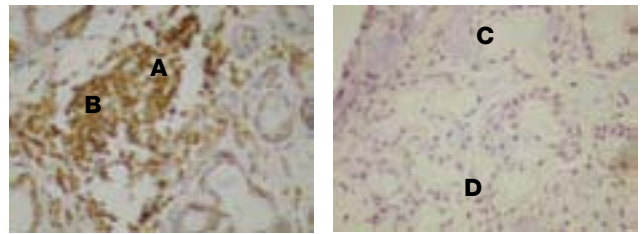
**B.** Expresión Bcl2 en infiltrado mononuclear.

**C.** Glándula salival SSp. Expresión Bcl2 pos-tratamiento.

**D.** Descenso de la expresión Bcl2 tanto en ductos e infiltrado mononuclear.

#### *Apoptosis en glándulas salivales menores de pacientes SSp (40x)*

**Izquierda:** intenso infiltrado mononuclear y marcado grado de apoptosis en epitelio de glándula salival, pre-tratamiento de SSp grado IV. **Derecha:** tras el tratamiento, no se evidencian signos de apoptosis. La condición corresponde a SSp Grado 1.



**Figura 3.**

**A.** Nivel de apoptosis en glándulas salivales SSp. Pre-tratamiento.

**B.** Infiltrado mononuclear en franca apoptosis.

**C.** Nivel de apoptosis en glándulas salivales SSp. Pos-tratamiento.

**D.** Descenso del nivel de apoptosis.

## Discusión

Los reportes de M. Ohlsson y col.<sup>27</sup> indican por un lado una baja frecuencia de apoptosis a nivel ductal como también a nivel de infiltrados inflamatorios. Nuestros estudios, realizados en glándulas salivales de pacientes SSp, muestran claramente una elevada presencia de cuerpos apoptóticos a nivel ductal y a nivel de infiltrados inflamatorios, también se observó expresión concomitante de Bcl2 a nivel ductal, intersticial y de infiltrados inflamatorios, no evidenciándose la presencia de ambos marcadores en el epitelio acinar. En trabajos anteriores, demostramos que durante la estimulación colinérgica se encontró asociación de linfocitos T CD8 a nivel ductal y marcado descenso infiltrante de linfocitos T CD4 en glándulas salivales de pacientes SSp, ello podría sugerir una posible acción colinérgica pro-apoptótica sobre ciertos subtipos linfocitarios; dicho modelo podría explicar la mejoría histopatológica evidenciada por el descenso de grados Chisholm<sup>6</sup> de grado 4 a 1 o cero en biopsias de glándulas salivales en pacientes SSp y mejoría en los parámetros de flujo salival. Durante el tratamiento de los pacientes SSp con Pilocarpina, ciertos infiltrados inflamatorios son más susceptibles a la apoptosis a pesar de la expresión Bcl2, a diferencia del epitelio ductal, el mismo contrarresta la apoptosis a través de la expresión de Bcl2 como regulador anti-apoptótico.

El balance de moléculas pro y anti-apoptóticas jugaría un rol importante en la supervivencia o muerte celular programada<sup>16,23,24</sup> y su incidencia en el desarrollo de neoplasias linfomatosas<sup>5</sup> en el SSp. El tratamiento con agonistas colinérgicos muscarínicos como la Pilocarpina ha evidenciado mejorar la histopatología y aspectos clínicos en pacientes SSp<sup>28,34,35</sup>.

## Conclusiones

1. En el SSp, la estimulación colinérgica muscarínica no sólo ejerce su acción parasimpaticomimética sobre las glándulas salivales menores sino también a nivel de infiltrados inflamatorios mononucleares. Si bien el mecanismo de acción colinérgica en estos últimos aún no está esclarecido, podría tener efectos en las señales de transducción pro y anti-apoptóticas.
2. El estudio actual y trabajos precedentes nos llevarían a especular en una posible doble acción parasimpaticomimética del Clorhidrato de Pilocarpina oral:
  - A. A nivel del tejido exocrino glandular salival, lacrimonal, etc.
  - B. A nivel de poblaciones mononucleares linfocitarias específicas con expresión de receptores colinérgico-muscarínicos funcionales ejerciendo acciones antiinflamatorias, demostrado por el descenso del infiltrado mononuclear.
3. El tratamiento con agonistas colinérgicos muscarínicos como la Pilocarpina ha evidenciado mejoría de la histopatología y de aspectos clínicos en pacientes con SSp.
4. Nuestros resultados nos sugeriría una posible acción inmunomoduladora colinérgico-muscarínica. Es necesario llevar a cabo estudios clínicos de mayor envergadura para verificar dicha hipótesis.

