

# TESIS DOCTORAL

CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA FECAL EN PACIENTES CON  
SÍNDROME DE SJÖGREN PRIMARIO Y SU RELACIÓN CON LA  
PERMEABILIDAD INTESTINAL E INFLAMACIÓN

CHARACTERIZATION OF THE FECAL MICROBIOTA IN PRIMARY SJÖGREN  
SYNDROME PATIENTS AND THE RELATIONSHIP WITH INTESTINAL  
PERMEABILITY AND INFLAMMATION

ANTONIO CANO ORTIZ

2021

TITULO: *Caracterización de la microbiota fecal en pacientes con síndrome de Sjögren primario y su relación con la permeabilidad intestinal e inflamación*

AUTOR: *Antonio Cano Ortiz*

---

© Edita: UCOPress. 2022  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/ucopress@uco.es>

---

# TESIS DOCTORAL

CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA FECAL EN PACIENTES CON  
SÍNDROME DE SJÖGREN PRIMARIO Y SU RELACIÓN CON LA  
PERMEABILIDAD INTESTINAL E INFLAMACIÓN

CHARACTERIZATION OF THE FECAL MICROBIOTA IN PRIMARY SJÖGREN  
SYNDROME PATIENTS AND THE RELATIONSHIP WITH INTESTINAL  
PERMEABILITY AND INFLAMMATION

Trabajo realizado en el Departamento de Genética de la Universidad de Córdoba para  
optar al grado de Doctor en Biociencias y Ciencias Agroalimentarias:

Antonio Cano Ortiz

Dirigido por:

María Isabel Queipo Ortuño

Alberto Membrillo del Pozo

## TÍTULO DE LA TESIS:

Caracterización de la microbiota fecal en pacientes con síndrome de Sjögren primario y su relación con la permeabilidad intestinal e inflamación.

Characterization of the fecal microbiota in patients with primary Sjögren syndrome and the relationship with intestinal permeability and inflammation.

DOCTORANDO: Antonio Cano Ortiz.

## INFORME RAZONADO DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

La Tesis Doctoral de D. Antonio Cano Ortiz se ha llevado a cabo en el Departamento de Genética de la Universidad de Córdoba y el Instituto de Biomedicina de Málaga (IBIMA) en colaboración con el Hospital La Arruzafa de Córdoba. Pese a que se tuvo que realizar una modificación del plan de investigación y solicitar una prórroga de 1 año, el desarrollo se ha ajustado a los plazos y ha permitido al doctorando adquirir una sólida formación en diversas disciplinas de la Genética aplicándolas de un modo transversal. Durante la realización de la Tesis, D. Antonio Cano Ortiz, ha confirmado una excelente aptitud y vocación por la investigación científica y ha demostrado poseer una excelente capacidad de trabajo, organización e integración, así como de redacción de trabajos científicos. El doctorando ha conseguido aportar un nuevo cuerpo de datos sobre el síndrome de Sjögren primario y la microbiota intestinal, ya que los resultados de su investigación sugieren que dicha microbiota en individuos con la patología difiere tanto taxonómica como funcionalmente en comparación con los controles sanos. Además, dichos pacientes presentan niveles significativamente más altos de citoquinas proinflamatorias y zonulina sérica, y niveles significativamente más bajos de expresión de ARNm de IL-10 y FOXP3 (implicados en el desarrollo y función de Células Treg) que los controles sanos. Todos estos resultados se encuentran publicados en el artículo:

Cano-Ortiz, A.; Laborda-Illanes, A.; Plaza-Andrades, I.; Membrillo del Pozo, A.; Villarrubia Cuadrado, A.; Rodríguez Calvo de Mora, M.; Leiva-Gea, I.; Sanchez-Alcoholado, L.; Queipo-Ortuño, M.I. Connection between the Gut Microbiome, Systemic Inflammation, Gut Permeability and FOXP3 Expression in Patients with Primary Sjögren's Syndrome. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 8733. <https://doi.org/10.3390/ijms21228733>



Por todo ello, autorizamos la presentación de la Tesis Doctoral. En Córdoba, 30 de noviembre de 2021

Firma de los Directores:

María Isabel Queipo Ortuño

Alberto Membrillo del Pozo

Dra. María Isabel Queipo Ortuño y Dr. Alberto Membrillo del Pozo

INFORMAN:

Que el trabajo titulado " Caracterización de la microbiota fecal en pacientes con síndrome de Sjögren primario y su relación con la permeabilidad intestinal e inflamación" realizado por D. Antonio Cano Ortiz bajo la dirección de la Dra. María Isabel Queipo Ortuño y el Dr. Alberto Membrillo del Pozo, puede ser presentado para su exposición y defensa como Tesis Doctoral en el Departamento de Genética de la Universidad de Córdoba.

Firmado en Córdoba, a 30 de noviembre de 2021

Fdo. María Isabel Queipo Ortuño

Fdo. Alberto Membrillo del Pozo

## AGRADECIMIENTOS

---

# ÍNDICE

---

ÍNDICE DE TABLAS.....	9
ÍNDICE DE FIGURAS.....	10
ABREVIATURAS.....	12
RESUMEN .....	14
ABSTRACT .....	16
INTRODUCCIÓN.....	18
1. Definición de síndrome de Sjögren.....	18
2. Manifestaciones sistémicas en el síndrome de Sjögren.....	18
3. Afectación oftalmológica en el síndrome de Sjögren.....	20
4. Criterios diagnósticos del síndrome de Sjögren .....	24
5. Incidencia-Prevalencia del síndrome de Sjögren.....	38
6. Patogenia y factores relacionados con síndrome de Sjögren .....	39
6.1. Factores genéticos .....	39
6.2. Factores ambientales.....	40
6.3. Inflamación e inmunidad en el síndrome de Sjögren .....	41
7. Papel del microbioma y el síndrome de Sjögren .....	48
7.1. Composición de la microbiota intestinal.....	48
7.1.1. Evaluación del microbioma .....	50
7.2. El microbioma y la autoinmunidad.....	53
7.3. El microbioma y el síndrome de Sjögren.....	56
8. Papel de la barrera intestinal en el síndrome de Sjögren .....	61
8.1. Función de la barrera intestinal.....	61
8.2. Inmunología de la mucosa intestinal.....	64
9. Tratamiento oftalmológico del síndrome de Sjögren.....	70
9.1. Tratamiento oftalmológico para la afectación moderada del síndrome de Sjögren ..	70
9.2. Tratamiento oftalmológico para la afectación severa del síndrome de Sjögren. ....	72
9.3. Manejo oftalmológico del síndrome de Sjögren en la Unidad de córnea y segmento anterior del Hospital La Arruzafa .....	74
JUSTIFICACIÓN .....	79
HIPÓTESIS.....	79
OBJETIVOS.....	80
MATERIAL Y MÉTODOS.....	80
1. Sujetos de estudio .....	80

2.	Análisis de variables bioquímicas.....	82
3.	Recogida de muestras de heces.....	83
4.	Extracción de ADN y secuenciación de la microbiota intestinal .....	83
5.	Análisis bioinformático .....	84
6.	Análisis de permeabilidad intestinal .....	85
7.	Medición de los niveles de citoquinas en suero.....	85
8.	PCR cuantitativa en tiempo real para células Treg.....	85
9.	Análisis estadístico.....	86
RESULTADOS .....		87
1.	Características clínicas de los pacientes con SSP y de los controles sanos.....	87
2.	Análisis de la diversidad de la microbiota intestinal en ambos grupos de estudio. ....	88
3.	Análisis comparativo de la composición microbiana intestinal de pacientes con SSP y controles sanos.....	93
4.	Discrepancia funcional de la microbiota intestinal entre pacientes con SSP e individuos sanos.....	99
5.	Diferencias en los niveles séricos de mediadores inflamatorios, zonulina y la expresión relativa de FOXP3 en pacientes con SSP en comparación con controles sanos.....	100
6.	Asociación de la microbiota intestinal con los niveles séricos de mediadores inflamatorios, zonulina y la expresión relativa de FOXP3 en pacientes con SSP.....	101
DISCUSIÓN .....		105
CONCLUSIONES.....		111
BIBLIOGRAFÍA.....		112
ANEXOS .....		134

## ÍNDICE DE TABLAS.

---

<b>Tabla 1.</b> Criterios diagnósticos del SS para el grupo de consenso americano-europeo ..	33
<b>Tabla 2.</b> Criterios de clasificación ACR-EULAR 2016 para el SS.....	34
<b>Tabla 3.-</b> Géneros bacterianos más abundantes en cada uno de los tramos del tracto gastrointestinal .....	49
<b>Tabla 4.-</b> Enfoques genómicos para estudiar comunidades microbianas. ....	52
<b>Tabla 5.-</b> Datos demográficos, clínicos, bioquímicos y de medicación de los pacientes con SSP y los controles sanos. ....	87
<b>Tabla 6.-</b> Correlaciones entre la composición de la microbiota intestinal y los niveles séricos de IL-6, IL-12 e IL-17 en pacientes con síndrome de Sjögren primario (SSP) y controles sanos. ....	102
<b>Tabla 7.-</b> Correlaciones entre la composición de la microbiota intestinal y los niveles séricos de TNF-alfa, IL-10, zonulina y la expresión de ARNm de FOXP3 en los grupos de estudio. ....	103

## ÍNDICE DE FIGURAS.

---

<b>Figura 1.</b> Estructura de la película lagrimal con el componente lipídico y acuoso-mucinoso (Holland <i>et al.</i> , 2013). .....	21
<b>Figura 2.</b> Imagen de la exploración con test de Schirmer en paciente con sospecha de SS realizado en la consulta oftalmológica .....	25
<b>Figura 3.</b> Test de fluoresceína en paciente con SS, explorado en lámpara de hendidura. En la figura se observa una tinción con fluoresceína de un paciente con afectación corneal leve/moderada, con la presencia de queratopatía punteada superficial. La tinción con fluoresceína marca aquellas zonas del epitelio corneal que han sido dañadas.....	26
<b>Figura 4.</b> Estadaje de Van Bijsterveld, zonas de tinción en zona nasal y temporal conjuntival, así como centro-corneal (Rasmussen <i>et al.</i> , 2019).....	26
<b>Figura 5.</b> El desarrollo de enfermedades autoinmunes sistémicas en el tiempo (Van der Meulen <i>et al.</i> , 2016).....	59
<b>Figura 6.</b> Rutas para y transcelular en la barrera intestinal. Complejos de unión intercelulares. (Salvo- Romero <i>et al.</i> , 2015).....	61
<b>Figura 7.</b> Mecanismos propuestos por los que la zonulina activa EFGR (receptor del factor del crecimiento epidérmico). A través de la unión directa (1) o a través de la activación de PAR2 (receptor de proteína G) (2), mediado por señal Src (2a) o por liberación de MMPs (metaloproteinasas) y/o ADAMS (desintegrina y metaloproteinasas) (2b) que activarán Pro-HB-EGF (proteasas y factor de crecimiento epidérmico que se une a la heparina).....	64
<b>Figura 8.</b> Pared intestinal (Pawlina <i>et al.</i> , 2020).....	65
<b>Figura 9.</b> Estructura de los distintos componentes del TLAI (Ramiro-Puig <i>et al.</i> , 2008). ..	67
<b>Figura 10.</b> Efectos de la microbiota en la inmunidad (Ubeda <i>et al.</i> , 2012) .....	68
<b>Figura 11.</b> Distribución de casos según técnica quirúrgica .....	76
<b>Figura 12.</b> Tomografía de coherencia óptica que muestra el absceso en la unión injerto-receptor .....	77
<b>Figura 13.</b> Topografía corneal donde se evidencia la irregularidad corneal .....	77
<b>Figura 14.</b> Tomografía de coherencia óptica que muestra el adelgazamiento corneal secundario a un defecto epitelial persistente.....	77
<b>Figura 15.</b> Topografía corneal donde se evidencia el astigmatismo regular .....	78
<b>Figura 16.</b> Imagen con tecnología scheinplufug que muestra la situación actual del trasplante .....	78
<b>Figura 17.</b> Comparación de la diversidad alfa entre pacientes con SSP y controles sanos. (A) Índices de diversidad de Shannon y Simpson; (B) Índices de riqueza Chao1 y ACE...91	
<b>Figura 18.</b> Análisis de componentes principales (PCoA) de las comunidades bacterianas de pacientes con SSP y controles sanos mediante el índice de disimilitud de Bray-Curtis a nivel de género. Puntos azules (pacientes con SSP) y puntos rojos (controles sanos)....93	