## Bibliografía

1. Frederick B. Vivino, Ibtisam Al-Hashimi, Zafrulla Khan, Francis G. LeVeque, Paul L. Salisbury III, Tram K. Tran-Johnson, Charles C. Muscoplat, Madhu Trivedi, Barry Goldlust, Susan C. Gallagher, for the P92-01 Study Group. Pilocarpine Tablets for the Treatment of Dry Mouth and Dry Eye Symptoms in Patients With Sjögren Syndrome. A Randomized, Placebo Controlled, Fixed-Dose, Multicenter Trial. *Arch Intern Med* 1999;159:174-181.
2. Norman Talal, Robert A. Sylvester, Troy E. Daniels, John S. Greenspan, Ralph C. Williams, Jr. T and B Lymphocytes in Peripheral Blood and Tissue Lesions in Sjögren's Syndrome
3. Halse A-K, Harley JB, Kroneld U, Jonsson R. Ro/SS-A-reactive B lymphocytes in salivary glands and peripheral blood of patients with Sjögren's syndrome. *Clin Exp Immunol* 1999a; 115: 203-207.
4. Skopouli FN, Fox PC, Galanopoulou V, Atkinson JC, Jaffe ES, Moutsopoulos HM. T cell subpopulations in the labial minor salivary gland histopathologic lesion of Sjögren's syndrome. *J Rheumatol* 1991; 18: 210-14.
5. Kassan SS, Thomas TL, Moutsopoulos HM, Hoover R, Kimberly RP, Budman DR, Costa J, Decker JL, Chused TM. Increased risk of lymphoma in sicca syndrome. *Ann. Intern. Med.* 1978; 89:888.
6. Chisholm DM, Mason DK. Labial salivary gland biopsy in Sjogren's disease. *J. Clin. Path.* 1968; 21: 656-660.
7. Smedby KE, Hjalgrim H, Askling J, Chang ET, Gregersen H, Porwit-MacDonald A, Sundstrom C, Akerman M, Melbye M, Glimelius B, Adami HO. Autoimmune and chronic inflammatory disorders and risk of non-Hodgkin lymphoma by subtype. *J Natl Cancer Inst.* 2006 Jan; 4; 98(1):51-60.
8. Bruno Royer, Dominique Cazals-Hatem, Jean Sibilia, Felix Agbalika, Jean-Michel Cayuela, Thierry Soussi, Frédéric Maloisel, Jean-Pierre Clauvel, Jean-Claude Brouet, Xavier Mariette. Lymphomas in Patients With Sjögren's Syndrome Are Marginal Zone B-Cell Neoplasms, Arise in Diverse Extranodal and Nodal Sites, and Are Not Associated With Viruses. *Blood* 1997 Jul 15; 90(2): 766-775.
9. Engels EA, Cerhan JR, Linet MS, Cozen W, Colt JS, Davis S, Gridley G, Severson RK, Hartge P. Immune-related conditions and immune-modulating medications as risk factors for non-Hodgkin's lymphoma: a case-control study. *Am J Epidemiol.* 2005 Dec 15; 162(12): 1153-61.
10. Yunis JJ, Grizzera G, Oken MM, McKenna J, Theologides A, Arnesen M. Multiple recurrent genomic defects in follicular lymphoma. A possible model for cancer. IV. *Engl. J. Med* 1987;316:79.4.
11. Yunis JJ. The chromosomal basis of human neoplasia. *Science (Wash. DC.)* 1983; 221:227.
12. Jacqueline Limpens, Robert Stad, Carla VOS, Clementine de Viaam, Daphne de Jong, Gert-Jan B. van Ommen, Ed Schuuring, Philip M. Kluin Lymphoma-Associated Translocation t(14; 18) in Blood B Cells of Normal Individuals. *Blood* 1995 May 1; 85(9): 2528-2536.
13. Jerry M. Adams, Suzanne Cory. The Bcl-2 Protein Family:

- Arbiters of Cell Survival. Review Science 28 August 1998; 281(5381): 1322-1326 DOI: 10.1126/science.281.5381.1322.
14. Cory S, Strasser A, Jacks T, Corcoran LM, Metz T, Harris AW, Adams JM. Enhanced cell survival and tumorigenesis. *Quant Biol.* 1994; 59, 365.
  15. Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993 Aug 27; 74(4): 609-19.
  16. Kong L, Ogawa N, McGuff HS, Nakabayashi T, Sakata KM, Masago R, Vela-Roch N, Talal N, Dang H. Bcl-2 family expression in salivary glands from patients with primary Sjögren's syndrome: Involvement of Bax in salivary gland destruction. *Clin Immunol Immunopathol* 1998; 88: 133-141.
  17. Apoptosis and disease: a life or death decision. *EMBO Rep.* 2004 Jul; 5(7):674-8. Epub 2004 Jun 25.
  18. Kroemer G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med* 1997 Aug; 3(8):934.
  19. Ogawa N, Dang H, Talal N. Apoptosis and autoimmunity. *J Autoimmun* 1995; 8:119.
  20. Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M, Hase A, Seto Y, Nagata S. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 1991; 66: 233-243.
  21. Berke G. The CTL's kiss of death. *Cell* 1995; 81: 9-12.
  22. Skarstein K, Nerland AH, Eidsheim M, Mountz JD, and Jonsson R. Lymphoid cell accumulation in salivary glands of autoimmune MRL mice can be due to impaired apoptosis. *Scand J Immunol* 1997; 46: 373-378.
  23. Manganelli P, Quaini F, Andreoli AM, Lagrasta C, Pilato FP, Zuccarelli A, et al. Quantitative analysis of apoptosis and bcl-2 in Sjögren's syndrome. *J Rheumatol* 1997; 24: 1552-7.
  24. Mountz JD, Zhou T, Su X, Wu J, and Cheng J. The role of programmed cell death as an emerging new concept for the pathogenesis of autoimmune diseases. *Clin Immunol Immunopathol* 1996; 80: S2-14.
  25. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267: 1456-1462.
  26. Matsumura R, Kagami M, Tomioka H, Tanabe E, Sugiyama T, Sueishi M, Nakajima A, Azuma M, Okumura K. Expression of ductal Fas antigen in sialoadenitis of Sjögren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 1996; 14: 309-311.
  27. Maria Ohlsson, Kathrine Skarstein, Anne Isine Bolstad, Anne Christine Johannessen, Roland Jonsson. Fas-Induced Apoptosis Is a Rare Event in Sjögren's Syndrome. *Laboratory Investigation* 2001; 81(1): 95.
  28. 36 Congreso Argentino de Reumatología, Mar del Plata, 8 de octubre de 2002. La pilocarpina produce un descenso del número de células CD3-HLA DR en sangre periférica y glándulas salivales menores, aumentando el flujo salival en pacientes con síndrome de Sjögren primario.(Póster). 37 Congreso Argentino de Reumatología-Congreso Internacional del Conosur.Tucumán, 4 de octubre de 2003. Actividad migratoria de linfocitos CD8 y disminución de células mononucleares en pacientes con síndrome de Sjögren primario tratados con pilocarpina: Posible acción colinérgico-muscarínica? Convención Nacional de Reumatología, Buenos Aires, 24 de septiembre de 2005.La estimulación colinérgica M1-M2 disminuye la expresión de moléculas presentadoras de autoantígenos (HLA DR), mejorando parámetros clínicos en pacientes con síndrome de Sjögren primario. (Póster).Convención Nacional de Reumatología, Buenos Aires, 24 de septiembre de 2005.Síndrome de Sjögren primario: Autoanticuerpos antirreceptores muscarínicos colinérgicos son en parte responsables de la ausencia de células calciformes conjuntivales. (Póster). 39 Congreso Argentino de Reumatología-Mar del Plata del 5 al 8 de octubre de 2006 Los anticuerpos Anti M3 fijadores de complemento son marcadores de valor diagnóstico en el síndrome de Sjögren primario. La traslocación nuclear de NFkB se asocia con una marcada apoptosis en las células ductales y acinares de glándulas de salivales menores de pacientes con síndrome de Sjögren primario (ssp). Cambios en la expresión inmunohistoquímica del protooncogen Bcl2 por acción de estimulación colinérgica en pacientes con síndrome de Sjögren primario (ssp).
  29. Ignaz Wessler, Heinz Kilbinger, Fernando Bittinger, Charles James Kirkpatrick. The Non-neuronal Cholinergic System. The Biological Role of Non-neuronal Acetylcholine in Plants and Humans. *The Japanese Journal of Pharmacology* 2001; 85(1): 2-10.
  30. Wessler I, Kilbinger H, Bittinger F, Unger R, Kirkpatrick CJ. The non-neuronal cholinergic system in humans:expression, function and pathophysiology. *LifeSci.*2003 Mar 28; 72(18-19): 2055-61.
  31. Fujii T, Kawashima K. An independent non-neuronal cholinergic system in lymphocytes. *Jpn J Pharmacol.* 2001 Jan; 85(1): 11-5.
  32. Pavlov VA, Ochani M, Gallowitsch Puerta M, Ochani K, Huston JM, Czura CJ, Al-Abed Y, Tracey KJ. Central muscarinic cholinergic regulation of the systemic inflammatory response during endotoxemia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006 Mar 28; 103(13): 5219-23.
  33. Wang H, Yu M, Ochani M, Amella CA, Tanovic M, Susarla S, Li JH, Wang H, Yang H, Ulloa L, Al-Abed Y, Czura CJ, Tracey KJ. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature.* 2003 Jan 23; 421(6921): 384-8.
  34. Ramos-Casals M, Tzioufas AG, Font J. Primary Sjögren's syndrome: new clinical and therapeutic concepts. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2005; 64: 347-354.
  35. Rosas J, Ramos-Casals M, Ena J, García-Carrasco M, Verdu J, Cervera R, Font J, Caballero O, Ingelmo M, Pascual E. Usefulness of basal and pilocarpine-stimulated salivary flow in primary Sjögren's syndrome. Correlation with clinical, immunological and histological features. *Rheumatology* 2002; 41: 670-675.