**Figura 19.** Composición de la microbiota fecal a nivel de filo en los pacientes con síndrome de Sjögren primario (SSP) y controles sanos (HC). (A) Los datos se muestran como un porcentaje del total de secuencias identificadas por grupo. (B) Filos diferenciadamente abundantes en las muestras de heces de pacientes con SSP en comparación con los controles HC \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,001$ . Las barras indican la desviación estándar media (DE). ..... 94

**Figura 20.** Clasificación microbiana a nivel de familias en muestras de heces de pacientes con síndrome de Sjögren primario (PSS) y controles sanos (HC). (A) Los datos se muestran como un porcentaje del total de secuencias identificadas por grupo. (B) Familias diferenciadamente abundantes en las muestras de heces de pacientes con SSP en comparación con HC. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,001$ . Las barras indican la desviación estándar media (DE). ..... 96

**Figura 21.** Abundancia relativa de generos dentro de la microbiota intestinal de pacientes con síndrome de Sjögren primario (SSp) pacientes y controles sanos. Los datos se muestran como un porcentaje del total identificado de secuencias por grupo. (B) Géneros diferencialmente abundantes en las muestras de heces de SSP y HC. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,001$ . Las barras indican la media  $\pm$  desviación estándar (DE) ..... 98

**Figura 22.** Mapa de calor basado en las predicciones funcionales de los genes bacterianos a partir de muestras fecales de pacientes con síndrome de Sjögren primario (SSP) y controles sanos (HC). ..... 100



## ABREVIATURAS

---

ACPA: anticuerpos antipéptido / proteína anticitrulinados

ADAMS: Desintegrina y metaloproteinasa

AR: artritis reumatoide

BAFF: factor de activación de células B

CIOMS: consejo de Organizaciones Internacionales de las ciencias Médicas.

DALK: queratoplastia anterior laminar profunda

DNO: diabéticos no obesos

DSAEK: queratoplastia endotelial automatizada con retirada de la mebrana de Descemet.

DMEK: queratoplastia endotelial de la membrana descemet

EGF: factores de crecimiento epidérmico

EGFR: receptor del factor del crecimiento epidérmico

EOS: enfermedad de ojo seco

EAS: enfermedades autoinmunes sistémicas

ERO: especies reactivas de oxígeno

HLA 1: locus antígeno leucocitario humano 1

IgG4: inmunoglobulinaG4

IgG4-RD: enfermedades relacionadas con IgG4

IL: interleuquina

IL 17: interleuquina 17

IMC: índice de masa corporal

INF: interferón

KEGG: Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto.

LCGP: lente de contacto gas permeable

LES: Lupus eritematoso sistémico.

LTh: linfocitos T helper

MALT: linfoma de tejido linfoide asociado a mucosas

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad

MMPs: metaloproteinasas

NOD 1: dominio de oligomerización de unión de nucleótidos 1

NOD 2: dominio de oligomerización de unión de nucleótidos 2

OMS: Organización Mundial de la Salud

OTU: unidad taxonómica operativa

PAR2: receptor de proteína G

QPP: queratoplastia penetrante

Pro-HB-EGF: Proteasas y factor de crecimiento epidérmico que se une a la heparina

RGPD : Reglamento (UE) N. 2016/679 General de Protección de datos.

RM: resonancia magnética

SALK: queratoplastia laminar anterior superficial

SNC: sistema nervioso central

SNP: sistema nervioso periférico

SS: síndrome de Sjögren

SSP: síndrome de Sjögren primario

SSS: síndrome de Sjögren secundario

TGF $\beta$ : factor de crecimiento transformante  $\beta$

TLAI: tejido linfoide asociado al intestino

TLR: receptores de tipo Toll

Treg: linfocitos T reguladores

ZOT: toxina zonulina ocludens

## RESUMEN

---

El síndrome de Sjögren (SS) es una enfermedad de tipo autoinmune con importante afectación ocular. Su etiología es aún desconocida con un número de factores elevados como posibles generadores de la enfermedad. El cambio en la microbiota intestinal ha sido reportado como un factor diferencial entre los sujetos sanos y los sujetos con SS. Diferencias en la microbiota intestinal han sido reportadas en otras patologías sistémicas autoinmunes.

Para no tener factores de confusión entre otras patologías sistémicas autoinmunes se ha realizado un estudio en pacientes estrictamente seleccionados y con ausencia de otras alteraciones inmunitarias, siendo seleccionados sólo los pacientes con síndrome de Sjögren primario (SSP).

Los objetivos de esta tesis doctoral han sido la caracterización de microbiota fecal en pacientes con SSP comparados con pacientes sanos, la determinación de parámetros inflamatorios en plasma de pacientes con SSP comparados con pacientes sanos y su relación con microbiota fecal, así como la determinación de permeabilidad intestinal a través de zonulina plasmática.

En esta tesis doctoral se ha realizado un estudio de pacientes con SSP para poder establecer si los cambios en la microbiota intestinal son asociados a la presencia de esta enfermedad de forma aislada, o bien si en el SSP no existen diferencias con los sujetos sanos. De este modo podríamos centrar investigaciones posteriores en otras patologías autoinmunes como la artritis reumatoide (AR) y el lupus eritematoso sistémico (LES), entre otras. Algunos autores han estudiado patologías autoinmunes encontrando diferencias en la microbiota intestinal lo que nos ha llevado a profundizar en el estudio del SSP como entidad aislada sin otras enfermedades autoinmunes asociadas que nos lleven a posibles confusiones.

Se han estudiado parámetros de inflamación y de permeabilidad intestinal para intentar establecer relaciones entre estos parámetros y los cambios de la microbiota intestinal, así como se ha intentado establecer o aportar información sobre la etiopatogenia de la enfermedad.

Los resultados obtenidos muestran que la microbiota intestinal de los pacientes con SSP difieren tanto a nivel taxonómico como a nivel funcional con respecto a controles sanos. El perfil de microbiota intestinal de nuestros pacientes con SSP presentó una menor diversidad y riqueza siendo el filo Bacteroidetes el grupo más representado

Se ha encontrado un aumento de la producción de citoquinas proinflamatorias y la disminución de la liberación de citoquinas antiinflamatorias (IL-10). Se necesitan más estudios para comprender mejor la realidad del impacto de la disbiosis en el curso del SSP y para concebir estrategias preventivas o terapéuticas para contrarrestar la inflamación impulsada por el microbioma.

## ABSTRACT

---

Sjögren's syndrome (SS) is an autoimmune disease with significant ocular involvement. Its etiology is still unknown with a high number of factors as possible generators of the disease. The change in the gut microbiota has been reported as a differential factor between healthy subjects and subjects with SS. Differences in the intestinal microbiota have been reported in other autoimmune systemic pathologies.

In order to avoid confounding factors between other autoimmune systemic pathologies, our study has been carried out in strictly selected patients and with the absence of other immune alterations, only selecting patients with primary Sjögren's syndrome (SSP).

The objectives of this doctoral thesis have been the characterization of the fecal microbiota in patients with SSP compared to healthy patients, the determination of inflammatory parameters in plasma in SSP patients compared to healthy patients and their relationship with fecal microbiota as well as the determination of intestinal permeability through plasma zonulin.

In this doctoral thesis, a study of patients with SSP has been carried out in order to establish if changes in the intestinal microbiota are associated with the presence of this disease in isolation, or if there are no differences in SSP with healthy subjects. In this way, we could focus further research on other autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis (AR) and systemic lupus erythematosus (LES), among others. Some authors have studied autoimmune pathologies finding differences in the intestinal microbiota, which has led us to delve into the study of SSP as an isolated entity without other associated autoimmune diseases that lead us to possible confusion.

Inflammation and intestinal permeability parameters have been studied to try to establish relationships between these parameters and changes in the intestinal microbiota, as well as attempts to establish or provide information on the etiopathogenesis of the disease.

The results obtained show that the intestinal microbiota of patients with SSP differ both taxonomic level and functional level with respect to healthy controls. The intestinal

microbiota profile of our patients with SSP presented less diversity and richness, the Bacteroidetes phylum was the most represented group

An increase in the production of pro-inflammatory cytokines and a decrease in the release of anti-inflammatory cytokines (IL-10) have been found. More studies are needed to understand the impact of dysbiosis on the course of SSP and to devise preventive or therapeutic strategies to counter microbiome-driven inflammation.

# INTRODUCCIÓN

---

## 1. Definición de síndrome de Sjögren

El síndrome de Sjögren (SS) es una enfermedad autoinmune inflamatoria caracterizada por la disminución de la función de las glándulas exocrinas lagrimales y salivares, lo que causa los signos característicos de la enfermedad; sequedad de boca y sequedad ocular. Además de los síntomas glandulares, a menudo se observan manifestaciones sistémicas que involucran tejidos extra glandulares (Mariette *et al.*, 2018).

En ausencia de otras enfermedades, el síndrome de Sjögren es conocido como síndrome de Sjögren primario (SSP), mientras que si ocurre en presencia de otras enfermedades autoinmunes se denomina síndrome de Sjögren secundario (SSS), siendo las más frecuentes la artritis reumatoide (AR) y el lupus eritematoso sistémico (LES).

## 2. Manifestaciones sistémicas en el síndrome de Sjögren

Muchos órganos que no son glándulas exocrinas son afectados en pacientes con SS, incluyendo: piel, articulaciones, pulmones, corazón, tracto gastrointestinal, riñón, vejiga, aparato genital, sistema nervioso central y periférico. Así como afectación del sistema hematológico con mayor riesgo de enfermedades linfoproliferativas.

Algunos autores han descrito que los hombres con SS son más vulnerables a complicaciones oculares y manifestaciones sistémicas extraglandulares en comparación con las mujeres (Mathews *et al.*, 2015) aunque se pone en debate por otros (Ramos-Casals *et al.*, 2008).

Afectación cutánea: Los hallazgos más frecuentes son xerosis, púrpura, fenómeno de Raynaud, vasculitis cutánea, eritema anular y queilitis angular entre otros. La xerosis es la característica más frecuente generando sequedad y prurito. La xerosis se estima que ocurre entre el 31 y el 72% de pacientes con SS. (Kittridge *et al.*, 2011). El fenómeno de Raynaud ha sido publicado hasta en el 30% de los pacientes.

Afectación musculoesquelética: El SS ha sido asociado con manifestaciones musculares y articulares, incluyendo artralgias y siendo menos frecuente la presencia de

artritis. Aproximadamente el 50% de los pacientes refieren artralgiás. La artropatía es habitualmente simétrica, intermitente y no erosiva (Amezcuá-Guerra *et al.*, 2013). La afectación muscular es leve y presenta un curso insidioso iniciándose como debilidad en la musculatura proximal.

Fatiga y fibromialgia: La fatiga es el síntoma más frecuente e incapacitante pero su patogenia no está comprendida completamente. Son frecuentes las alteraciones en los patrones de sueño y es frecuente la asociación de fatiga y depresión en estos pacientes (Torrente-Segarra *et al.*, 2017).

Afectación del sistema nervioso periférico (SNP): Se encuentra entre las manifestaciones extraglandulares más comunes, particularmente las neuropatías sensoriales. La mononeuritis múltiple, las neuropatías craneales y autonómicas son menos frecuentes (Birnbaum *et al.*, 2010).

Afectación del sistema nervioso central (SNC): Afectación menos frecuente pudiendo simular a la esclerosis múltiple. La disfunción cognitiva es habitual y la depresión también podría acontecer.

Afectación del sistema respiratorio: Incluye el tracto respiratorio superior y la enfermedad de las vías respiratorias grandes y pequeñas. Es posible la enfermedad pulmonar intersticial y la neumonitis intersticial linfocítica está fuertemente asociada con SS (Lynch *et al.*, 2009).

Afectación renal: La nefritis intersticial puede causar acidosis tubular renal, diabetes insípida nefrogénica e hipopotasemia sintomática. También puede causar cistitis intersticial con síntomas de infección del tracto urinario y cultivos de orina negativos.

Afectación cardíaca: Pueden presentar pericarditis y enfermedad miocárdica (Luni *et al.*, 2017).

Afectación digestiva: La disfagia, las náuseas, el dolor epigástrico y la dispepsia son habituales. También puede aparecer gastritis atrófica crónica, asociada con colangitis biliar primaria y hepatitis autoinmune. La disfagia es frecuente pero su presencia puede estar relacionada con el déficit de flujo salivar (Ebert *et al.*, 2012).



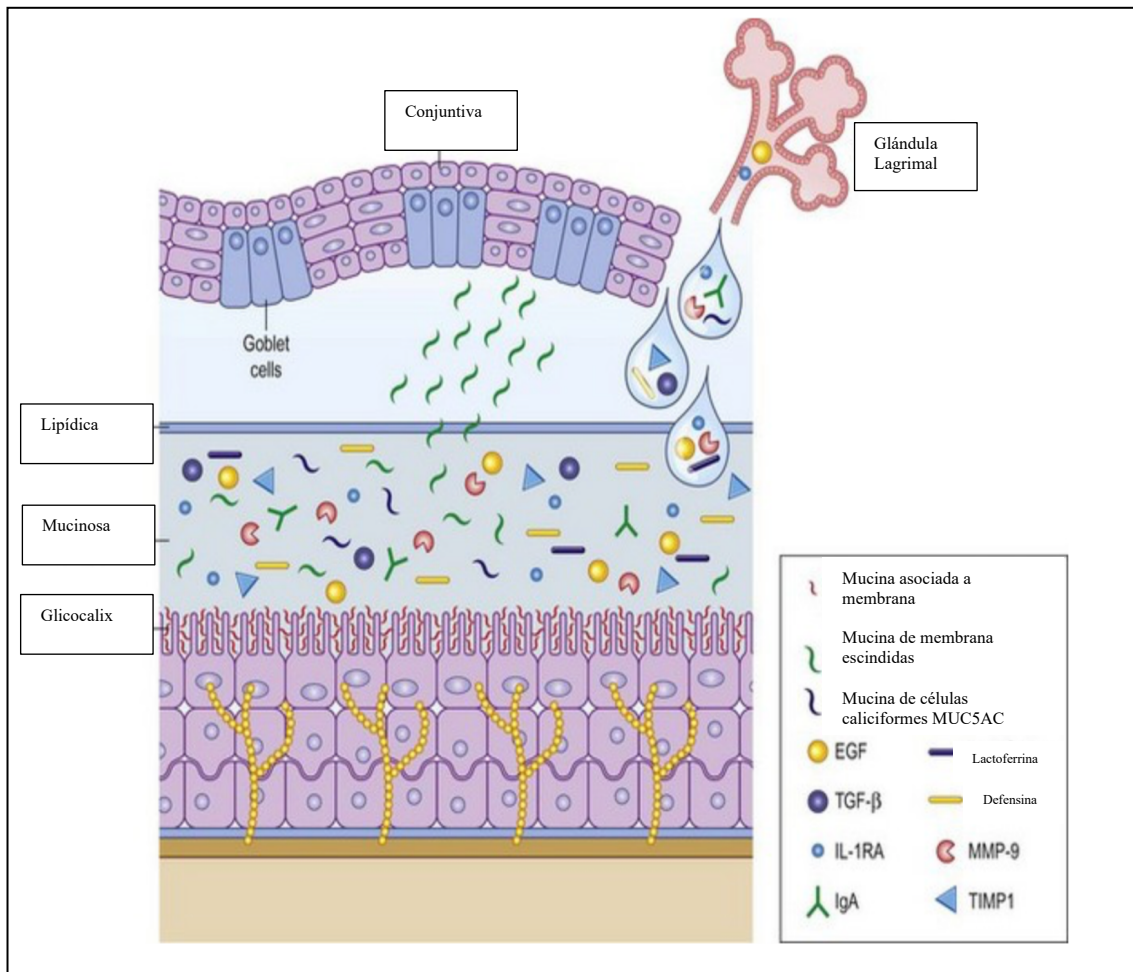
Los pacientes con SS tienen un riesgo incrementado de linfoma no hodking comparado con población general. Este riesgo incrementado se evidencia tanto en SSP como SSS. El riesgo relativo publicado para linfoma fue de 4.8 para el SSP y 9.6 para el SSS con un riesgo medio de 6.6 (Ekström Smedby *et al.*, 2008), siendo de 5 a 44 veces más frecuente que para población sin SS. Un estudio multicéntrico de 101 pacientes con SSP que desarrollaron linfoma establecieron asociación con el aumento de la glándula salivar, niveles bajos de complemento C4, crioglobulinemia, linfopenia y factor reumatoide con el riesgo de desarrollo de linfoma (Nocturne *et al.*, 2015).

La enfermedad conocida como SS es una patología que afecta a gran parte de nuestros sistemas más importantes, así como al sistema visual por afectación de la glándula lagrimal. Por lo tanto, se necesita la colaboración entre los oftalmólogos y otras especialidades para garantizar un enfoque multidisciplinario apropiado para el paciente con SS.

### **3. Afectación oftalmológica en el síndrome de Sjögren**

La afectación a nivel de la glándula lagrimal tiene una implicación a nivel de la cantidad y la calidad de la lágrima y ésto a su vez determinará los síntomas y signos del paciente.

El componente acuoso de la lágrima viene determinado por la glándula lagrimal y sus nervios eferentes, así como por la córnea y la conjuntiva junto con sus nervios aferentes (Rocha *et al.*, 2008). Desde la superficie, la película lagrimal consta de tres capas: capa lipídica, capa acuosa y capa mucilaginosa (**Figura 1**), aunque actualmente se encuentra en debate si existe una clara delineación entre la capa acuosa y la mucilaginosa (Holland *et al.*, 2013).



**Figura 1.** Estructura de la película lagrimal con el componente lipídico y acuoso-mucinoso (Holland *et al.*, 2013).

La producción de la lágrima, así como el reflejo lagrimal depende de la integridad de las terminaciones nerviosas de la córnea. Tanto la densidad de las fibras nerviosas sensoriales como su función parecen reducirse en SS en comparación con sujetos sanos (Bianciardi *et al.*, 2015; Villani *et al.*, 2013).

Un deterioro funcional de los nervios corneales puede reducir los síntomas oculares, pero al mismo tiempo elimina el reflejo lagrimal deseado, reduciendo así la lágrima (Meng *et al.*, 2013). Es este motivo por el que en ocasiones los pacientes con SS presentan momentos durante la evolución de su enfermedad en la que presentan menos síntomas oculares. La no sensibilidad corneal hace que presenten menor sensación de cuerpo extraño, escozor y malestar corneal, pero a su vez esta pérdida de sensibilidad corneal reduce la producción de lágrima asociada a ella con lo que continúa empeorando la superficie ocular, apareciendo queratitis y afectación del epitelio corneal sin demasiados síntomas oculares asociados.

Se conoce que para que la película lagrimal tenga un volumen y unas características funcionales determinadas va a ser dependiente de diferentes factores. Las células caliciformes conjuntivales producen mucina que ayuda a estabilizar la película lagrimal debido a su carácter hidrofílico (Stevenso *et al.*, 2016) además de generar factores inmunorreguladores. Las glándulas de Meibomio, situadas en el borde palpebral se encargan de enriquecer la lágrima generada en la glándula lagrimal y son responsables del mantenimiento de la capa lipídica, de modo que su disfunción puede generar cambios cualitativos en la película lagrimal. La disfunción de la glándula de Meibomio es una de las causas más comunes de alteración de la lágrima, caracterizada por obstrucciones crónicas del conducto terminal y/o cambios cualitativos y/o cuantitativos en la secreción glandular. La microscopía confocal in vivo y los estudios de citología de impresión muestran que la conjuntiva se ve afectada con frecuencia en SS, de modo que los pacientes con SS tienen más metaplasia escamosa, pérdida de células caliciformes y agregados mucosos en comparación con sujetos sanos y pacientes con otras causas de enfermedad de ojo seco (EOS) (Menzies *et al.*, 2015; Sullivan *et al.*, 2018; Tsubota *et al.* 1996).

Es frecuente que la afectación de la película lagrimal sea de carácter mixto. La afectación de la calidad de la lágrima, determinada en gran medida por la afectación de las glándulas de Meobomio se asocia a la afectación en el volumen de la película lagrimal, deteminado por la glándula lagrimal, ocasionando por tanto una merma tanto en la cantidad como en la cualidad de lágrima. Así queda a un lado el concepto de ojo seco evaporativo y ojo seco hiposecretor como entidades aisladas y gana fuerza el concepto de ojo seco de carácter mixto en un porcentaje muy importante de los pacientes.

El SS conduce a un flujo lagrimal reducido como resultado de la destrucción inflamatoria de acinos y conductos, además del daño de la inervación secretomotora. Sin embargo, en las primeras etapas de la enfermedad, algunos pacientes pueden aumentar el flujo lagrimal debido a cambios en la composición del líquido lagrimal y a una menor viscosidad.

En el SS se produce un infiltrado mixto de linfocitos T, linfocitos B, células dendríticas y células natural killer, a nivel glandular (Christodoulou *et al.*, 2010). Esta

infiltración linfocítica progresiva de la glándula lagrimal ocasiona disminución de las secreciones por la atrofia y sustitución del tejido glandular por adipocitos

En los casos de SS grave se observa queratinización del epitelio conjuntival y corneal (Chen *et al.*, 2010).

La fotofobia es común, ocasionada por la alteración corneal y los pacientes sufren pérdida de visión funcional por sequedad del epitelio corneal, el cual genera alteración en la difracción de la luz cuando atraviesa la primera lente natural del ojo (córnea). Los pacientes pueden quejarse de molestias, picazón en los ojos al despertar y baja tolerancia al mal tiempo sin quejas explícitas de ojo seco. Paradójicamente, algunos pacientes con EOS grave relacionada con SS no se quejan de ojos secos a pesar de los signos objetivos, probablemente debido a la disminución de la sensación ocular, consecuencia de la enfermedad avanzada del ojo seco.

Las enfermedades que amenazan la visión como la uveítis, la epiescleritis/escleritis, la neuropatía óptica, la vasculitis retiniana, la conjuntivitis cicatrizante, las úlceras corneales, los infiltrados infecciosos o estériles corneales o la perforación corneal son más frecuentes en SS que en otras causas de enfermedad de ojo seco (Akpek *et al.*, 2015).

Existe un amplio espectro dentro de la misma enfermedad en relación a los síntomas y signos que pueden aparecer en los pacientes, desde síntomas y signos leves como la sensación de cuerpo extraño y la queratitis punteada superficial, hasta situaciones graves que obligan a la realización de trasplantes corneales/queratoplastias por inminente perforación corneal.

La morbilidad asociada con SS no debe subestimarse, así como la alta repercusión psicológica y la reducida calidad de vida, algo común entre los pacientes (Hyphantis *et al.*, 2011; Bowman *et al.*, 2004). Es sabido que las tasas de mortalidad aumentan, en parte debido a los mayores riesgos de linfoma y enfermedad cardiovascular (Brito-Zeron *et al.*, 2016).

#### 4. Criterios diagnósticos del síndrome de Sjögren

El diagnóstico de SS se realiza en individuos con sequedad oral y/o ocular en los que existe evidencia de una base autoinmune de la disfunción glandular exocrina.

El SS debería sospecharse en individuos con síntomas persistentes de ojo seco y/o sequedad oral, aumento de glándula parotídea, un inexplicable aumento de caries dentales o alteración en los tests serológicos.

No existe un único test diagnóstico. El diagnóstico clínico se realiza en presencia de clínica compatible y tests bioquímicos, así como la exclusión de otras causas de sequedad ocular y/o oral. El diagnóstico de SS no debería realizarse basándose únicamente en la presencia de anticuerpos, ya que estos anticuerpos podrían encontrarse no solo en pacientes con SS sino afectados de otros procesos reumatológicos y enfermedades del tejido conectivo, así como en sujetos sanos.

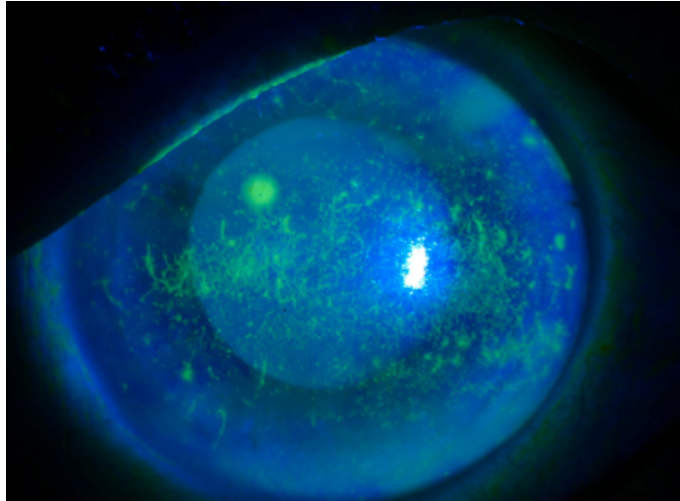
La evaluación de la sequedad ocular es cuantificada a través del **Test de Schirmer** que mide la producción refleja de lágrima (**Figura 2**). Consiste en la colocación de un papel de filtro estéril de un kit estandarizado en el margen inferior del párpado, en la unión entre la zona central y el tercio lateral. El exceso de lágrima es medido pasados 5 minutos sin la utilización de colirio anestésico y con el paciente manteniendo los ojos cerrados, para la evaluación del reflejo lagrimal y es realizado con anestésico tópico para la medición de la producción lagrimal basal. Cuando la tira de papel es mojada menos de 5 mm sin la utilización de anestésico es indicativo de la deficiencia de lágrima y es considerado un criterio diagnóstico para el SS. Los hallazgos suelen ser parecidos en ambos ojos (Alfonso *et al.*, 1999).



**Figura 2.** Imagen de la exploración con test de Schirmer en paciente con sospecha de SS realizado en la consulta oftalmológica.

La valoración de la superficie ocular se valora en función al daño del epitelio conjuntival y corneal mediante técnicas de tinción de tejido desvitalizado como el test de Rosa de Bengala. Este test ha sido sustituido en pacientes con ojo seco, por ser una técnica dolorosa, por el test de fluoresceína, el cual sólo analiza el daño epitelial corneal y el test verde de lisamina para la tinción del epitelio conjuntival alterado.

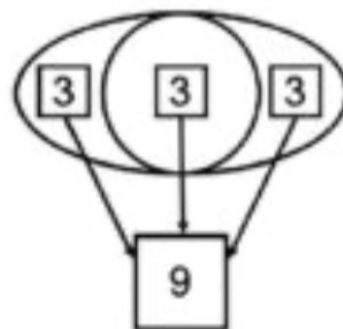
El **Test de fluoresceína** es el más empleado para la evaluación corneal con la colocación de una gota de fluoresceína en la superficie corneal para la valoración del tiempo de ruptura lagrimal y la afectación del epitelio de la córnea aplicando una luz azul cobalto antes de que trascurren 4 minutos (**Figura 3**). El daño epitelial es mostrado mediante la intensificación del amarillo generado por el colorante y la luz azul, mostrando la discontinuidad del epitelio en la exploración a través de lámpara de hendidura (Witcher JP *et al.*, 2010).



**Figura 3.** Test de fluoresceína en paciente con SS, explorado en lámpara de hendidura. En la figura se observa una tinción con fluoresceína de un paciente con afectación corneal leve/moderada, con la presencia de queratopatía punteada superficial. La tinción con fluoresceína marca aquellas zonas del epitelio corneal que han sido dañadas.

El **estadaje del daño de la superficie corneal y conjuntival** es cuantificado con la puntuación de *Van Bijsterveld* (**Figura 4**) que podría ser usado para las tinciones de Rosa Bengala, verde lisamina y fluoresceína. Un diagnóstico de SS supone una puntuación igual o superior a 4 (Van Bijsterveld 1969) en el sumatorio de las zonas nasal conjuntival, temporal conjuntival y centrocorneal.

Tinción conjuntival (verde lisamina o rosa bengal) y corneal (fluoresceína)	
Puntuación	Tinción
0	Ninguna
1	Escasamente dispersos
2	Densamente dispersos
3	Puntos/tinción confluyente



Positivo > 4

Máxima puntuación: 9

**Figura 4.** Estadaje de Van Bijsterveld, zonas de tinción en zona nasal y temporal conjuntival, así como centro-corneal (Rasmussen *et al.*,2019).

La cuantificación de la hipofunción salivar se realiza a través de diferentes tests como la **escintigrafía de la glándula salivar** que mide la función a través de una imagen dinámica radionuclear a través de la excreción de tecnecio. Aproximadamente un tercio de los pacientes con SS tienen este test positivo (Aung *et al.*, 2000).

La **sialometría** es la medida de la tasa de producción de saliva. La tasa de flujo de saliva total no estimulada es una prueba relativamente simple que evalúa la producción de saliva basal, principalmente de las glándulas sublingual y submandibular, y evita la necesidad de equipos especiales o agentes de imagen. Disminuye con la edad y tiene una correlación negativa con la extensión de la caries dental (Percival *et al.*, 1994). Se pide al paciente que expectore una vez y luego que recoja toda la saliva en un recipiente previamente pesado. Después de 5 a 15 minutos, se vuelve a pesar el vial de recolección y se calcula el volumen de saliva utilizando la gravedad específica del agua (1 gramo / ml). Una colección de  $\leq 0.1$  ml / minuto durante este tiempo es indicativa de función salival anormal.

**Ecografía de las glándulas salivales:** La ecografía de las glándulas salivales revela anomalías características en la estructura del parénquima glandular que pueden clasificarse y utilizarse para el diagnóstico de SS. La glándula enferma en SS típicamente muestra múltiples áreas hipoeoicas con bordes convexos (Jousse-Joulin *et al.*, 2017). Las bandas lineales hiperecoicas, los quistes y las calcificaciones pueden ser evidentes en la enfermedad más avanzada. La ecografía de glándulas salivales tiene un valor diagnóstico en SS comparable al de la gammagrafía o la biopsia de glándulas salivales (Milic *et al.*, 2009) y una buena concordancia con el resultado de la biopsia de glándulas parótidas y labiales. La inclusión de los resultados ecográficos de las glándulas salivales puede mejorar el rendimiento diagnóstico de los criterios de clasificación del SS. La ecografía de las glándulas salivales también puede reemplazar la tinción de la superficie ocular, la prueba de Schirmer o la sialometría en los criterios de clasificación ACR / EULAR sin ninguna pérdida en su sensibilidad o especificidad (Van Nimwegen *et al.*, 2020). La ecografía anormal de las glándulas salivales, definida principalmente por la presencia de focos hipoeoicos en el parénquima glandular, se correlaciona fuertemente con la presencia de anticuerpos anti-Ro/ SSA (Mossel *et al.*, 2017). Por tanto, no puede servir



como sustituto de la biopsia de glándulas salivales labiales en un paciente que carece de estos anticuerpos.

La **aspiración con aguja fina guiada por ecografía y la biopsia con aguja gruesa** de las glándulas salivales principales es una herramienta importante para la evaluación de masas solitarias y agrandamiento asimétrico de la glándula parótida, ya que estos hallazgos son preocupantes por la posible presencia de un linfoma de glándulas salivales u otra neoplasia (Baer *et al.*, 2021)

La **resonancia magnética (RM)** de las glándulas parótidas en SS se caracteriza por la falta de homogeneidad del parénquima en las secuencias ponderadas en T1 y T2. Por lo general, existe un patrón nodular, caracterizado por múltiples áreas hipo e hiperintensas de tamaño variable (Niemelä *et al.*, 2001). Se cree que este patrón de "panal de abeja" o "sal y pimienta" surge de la infiltración grasa, fibrosis, dilatación ductal e infiltración linfocítica de los lóbulos parótidos. Los resultados de la RM se correlacionan bien con los de la biopsia de glándulas salivales. La RM también proporciona una técnica no invasiva para realizar la sialografía en las glándulas salivales, aunque puede que sólo esté disponible en centros especializados. Los estudios de RM potenciados con gadolinio con secuencias fuertemente potenciadas en T2 y con métodos de sustracción digital para la supresión de la señal grasa se pueden utilizar para visualizar la dilatación y/o estenosis del conducto de Stensen y, por lo tanto, tienen una utilidad particular en la evaluación de pacientes con parotiditis recurrente (Heverhagen *et al.*, 2000; André *et al.*, 2021). Dado que la RM no es invasiva, las únicas contraindicaciones son las aplicables a la realización de estudios de RM en general. En particular, la administración de gadolinio en el contexto de una función renal significativamente reducida se ha asociado con el desarrollo de fibrosis sistémica nefrogénica.

**Biopsia de glándulas salivales:** una biopsia de glándulas salivales labiales puede servir como una herramienta de diagnóstico importante en pacientes con sospecha de SS. Las indicaciones para la biopsia de glándulas salivales en la práctica clínica incluyen:

- Confirmación de un diagnóstico de sospecha de SS, particularmente en pacientes sin otra evidencia de autoinmunidad.

- Exclusión de otras afecciones que pueden causar hipofunción salival y agrandamiento de las glándulas bilaterales

Se debe tomar una biopsia de glándulas salivales labiales de una parte no traumatizada del labio inferior que sea macroscópicamente normal. Se ha notificado entumecimiento labial persistente hasta en el 6% de los pacientes sometidos a biopsia (Varela Centelles *et al.*, 2014). El riesgo de esta complicación se puede minimizar con el uso de una técnica mínimamente invasiva en la que la incisión inicial de la mucosa labial solo involucre el epitelio y las glándulas individuales (Kim *et al.*, 2016). Se debe tener cuidado durante todo el procedimiento para evitar dañar las fibras nerviosas sensoriales que se encuentran justo debajo de las glándulas salivales menores. La biopsia debe contener al menos cuatro lóbulos de tejido de la glándula salival para que se considere aceptable para la evaluación. La característica histológica clave es una colección focal o colecciones de linfocitos estrechamente agregados, denominados focos linfocíticos, que suelen ser periductal. Este patrón histológico se conoce como sialoadenitis linfocítica focal. Ciertas características patológicas como la atrofia parenquimatosa, la fibrosis y las células linfoides dispersas son casi universales en los adultos mayores. Las biopsias con solo estos cambios se clasifican como sialoadenitis crónica inespecífica o sialoadenitis crónica esclerosante, según la gravedad. Las biopsias que muestran sialadenitis linfocítica focal también pueden mostrar algunas o todas estas características patológicas, y se cree que éstas se relacionan con los efectos independientes del envejecimiento más que con la inflamación inmunomediada, pero no se pueden excluir las consecuencias de la inflamación crónica. Sin embargo, las células plasmáticas y los linfocitos T dispersos son hallazgos normales en las glándulas sanas que pertenecen al sistema inmunológico de las mucosas. El sistema de clasificación más ampliamente aceptado para la sialoadenitis linfocítica focal registra el número de focos de tejido linfoide en la sección de tejido, normalizado a un área de superficie de 4 mm<sup>2</sup>. Cada foco se define como una colección de 50 o más células linfoides mononucleares (predominantemente linfocitos con sólo una minoría de células plasmáticas) adyacente a los acinos mucosos de apariencia normal y no en un área de fibrosis glandular o dilatación ductal (Daniels *et al.*, 1984). El esquema de clasificación incluye sialoadenitis linfocítica focal en una biopsia de glándula salival menor con uno o más focos de linfocitos por 4 mm<sup>2</sup> (puntuación ≥1) como criterio

histopatológico (Shiboski *et al.*, 2017). La experiencia en la lectura de biopsias de glándulas salivales labiales es fundamental para una interpretación adecuada, y se están estableciendo directrices para este proceso interpretativo (Fisher *et al.*, 2017). La determinación de la puntuación de una biopsia de glándulas salivales labiales que muestra sialadenitis linfocítica focal requiere tres pasos. Primero, el área de superficie del tejido glandular se mide en una sola sección de tejido que contiene múltiples glándulas seccionadas a través de su porción media. Esto requiere una retícula calibrada o un análisis de imágenes asistido por computadora. En segundo lugar, se cuenta el número de focos linfocíticos en toda la sección de tejido. Se tiene cuidado de contar sólo los focos con 50 o más linfocitos de agregación compacta adyacentes a los acinos mucosos de apariencia normal. En tercer lugar, el número de focos se divide por el área de superficie glandular total de la sección y luego se multiplica por 4 para obtener la puntuación (número de focos / 4 mm<sup>2</sup>). Una biopsia labial positiva (que muestra sialadenitis linfocítica focal con una puntuación  $\geq 1$ ) se encuentra en el 66 a 89 % de los pacientes con SS clasificados por los criterios del Grupo de Consenso Americano-Europeo (AECG) de 2002, lo que resulta en una sensibilidad aproximada del 80 % (Theander *et al.*, 2006). Sin embargo, no es patognomónico de SS, y se encuentra en pacientes con otros trastornos del tejido conectivo (artritis reumatoide, enfermedad mixta del tejido conectivo, lupus eritematoso sistémico, esclerosis sistémica limitada) y hasta en un 15 % de adultos mayores sanos (Radfar *et al.*, 2002). La inmunocitología de los infiltrados de las glándulas salivales labiales muestra que las células T CD4 + predominan en las lesiones menos graves, mientras que las células B predominan en las lesiones más avanzadas (Christodoulou *et al.*, 2010). Se observan estructuras similares a centros germinales en aproximadamente el 20 % de los pacientes con sialadenitis linfocítica focal.

**Pruebas serológicas:** Los pacientes deben someterse a pruebas de detección de anticuerpos anti-Ro/ SSA y anti-La/ SSB, ANA, mediante un ensayo de inmunofluorescencia y análisis de el factor reumatoide. El apoyo para el diagnóstico de SS incluiría pruebas positivas para anticuerpos anti-Ro/ SSA con o sin anticuerpos anti-La/ SSB, la combinación de un ANA  $\geq 1: 320$  con un factor reumatoide positivo o la presencia de un patrón de tinción de centrómero. en la prueba de ANA inmunofluorescente ( Bournia V *et al.*, 2010). El factor reumatoide está presente en el 40 al 60 % de los

pacientes. El ANA no debe usarse como prueba de detección para SS o para anticuerpos relacionados con SS, ya que algunos pacientes pueden tener anticuerpos anti-Ro/ SSA y/ o anti-La/ SSB a pesar de un ensayo de inmunofluorescencia negativo para ANA.

Los pacientes con SS a menudo poseen anticuerpos contra los antígenos Ro/ SSA o La/ SSB, y muchos pacientes poseen ambos. La frecuencia de anticuerpos anti-Ro/ SSA y / o anti-La/ SSB ha variado entre los estudios, pero generalmente entre el 60 y el 80 % de los pacientes con SS exhiben uno o ambos de estos autoanticuerpos. Los inmunoensayos en fase sólida de alto rendimiento para anticuerpos anti-Ro/ SSA y anti-La/ SSB tienen una mayor sensibilidad, pero menor especificidad que los métodos de ensayo más antiguos. Por lo tanto, se debe tener cuidado al interpretar los resultados de prueba débilmente positivos con estos inmunoensayos. La reactividad del anticuerpo anti-Ro / SSA se dirige a dos antígenos polipeptídicos distintos con pesos moleculares de 60 kD y 52 kD que están codificados por genes diferentes (Chan *et al.*, 1991). Los pacientes con SS pueden expresar actividad contra las proteínas de 60 kD y 52 kD o contra cualquiera de las proteínas solas (Tan *et al.*, 1989). La mayoría muestra reactividad frente a ambos antígenos (Menendez *et al.*, 2013). La presencia de anticuerpos anti-Ro52 se ha asociado con una enfermedad más grave (Retamozo *et al.*, 2012). Al considerar el diagnóstico de SS, es importante reconocer que uno de los subconjuntos de lupus eritematoso sistémico se caracteriza por anticuerpos contra Ro / SSA, y el etiquetado del anticuerpo como "asociado al síndrome de Sjögren" (SSA) en el informe de laboratorio puede dar lugar a confusión al sugerir que este anticuerpo es específico para SS, lo que no lo es, ya que también se encuentra en pacientes con lupus eritematoso sistémico y otras afecciones (Harley *et al.*, 1989).

**Otros autoanticuerpos en SS:** La presencia de anticuerpos anticentrómeros define un pequeño subconjunto (aproximadamente el 5%) de pacientes con SS que pueden tener algunas características de esclerosis sistémica (esclerodermia), como el fenómeno de Raynaud, pero carecen de hallazgos suficientes para hacer ese diagnóstico (Baer *et al.*, 2016). Aproximadamente la mitad de los pacientes con SS con anticuerpos anticentrómeros carecen de anticuerpos contra Ro/ SSA y La/ SSB, y la presencia de anticuerpos anticentrómeros puede ayudar a respaldar una base autoinmune para los síntomas y hallazgos, y para el diagnóstico de SS.

La presencia de anticuerpos antipéptido/ proteína anticitrulinados no indica por sí sola que los pacientes tengan artritis reumatoide en lugar de SS. Los anticuerpos antipéptido/ proteína anticitrulina están presentes con poca frecuencia en pacientes con SS que carecen de otras características de la artritis reumatoide, aunque estos pacientes tienden a tener más compromiso articular.

Se comercializa un panel de pruebas de anticuerpos para su uso en el diagnóstico de SS temprano que incluye pruebas de anticuerpos contra las proteínas del tejido parotídeo murino, incluida la proteína secretora de la parótida, la anhidrasa carbónica 6 y la proteína salival-1. Estos nuevos anticuerpos no se han validado como marcadores de SS temprano o establecido (Shen *et al.*, 2012). Además, los anticuerpos contra estas y otras proteínas homólogas de las glándulas salivales humanas no se detectaron en pacientes con SS cuando fueron buscados por un laboratorio independiente (Burbelo *et al.*, 2019). Se requieren más investigaciones para determinar la utilidad de tales pruebas en la práctica clínica habitual.

Los anticuerpos anti-SSA/ SSB se han usado en los criterios de clasificación para SS de varios autores (Vitali *et al.*, 2002; Shiboski *et al.*, 2012; Shiboski *et al.*, 2017). manteniéndose presentes en todas las versiones publicadas de los diferentes criterios diagnósticos de esta enfermedad de los últimos casi 20 años debido a su especificidad en la enfermedad

Así, Vitali *et al.*, en el 2002 definieron como criterios diagnósticos de la enfermedad los que podemos ver en la tabla adjunta. (Thorne *et al.*, 2017) (**Tabla 1**).

**Tabla 1.** Criterios diagnósticos del SS para el grupo de consenso americano-europeo

Para un diagnóstico definitivo es preciso presentar 4 de los 6 criterios que se muestran ó 3 de los 4 criterios principales* siempre que al menos 1 sea el criterio número 4 ó 6.
1. Síntomas oculares- al menos 1 de los siguientes síntomas: a. ¿Has tenido molestias oculares de sequedad diaria durante al menos 3 meses? b. ¿Has tenido sensación recurrente de arenilla o cuerpo extraño en tus ojos? c. ¿Usas lágrimas artificiales más de tres veces al día?
2. Síntomas orales- al menos 1 de los siguientes síntomas: a. ¿Has tenido sensación de bocas seca durante al menos 3 meses? b. ¿Has tenido inflamación glandular persistente o recurrente durante la edad adulta? c. ¿Necesitas beber líquidos frecuentemente para ayudar a mejorar la sensación de boca seca?
3. Signos oculares *- resultado positivo para al menos 1 de los siguientes test: a. Test de Schirmer sin anestésico ( $\leq$ a 5 mm en 5 minutos). b. Puntuación de rosa de bengala u otra puntuación de tinción ( $\geq$ a 4 de acuerdo con el sistema de puntuación de Van Bijstervald)
4. Histopatología *- en glándulas salivares menores (biopsia de una zona mucosa de apariencia normal) sialoadenitis linfocítica focal, evaluada por un histopatólogo experto con una puntuación $\geq$ 1 (definido como el número de focos linfocíticos con más de 50 linfocitos) adyacentes a zonas de acinos mucosos de apariencia normal por cada 4 mm <sup>2</sup> de tejido glandular.
5. Afectación de la glándula salival *- resultado positivo para al menos 1 de los siguientes test: a. Flujo salival sin estimular ( $\leq$ 1,5 ml en 15 minutos) b. Presencia de sialectasia difusa en la sialografía de parótida. c. Gammagrafía salivar que muestra captación retardada, reducción de la concentración y/o captación retardada en la excreción.
6. Autoanticuerpos *- presencia de autoanticuerpos séricos Ro (SSA) o La (SSB) o ambos.

Los criterios diagnósticos ACR-EULAR 2016 (**Tabla 2**) recientemente descritos fueron diseñados para combinar características de los criterios diagnósticos del Colegio Americano de Reumatología (ACR) en el año 2012 y características del Grupo de Consenso Americano-Europeo 2002 (AECG) para la detección temprana de SS, consiguiendo así unos criterios conjuntos y unificados.

Los criterios ACR-EULAR nos permiten establecer criterios que ayudan al diagnóstico en la práctica clínica a través de analíticas (anticuerpos Anti-Ro), y la objetivación de los síntomas como la sequedad ocular (test de Schirmer y tinción ocular) y oral (biopsia de glándula salivar menor labial y flujo salivar no estimulado), evitando pruebas más agresivas para el paciente como la sialografía o la gammagrafía de parótidas (Shiboski *et al.*, 2017; Franceschini *et al.*, 2017). A pesar de que no existe un consenso universal sobre los criterios diagnósticos para el SS, los más extendidos son los del

consenso Americano-Europeo de 2002, junto con los criterios ACR- EULAR 2016 (Rúa Figueroa *et al.*, 2014).

**Tabla 2.** Criterios de clasificación ACR-EULAR 2016 para el SS.

Criterio	Puntuación
Sialoadenitis linfocítica foical en glándula salival menor con $\geq 1$ foco linfocítico/ 4 mm <sup>2</sup> de tejido glandular.	3
Anti-SSA/ Ro positivo	3
Puntuación de tinción ocular $\geq 5$ (o $\geq 4$ según escala de Bjsterveld) en al menos un ojo.	1
Test de Schirmer $\leq 5$ mm/ 5 minutos, en al menos 1 ojo.	1
Flujo salival sin estimular $\leq 0,1$ ml/minuto	1

Diagnóstico  $\geq 4$  puntos

En aquellas ocasiones en los que los pacientes presentan los criterios diagnósticos descritos, el paciente es diagnosticado de SS, sabiendo, como ya hemos mencionado con anterioridad, que el SS es considerado SSP cuando sólo existe esta entidad en ausencia de otras enfermedades sistémicas, mientras que se considera SSS cuando coexisten alteraciones de este tipo con otras enfermedades sistémicas asociadas al SS. Es habitual la presencia de enfermedades como la artritis reumatoide, el LES entre otras, asociadas a SS, siendo en este momento cuando se considera que el SS es un SSS. Por lo tanto, el SSP y SSS comparten criterios diagnósticos siendo su única diferencia la asociación o no a otras enfermedades.

Es probable que con el paso de los años y el conocimiento de esta enfermedad sigan produciéndose cambios en los criterios diagnósticos que puedan cambiar las reglas actuales para el ser o no considerado paciente con SS.

Es de vital importancia en el adecuado diagnóstico del SS el establecimiento de un riguroso diagnóstico diferencial con entidades que comparten manifestaciones comunes. El diagnóstico diferencial del SS incluye enfermedades que provocan síntomas de sequedad y / o agrandamiento de las glándulas salivales o lagrimales. La mayoría de estas afecciones pueden excluirse según la historia y el examen físico, junto con la falta de evidencia de autoinmunidad sistémica. Las siguientes entidades pueden simular SS debido a su posible participación de las glándulas lagrimales y salivales:

- **Síndrome sicca relacionado con la edad:** la sequedad ocular y oral relacionada con la edad puede imitar las características del paciente típicamente más joven que desarrolla SS. La evidencia de enfermedad sistémica, los cambios histológicos habituales mediados por el sistema inmunitario que se observan en la SS, y los anticuerpos relacionados con el SS (anti-Ro/ SSA y anti-La/ SSB) generalmente están ausentes en pacientes con sequedad relacionada con la edad. La producción de lágrimas y saliva no estimulada disminuye con la edad (Percival *et al.*, 1994), muy probablemente como resultado de alteraciones histológicas relacionadas con la edad en las glándulas lagrimales y salivales, que incluyen atrofia acinar, fibrosis intersticial y dilatación ductal (Scott *et al.*, 1980). Aunque la aparición de SS es poco común después de los 65 años (Botsios *et al.*, 2011), se debe tener cuidado en la evaluación de pacientes adultos mayores con síntomas de sequedad, ya que las pruebas positivas para anticuerpos antinucleares (ANA) y factor reumatoide aumentan en prevalencia con la edad (Ramos-Casals *et al.*, 2003).

- **Enfermedad relacionada con inmunoglobulina G4 (IgG4):** la infiltración plasmocítica de IgG4 subyace a varias formas relacionadas de enfermedad de las glándulas lagrimales y salivales, incluido el pseudotumor inflamatorio orbitario, la sialadenitis esclerosante crónica (tumor de Küttner) y la "enfermedad de Mikulicz" (Cheuk *et al.*, 2010). Estas enfermedades relacionadas con IgG4 (IgG4-RD) se pueden distinguir del SS por sus características clínicas y de laboratorio asociadas y los distintos hallazgos histopatológicos observados en IgG4-RD. Es característico el agrandamiento o induración de las glándulas, a veces con disfunción grave. Los pacientes con estas formas de enfermedad plasmocítica de las glándulas salivales y lagrimales relacionadas con IgG4 pueden tener enfermedad sistémica (IgG4-RD), que se manifiesta por afectación contemporánea o pasada de otros órganos con un proceso patológico común marcado por infiltración plasmocítica de IgG4, fibrosis extensa y flebitis obliterante. La más común es la pancreatitis esclerosante; otros incluyen aortitis linfoplasmocítica, fibrosis retroperitoneal, colangitis esclerosante y pseudotumores inflamatorios de pulmón, mama o hígado. A menudo se presentan niveles elevados de IgG4 en suero y eosinofilia.

- **Sialoadenitis linfoepitelial benigna y dacrioadenitis:** se trata de una entidad patológica distinta en la que las glándulas lagrimales y / o salivales mayores muestran una



infiltración linfocítica extensa con atrofia acinar y la formación de numerosas lesiones linfoepiteliales. Estas últimas son islas de células epiteliales dentro del infiltrado linfoide que surgen de la invasión linfocítica del epitelio ductal, seguida de proliferación de las células epiteliales basales y desorganización de la estructura ductal. De hecho, es la histopatología característica de las glándulas lagrimales y salivales en el SS avanzado, descrita originalmente por Sjögren en 1933 (Sjögren *et al* 1933) y destacada en un estudio clásico de Morgan y Castleman en 1953 (Morgan *et al.*, 1953). Sin embargo, esta entidad patológica puede no estar restringida a pacientes con SS, y se presenta en forma idiopática hasta en el 50% de los casos notificados en series patológicas (Ma *et al.*, 2011]. Es un precursor del linfoma de tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) (posteriormente llamado linfoma de zona marginal extraganglionar de tejido linfoide asociado a mucosas) de la glándula salival (Hsi *et al.*, 1995) y es difícil de diferenciar del linfoma (Ellis *et al.*, 2007). Los pacientes que tienen esta lesión patológica definida durante el curso de una evaluación por el agrandamiento de las glándulas salivales deben ser estudiados por sospecha de SS y otras enfermedades autoinmunes.

- **Linfoma y otras neoplasias malignas hematológicas:** la infiltración maligna de las glándulas parótidas puede ocurrir en las formas de leucemia tanto en la niñez como en la edad adulta y típicamente se presenta con agrandamiento bilateral de las glándulas salivales y lagrimales. Los linfomas primarios de las glándulas parótidas suelen presentarse como tumores unilaterales, pero se observó afectación bilateral en el 2,3% de 2140 pacientes afectados en la base de datos de Vigilancia, Epidemiología y Resultados Finales del Instituto Nacional del Cáncer (Feinstein *et al.*, 2013). La transformación linfomatosa de la sialoadenitis linfoepitelial benigna en SS puede manifestarse como un nódulo solitario, que a veces surge en una glándula que se ha agrandado crónicamente, o puede manifestarse como un agrandamiento bilateral progresivo. El agrandamiento de las glándulas lagrimales en el SS debería suscitar preocupación por el posible linfoma.

- **Sarcoidosis:** en ocasiones, algunas características de la sarcoidosis pueden parecerse al SS, como el agrandamiento de la glándula parótida (4 a 6% de los pacientes con sarcoidosis) y lagrimal (7 a 16% de los pacientes con sarcoidosis) (Baugman *et al.*, 2001). El SS y la sarcoidosis también comparten manifestaciones extraglandulares, como artritis y nefritis intersticial (Ramos-Casals *et al.*, 2004). La sarcoidosis rara vez se presenta

como síndrome de Heerfordt con agrandamiento bilateral agudo de las glándulas parótida, submandibular y lagrimal y, en ocasiones, con fiebre. La sarcoidosis y el SS se pueden distinguir en la biopsia si no se pudiera establecer fácilmente la distinción con base en los hallazgos clínicos.

- **Hepatitis C:** el SS rara vez puede surgir en el contexto de una infección crónica por el virus de la hepatitis C. A pesar de las similitudes clínicas e inmunológicas (Ramos-Casals *et al.*, 2005), algunas características histológicas pueden diferir y los síntomas de sequedad pueden ser menos frecuentes (Carrozzo *et al.*, 2008). Los pacientes con SS con virus de hepatitis C difieren de los pacientes con SS no infectados, ya que tienen una edad más avanzada en el momento del diagnóstico, suelen tener una mayor prevalencia de varones, afectación hepática, crioglobulinemia, vasculitis cutánea, neuropatía periférica, factor reumatoide e hipocomplementemia, y una menor prevalencia de anticuerpos anti-Ro / SSA y anti-La / SSB (Ramos-Casals *et al.*, 2005). La infección por virus de hepatitis C debe buscarse en pacientes con SS, particularmente aquellos con hepatitis y crioglobulinemia, ya que los enfoques de tratamiento serán diferentes.

- **Infección por VIH:** el síndrome de linfocitosis difusa CD8 es una manifestación de la infección por VIH que puede simular el SS, cuya incidencia ha disminuido drásticamente con la llegada del tratamiento antirretroviral de gran actividad (Ghrenassia *et al.*, 2015). Los pacientes afectados desarrollan agrandamiento de la glándula parótida, síntomas de sequedad y neumonitis intersticial linfocítica. Las biopsias de glándulas salivales muestran un infiltrado linfocítico con predominio de CD8 (Kazi *et al.*, 1996).

- **Enfermedad de injerto contra huésped:** la mayoría de los pacientes con enfermedad de injerto contra huésped crónica que se desarrolla después de un trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas presentan síntomas de ojo seco y boca seca. En un estudio de los Institutos Nacionales de Salud, se documentó disfunción de la glándula lagrimal en el 82% e hipofunción de la glándula salival en el 27% de los pacientes. Las biopsias de glándulas salivales menores mostraron atrofia acinar prominente y fibrosis intersticial. Se observó inflamación periductal, pero la extensión de la infiltración linfocítica fue menor que en el SS, y los pacientes generalmente se pueden distinguir de aquellos con SS según el contexto clínico (Imanguli *et al.*, 2010)

- **Sicca inducida por la terapia con inhibidores de puntos de control inmunitarios:** la sequedad oral y / u ocular puede ocurrir de manera relativamente abrupta en el contexto de la terapia con inhibidores de puntos de control inmunitarios para la enfermedad neoplásica. En la mayoría de los pacientes, la sequedad bucal es la característica clínica dominante. Este síndrome surge con mayor frecuencia de novo, en ausencia de una enfermedad autoinmune preexistente reconocida, y carece de manifestaciones sistémicas. En una minoría, puede haber manifestaciones sistémicas concomitantes, como artritis, exantema y neumonitis intersticial (Warner *et al.*, 2019).

- **Vasculitis sistémica:** el agrandamiento bilateral de las glándulas parótidas y submandibulares es una manifestación rara de granulomatosis con poliangeítis (Liu *et al.*, 2003).

## 5. Incidencia-Prevalencia del síndrome de Sjögren

Las estimaciones de la incidencia y la prevalencia del SS varían ampliamente, según los criterios de clasificación específicos, el diseño del estudio y la población examinada. Solo una pequeña minoría (aproximadamente el 10 %) de los pacientes con ojo seco clínicamente significativo tienen SS.

La incidencia de SS alcanza su punto máximo alrededor de los 50 años de edad, con un sesgo sexual considerable, con una relación mujer-hombre de 9-14: 1, siendo este más fuerte que en casi todas las demás enfermedades autoinmunes (Qin *et al.*, 2015; Kyarnstrom *et al.*, 2015).

En un metanálisis de 2014 de estudios poblacionales, la incidencia general de SS se estimó en aproximadamente 7 por 100.000 personas-año (Qin *et al.*, 2015). Las tasas de incidencia más altas se informaron en estudios de Europa y Asia. La prevalencia en el metanálisis se estimó en 43 por 100.000 personas (0,043 por ciento) (Qin *et al.*, 2015). Las tasas de prevalencia informadas en otros estudios basados en la población han variado del 0,01 al 0,09 por ciento, en parte relacionadas con las diferencias en la determinación de casos (Maldini *et al.*, 2014).

En un estudio poblacional posterior del condado de Olmsted, Minnesota, que no se incluyó en el metanálisis anterior, la incidencia anual de SSP diagnosticado por un

médico fue de 5,8 por 100.000 personas-año, según una revisión de los registros médicos del período de 1976 a 2015 (Maciel *et al.*, 2017). La prevalencia fue de 10,3 por 10.000 habitantes.

La prevalencia del SSP según el metanálisis publicado en 2015 por Qin *et al.*, y su equipo fue del 0.06%. Se identificó SS, según los criterios del Grupo de Consenso Americano-Europeo (AECG), en el 11,6 % de 327 pacientes en una cohorte prospectiva con ojo seco clínicamente significativo por deficiencia acuosa que provenían de una variedad de prácticas de atención oftalmológica, incluidas 6,4 % y 5,2 % con SS primario y secundario, respectivamente (Liew *et al.*, 2012).

El SS tiene una distribución mundial y su fenotipo puede variar en función de la geolocalización y el origen étnico. En un análisis de 8.310 sujetos con SSP en un registro multicéntrico internacional, la proporción de mujeres a hombres fue más alta en pacientes asiáticos (27: 1) y más baja en pacientes negros o afroamericanos (7: 1) (donde el asiático se definió como "una persona que tiene orígenes en cualquiera de los pueblos originales del Lejano Oriente, el sudeste de Asia o el subcontinente indio"; y negro o afroamericano se definió como "una persona que tiene orígenes en cualquiera de los grupos raciales negros de África"); y los síntomas de sequedad tuvieron la prevalencia más baja en pacientes asiáticos. Los gradientes norte-sur en ciertos hallazgos fueron evidentes, con una afectación ocular menos frecuente en el norte de Europa y Asia y frecuencias más altas de ANA en los países del norte de América y el norte de Asia, pero frecuencias más bajas de ANA en el norte de Europa (Brito-Zerón *et al.*, 2017).

## **6. Patogenia y factores relacionados con síndrome de Sjögren**

### **6.1. Factores genéticos**

La susceptibilidad al SS tiene un componente genético, con asociaciones más fuertes para el locus antígeno leucocitario humano 1 (HLA I) (Lessard *et al.*, 2013). Las asociaciones de variantes genéticas en los loci IRF5 y STAT4 con SS también señalan la importancia de las vías de señalización de interferón (IFN) en la patogénesis de la enfermedad. Aunque faltan datos sobre las tasas de concordancia de SS en gemelos, las observaciones de otras enfermedades autoinmunes sistémicas generalmente indican

tasas de concordancia de alrededor del 12-15% en gemelos monocigóticos y del 3 al 8% en gemelos dicigóticos (Silman *et al.*, 1993; Aho *et al.*, 1986; Ulf-Moller *et al.*, 2018) lo que demuestra que otros factores además de la composición genética deben ser de gran importancia en el desarrollo de enfermedades autoinmunes. Estas observaciones dejan entrever que los factores del medio ambiente deben desempeñar un papel fundamental en la patogénesis de SS.

## 6.2. Factores ambientales

Varias circunstancias dificultan los estudios de factores de riesgo ambientales en SS. Siendo uno de ellos que los pacientes generalmente experimentan sus primeros síntomas clínicos de SS mucho antes de que se establezca el diagnóstico, y debido a los síntomas inespecíficos de sequedad, artralgia y fatiga, se ha publicado el retraso promedio en 6,2 años desde el inicio de los síntomas hasta el diagnóstico (Mofors *et al.*, 2019). Además, los autoanticuerpos asociados con la enfermedad se pueden encontrar varios años antes del diagnóstico, o incluso antes del momento del inicio de los síntomas (Jonsson *et al.*, 2013). Esto plantea la cuestión de si los mismos o diferentes factores ambientales están involucrados en las diferentes etapas del desarrollo de la enfermedad en esta condición inflamatoria crónica.

Se han reportado multitud de agentes externos que pueden desencadenar la enfermedad, entre ellos factores biológicos como la infección por determinados virus, bacterias, micobacterias, etc. Además, las bacterias comensales parecen tener implicación en la patogénesis del SS (Zaheer *et al.*, 2018). Según estos autores la falta de bacterias comensales acelera la aparición y la gravedad de la dacrioadenitis, así como genera un aumento de células T CD4 en algunos modelos animales. Esto sugiere que las bacterias comensales o sus metabolitos podrían tener propiedades inmunoregulatoras que protegen a las glándulas exocrinas en determinados modelos animales. La distribución geográfica, afectando de forma diferente a zonas norte y sur con un importante papel de la geolocalización pondera factores como el clima y la dieta (Brito-Zerón *et al.*, 2017).

### 6.3. Inflamación e inmunidad en el síndrome de Sjögren

En el SS como en cualquier enfermedad sistémica de tipo autoinmune existe la activación del sistema inmunitario que reaccionará frente a diferentes tejidos, ocasionando patología. Las enfermedades autoinmunes se caracterizan por un estado patológico en el que una respuesta inmunitaria aberrante dirigida a un componente corporal normal conduce a inflamación, lesión celular o una alteración funcional con manifestaciones clínicas (Davidson *et al.*, 2001). El constituyente molecular (es decir, proteína, carbohidrato, ácido nucleico) que se dirige en la autoinmunidad se denomina antígeno "propio" o autoantígeno; por el contrario, una molécula de un organismo infectante que estimula una respuesta inmunitaria se denomina antígeno extraño o "no propio". Una enfermedad autoinmune generalmente implica una respuesta de células T y B y puede ser generalizada o específica de tejido u órgano y puede ser aguda o crónica.

Si bien las enfermedades autoinmunes son un estado patológico, la autoinmunidad, no obstante, se deriva de los mismos mecanismos que subyacen a la respuesta inmune normal a los antígenos extraños. Las respuestas inmunes se pueden dividir en dos categorías amplias: innatas y adaptativas. La respuesta inmune innata es una respuesta rápida e inespecífica a un desafío, ya sea que surja de una infección, trauma o estrés. Por el contrario, una respuesta inmune adaptativa es lenta (días a semanas) e implica la producción de células B o T específicas de antígeno para superar un desafío extraño ( Bonilla *et al.*, 2010).

Las respuestas inmunes innatas y adaptativas (junto con las células responsables y los mediadores) se pueden separar para su análisis, una respuesta inmune adaptativa depende de la presencia de una respuesta inmune innata para promover la generación de una respuesta inmune específica. Es importante destacar que una respuesta inmune adaptativa puede ser persistente y mostrar memoria. En este marco, una enfermedad autoinmune resulta de una respuesta autoinmune adaptativa específica a un autoantígeno; esta respuesta es una violación de la función normal del sistema inmunológico en el que los mecanismos de tolerancia previenen las respuestas autoinmunes "hiperreactivas" a los autoantígenos ( Bonilla *et al.*, 2010).

Tanto la inmunidad innata (aquella que actúa como primera línea de defensa frente a agentes infecciosos) como la inmunidad adaptativa (aquella que entra en acción

cuando falla la inmunidad innata, elaborando una respuesta específica para cada agente infeccioso y con capacidad de guardar memoria) están implicadas en la patogénesis del SS.

La implicación de la inmunidad adaptativa en la patogénesis de SS es evidente, estando implicados los linfocitos B y T, con la producción de autoanticuerpos asociados a la enfermedad, anti-Ro/ SSA y anti-La/ SSB, la formación de estructuras linfoides ectópicas, así como con la hipergammaglobulinemia.

La contribución de la inmunidad innata se evidencia a través de las observaciones de la alta activación del sistema de interferón tipo I (IFN), sistémicamente y en tejido diana, en la mayoría de los pacientes con SS (Brkic *et al.*, 2013; Bodewes *et al.*, 2018; Gottenberg *et al.*, 2006).

Las interleuquinas (IL) o citoquinas son un conjunto de proteínas de bajo peso molecular, cuya función es actuar como mensajeras químicas a corta distancia en la comunicación intercelular. En un primer momento se pudo observar que eran sintetizadas por los leucocitos, aunque posteriormente se pudo ver que también eran sintetizadas por las células endoteliales. Las IL se pueden dividir en cuatro grandes grupos en función de sus características estructurales, siendo más de 50 las IL que el genoma humano codifica (Brocker *et al.*, 2010). Las IL sirven para iniciar la respuesta inflamatoria, y para definir la magnitud y naturaleza de la respuesta inmunitaria específica.

La función del sistema inmune viene determinada en gran medida por la acción de estas IL. La mayoría de las IL se sintetizan por los linfocitos TCD4 ayudantes o helpers (Th), así como también pueden ser sintetizadas por los monocitos, macrófagos y células endoteliales. Estas IL promueven el desarrollo y la diferenciación de los linfocitos T y B y de las células hematopoyéticas.

Se ha reportado que varias IL producidas por células inmunocompetentes, entre ellas el IFN  $\gamma$  e interleuquina 17 (IL-17) están aumentadas y autoreguladas por células T y B y activadas por IFN en la patogénesis inmunológica de las glándulas exocrinas en el SS (Youinou *et al.*, 2011). En particular, el IFN está involucrado tanto en la etapa temprana de la inmunidad innata, durante la cual el IFN de tipo I se eleva en el tejido glandular y en el suero (Peck *et al.*, 2017), como en la fase posterior de progresión de la enfermedad,

generado por linfocitos T y linfocitos B productores de IFN tipo I y tipo II (Schoenborn *et al.*, 2007), siendo estimulado por el factor de activación de células B (BAFF) en SS (Nocturne *et al.*, 2013). BAFF es una citoquina producida por monocitos y células dendríticas (DC) que es crucial para la proliferación, diferenciación y supervivencia de las células B (Yoshimoto *et al.*, 2011). El IFN $\gamma$  tiene funciones indispensables en la inmunidad innata y adaptativa. El IFN $\gamma$  es secretado principalmente a partir de células natural killer, células T y células B y actúa para mejorar la inflamación (Schoenborn *et al.*, 2007). Además, el IFN $\gamma$  estimula los macrófagos y las células dendríticas para atacar las bacterias y aumentar la expresión de moléculas MHC (complejo mayor de histocompatibilidad). El IFN $\gamma$  se ha reportado que es importante para la respuesta inmune en enfermedades autoinflamatorias y autoinmunes, incluida el SS. Se ha visto que podrían estar implicados la IL-12 junto con el IFN $\gamma$  en SS. Además, la IL-12 es un potente inductor de la polarización de las células Th1. Por tanto, IL-12 juega un papel principal en el aumento de los niveles de IFN de tipo II, como el IFN $\gamma$ , observado en SS (Nocturne *et al.*, 2013).

El transductor de señal y activador de la transcripción 4 (STAT4) es activado por una amplia gama de IL, incluyendo IFN tipo I, IL-12 e IL-23, que estimulan las células Th17 y contribuyen a la regulación de producción de citoquinas proinflamatorias

Se ha demostrado que los alelos de riesgo en el factor regulador de interferón 5 (IRF5) y STAT4 son aditivos en el desarrollo de SSP (Nordmark *et al.*, 2009).

Los patrones de expresión discretos de las firmas de IFN de tipo I y II pueden estar relacionados con distintas características clínicas de SS (Hall *et al.*, 2015). Un estudio reciente reveló que tanto el IFN tipo I como el tipo II estaban sobreexpresados en pacientes con SS frente a los controles con síndrome sicca, con IFN de tipo I predominantemente observado en sangre periférica y el IFN de tipo II predominantemente observado en los tejidos de la glándula salival menor. Estos autores comparan por tanto pacientes con ojo seco secundario al SS con pacientes con ojo seco por causa diferente al SS. De esta manera valoran si el IFN se asocia más al SS que a otras causas de ojo seco.

En el linfoma asociado a SS, en las glándulas salivales menores, se observaron niveles más bajos de IFN $\gamma$ , pero niveles más altos de IFN y transcripciones del gen



inducible por IFN tipo II (IFN $\beta$ ) en comparación con los controles SS y sicca. La ratio de ARNm IFN $\gamma$ / IFN $\alpha$  en tejidos de glándulas salivales menores demostró el mejor nivel de discriminación para el desarrollo de linfomas (Nordmark *et al.*, 2009).

La producción de BAFF depende en gran medida de los IFN de tipo I y II. Las células epiteliales de las glándulas salivales expresan y secretan BAFF después de la estimulación con IFN, incluidos IFN  $\gamma$  e IFN  $\alpha$ , lo que sugiere que las células epiteliales de las glándulas exocrinas son importantes en la patogenia de la SSP después de la estimulación por el sistema inmune innato (Bron *et al.*, 2017, Hall *et al.*, 2015).

En estudios en modelos animales, se ha reportado que el IFN $\gamma$  es importante en la glándula lagrimal y la superficie ocular afectadas por SS en varios modelos animales (Bron *et al.*, 2017). La activación de una respuesta innata por el IFN $\gamma$  que produce células asesinas naturales (del inglés células natural killer) (NK) no solo dañan la glándula lagrimal y la superficie ocular, si no que también facilitan la maduración de las células presentadoras de antígeno a través de IFN $\gamma$  (Coursey *et al.*, 2014). El IFN $\gamma$  generado por los linfocitos CD4 facilita el cambio de las células T vírgenes a una polarización T helper tipo 1. Vías y moléculas que están asociadas genéticamente con SS, incluyen a la vía del factor regulador de interferón 5 (IRF-5) y la vía de señalización de IFN, el factor nuclear kappa -potenciador de células B activadas (NF-KB), la vía de señalización de los linfocitos y la maquinaria de presentación de antígenos (Coursey *et al.*, 2014).

El modelo animal murino CD25KO imita una enfermedad autoinmune que se caracteriza por la infiltración espontánea de linfocitos y dacrioadenitis (Sharma *et al.*, 2006). Para ello, la IL-2 envía señales a través de su receptor heterodímero compuesto por tres cadenas individuales. CD25 se une a la IL-2 con alta afinidad y se considera su principal receptor. Los ratones que carecen de CD25 tienen un fenotipo similar al de los ratones que carecen de la propia IL-2. Como la IL-2 es responsable de la expansión y diferenciación de las células T reguladoras y también de la muerte celular inducida por activación, la autoinmunidad surge tanto en las cepas IL-2 - / - como en las CD25 - / -. El ratón CD25KO desarrolla una enfermedad inflamatoria multiorgánica espontánea, incluidas las glándulas exocrinas y el tracto gastrointestinal, y una anemia hemolítica profunda que conduce a una mortalidad temprana (Bian *et al.*, 2015). Se ha reportado

que en el modelo animal CD25KO el IFN $\gamma$  es fundamental para la destrucción de la glándula lagrimal y la disfunción secretora en el modelo CD25KO de SS (Bian *et al.*, 2015).

Recientemente se ha demostrado que los linfocitos T productores de IL-17 comprenden un linaje T helper (Th) conocido como células Th17, que son distintas de las células Th1 y Th2. Las células Th1 contribuyen a la defensa del huésped de infecciones bacterianas virales, fúngicas e intracelulares, y se caracterizan por la producción de IFN $\gamma$ . Se ha demostrado que las células Th17 están implicadas en la patogenia de muchas enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias, incluida la SS. (Bian *et al.*, 2015). Estos hallazgos sugieren que dirigirse tanto a IFN $\gamma$  como a IL-17 puede ser beneficioso para tratar la inflamación de la glándula lagrimal en SS.

Se ha evidenciado que en ratones CD25 / IFN $\gamma$  doble KO (gammaDKO) existe una disminución en la destrucción de la glándula lagrimal (Bian *et al.*, 2015). Estos informes implican la importancia del IFN $\gamma$  en la inmunidad innata y el inicio de esta enfermedad. (Sharma R *et al.*, 2006).

En modelos de ratón diabético no obeso (NOD) se ha podido evidenciar que la presencia en el epitelio de la glándula lagrimal cultivada y el epitelio de las células corneales, el IFN $\gamma$  reduce el componente de la secreción lagrimal, en la glándula lagrimal y estimula la expresión de MHC (presentación de antígeno mediada por clase II). Estos resultados sugieren que las elevaciones tempranas en los niveles de IFN $\gamma$  juegan un papel fundamental en las características específicas de la patología del ojo seco en SS (Meng *et al.*, 2017).

Una vez referidos los estudios en modelos animales, son muchos menos los estudios que se han realizado en humanos. Estos estudios sobre el SS humano han revelado una infiltración linfocitaria difusa de las áreas acinares de la glándula lagrimal y la conjuntiva. Las células B fueron el tipo de célula infiltrante predominante, pero se encontraron otras células, incluidas las células T CD4 + CD8 + activadas y las células T con HLA-DR y moléculas coestimuladoras, con células epiteliales glandulares y células infiltrantes del estroma en pacientes con SS, mientras que las células T característicamente dominantes se encontraron en las glándulas lagrimales de pacientes con EICH (enfermedad injerto contra huésped) (Ogawa *et al.*, 2003; Ogawa *et al.*, 2021).

Con frecuencia se observaron grupos de células plasmáticas en las áreas interlobulillares de la glándula lagrimal y el estroma conjuntival de pacientes con SS, lo que sugiere que la SS provocó la producción anormal de anticuerpos y el daño tisular en el microambiente local de la superficie ocular y la glándula lagrimal.

Los factores ambientales, incluidos los virus, activan las células epiteliales de la glándula exocrina y las células dendríticas, que producen citoquinas proinflamatorias como IL-17 e IFN $\gamma$ . Las células epiteliales glandulares producen citoquinas como el ligando de quimiocinas (motivo C-X-C) (CXCL) 9 y CXCL10 (Verstappen *et al.*, 2018).

Recientemente, se informó que la vacunación contra el H1N1 en pacientes con SS promueve la activación de células B policlonales y la producción de autoanticuerpos a través de IFN tipo I (Brauner *et al.*, 2017). Según la heterogeneidad de la presentación clínica y la patología en el SS, es probable que los patrones de expresión de IFN varíen entre individuos (Hall *et al.*, 2015) y que la forma sistémica de IFN tipo I y tipo II influyan en la gravedad de la enfermedad (Bodewes *et al.*, 2018).

El IFN $\gamma$ , un IFN de tipo II, está involucrado en las vías más frecuentes que se han identificado en los procesos patogénicos del SS humano (Hall *et al.*, 2015). Aunque aún no se ha aprobado una estrategia terapéutica basada en IFN, existe evidencia acumulada en humanos que la respalda (Jackson *et al.*, 2016).

Teniendo en cuenta la percepción mecanicista de que la señalización de IFN está involucrada en el ojo seco relacionado con SS en ratones y humanos, el desarrollo de intervenciones terapéuticas relacionadas con IFN podría ser indispensable para tratar el ojo seco relacionado con SS. El patrón de inflamación encontrado puede desempeñar un valor pronóstico en la severidad del SS en forma de cambio de epitelio con el desarrollo de metaplasia escamosa. La IL-1  $\beta$  y el IFN $\gamma$  tienen un papel principal en la formación de la metaplasia escamosa en el epitelio de la superficie ocular en respuesta a la inflamación crónica. Se ha demostrado que ambas citoquinas están presentes en la superficie ocular en el ojo seco. Se ha demostrado que la expresión de los genes relevantes precede al fenotipo escamoso (De Pavia *et al.*, 2007).

Se ha publicado que el IFN $\gamma$  promueve la pérdida de células caliciformes, la apoptosis epitelial y la queratinización del epitelio conjuntival en un modelo de ratón con

ojo seco (Zhang *et al.*, 2011) y es un contribuyente importante a la metaplasia escamosa en la enfermedad del ojo seco humano (Bian *et al.*, 2105).

El IFN $\gamma$  regula al alza la expresión en córnea de los precursores de los queratinocitos, (Takahashi *et al.*, 1999) células epiteliales corneales y células epiteliales conjuntivales de pacientes con SS (Kawasaki *et al.*, 2003, Hirai *et al.*, 2006). Durante el proceso de metaplasia escamosa, las células de infiltratina Th1 y las NK liberan IFN $\gamma$  en la superficie ocular (Jabs *et al.*, 2001).

## 7. Papel del microbioma y el síndrome de Sjögren

### 7.1. Composición de la microbiota intestinal

Algunas anomalías en el desarrollo del sistema inmune podrían deberse a defectos en la interacción de la microbiota con los compartimentos inmuno-competentes de la mucosa intestinal (Gaboriau-Routhiau *et al.*, 2016).

Trillones de células bacterianas habitan en varios nichos del cuerpo humano y, a lo largo de la evolución, los humanos y las bacterias evolucionaron conjuntamente para formar relaciones simbióticas aquella en la que ambos obtienen un beneficio. Entre otras contribuciones, las bacterias comensales protegen al huésped contra el crecimiento excesivo de patógenos (Kamada *et al.*, 2013), sintetizan ácidos grasos de cadena corta digeribles a partir de componentes dietéticos (Canfora *et al.*, 2015) y juegan un papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis inmune (Honda & Littman 2016).

Los estudios metagenómicos han establecido que a pesar de la extensa variabilidad interpersonal de las distintas especies que componen la microbiota intestinal, se mantiene una cierta estabilidad en los patrones metabólicos y los metabolitos de dicha microbiota en todos los individuos (Burke *et al.*, 2011; Turnbaugh *et al.*, 2009; Kostic *et al.*, 2015).

El microbioma está formado principalmente por tres grandes filos: *Firmicutes* (Gram-positivos), *Bacteroidetes* (Gram-negativos) y las *Actinobacterias* (Gram-positivos). Los *Firmicutes* son las predominantes (60%), incluyendo más de 200 géneros (los más importantes son los *Micoplasma*, *Bacillus* y *Clostridium*), y a la vez en cada género existen diferentes especies. Los *Bacteroidetes* y *Actinobacterias* suponen el 10% cada uno de la microbiota intestinal, estando el 20% restante constituido por más de 10 familias minoritarias. En total hay más 1000 especies diferentes de bacterias en nuestro intestino (Eckburg *et al.*, 2005). Los hongos y Archaea pueden ser también residentes, pero son menos del 1% de la población total.

El genoma bacteriano colectivo de la microbiota intestinal codifica una cifra estimada entre 2 y 4 millones de genes, superando al genoma humano en 140 veces (Hao

et al., 2004). Por tanto, la adquisición de la microbiota intestinal a partir de la microbiota de la madre puede considerarse como la herencia de un genoma paralelo.

Existen variaciones individuales en un nivel taxonómico más profundo, como las variaciones en las densidades de población y la diversidad de las especies bacterianas en todo el tubo digestivo. La cavidad oral presenta arquitecturas complejas al contrario que el resto del sistema gastrointestinal, que es principalmente tubular. La presencia de ácidos biliares en el duodeno o el pH ácido del estómago generan una presión de selección ambiental en los microorganismos locales. En la **Tabla 3** se resumen los géneros más abundantes (cuantificados en unidades formadoras de colonias, UFC) en cada uno de los tramos del tracto gastrointestinal.

**Tabla 3.-** Géneros bacterianos más abundantes en cada uno de los tramos del tracto gastrointestinal

Localización	Cuantificación	Géneros
Estómago	10 <sup>4</sup> UFC/gr contenido intestinal	<i>Helicobacter pylori</i> (Filo: Proteobacteria) <i>Lactobacillus</i> (Filo: Firmicutes) <i>Streptococcus</i> (Filo: Firmicutes)
Duodeno	10 <sup>3</sup> -10 <sup>4</sup> UFC/gr contenido intestinal	<i>Helicobacter pylori</i> (Filo: Proteobacteria) <i>Lactobacillus</i> (Filo: Firmicutes) <i>Streptococcus</i> (Filo: Firmicutes) <i>Staphylococcus</i> (Filo: Firmicutes)
Yeyuno	10 <sup>5</sup> -10 <sup>7</sup> UFC/gr contenido intestinal	<i>Helicobacter pylori</i> (Filo: Proteobacteria) <i>Lactobacillus</i> (Filo: Firmicutes) <i>Streptococcus</i> (Filo: Firmicutes) <i>Bacillus</i> (Filo: Firmicutes)
Ileon	10 <sup>7</sup> -10 <sup>8</sup> UFC/gr contenido intestinal	<i>Bacteroides</i> (Filo: Bacteroidetes) <i>Clostridium</i> (Filo: Firmicutes) <i>Enterobacteriaceae</i> (Filo: Proteobacteria) <i>Enterococcus</i> (Filo: Firmicutes) <i>Lactobacillus</i> (Filo: Firmicutes) <i>Veillonella</i> (Filo: Firmicutes)

Colon	10 <sup>10</sup> -10 <sup>11</sup> UFC/gr contenido intestinal	<i>Bacteroides</i> (Filo: Bacteroidetes) <i>Bacillus</i> (Filo: Firmicutes) <i>Bifidobacterium</i> (Filo: Actinobacteria) <i>Clostridium</i> (Filo: Firmicutes) <i>Enterococcus</i> (Filo: Firmicutes) <i>Eubacterium</i> (Filo: Firmicutes) <i>Fusobacterium</i> (Filo: Fusobacteria) <i>Peptostreptococcus</i> (Filo: Firmicutes) <i>Ruminococcus</i> (Filo: Firmicutes) <i>Streptococcus</i> (Filo: Firmicutes)
-------	---	---

### 7.1.1. Evaluación del microbioma

Las estrategias para estudiar las características y funciones de la microbiota intestinal se dividen en dos enfoques, uno basado en el cultivo y otro independiente del cultivo. Por una parte, el cultivo bacteriano permite una identificación de bajo coste, pero laboriosa, de especies bacterianas dentro del intestino, proporcionando análisis funcionales del microbioma. No obstante, aunque esta metodología ha mejorado significativamente en la última década al aumentar el número de bacterias cultivables del 30 al 70% del total de las comunidades intestinales, todavía ofrece una visión limitada de la diversidad microbiana (Zuo, 2019). Por otro lado, uno de los principales enfoques independientemente del cultivo para para la identificación taxonómica de bacterias es la secuenciación del ARN ribosómico 16S (ARNr) o de genomas completos de los microorganismos intestinales.

El empleo de uno u otro método es muy relativo a los objetivos de la investigación. El ARNr 16S está altamente conservado entre especies bacterianas, pero también contiene regiones variables que permiten señales filogenéticas para la clasificación taxonómica. Los nombres taxonómicos se asignan generalmente al hacer coincidir las secuencias de ADN con las bases de datos de referencia; tres de las bases de datos más caracterizadas y utilizadas son Greengenes (McDonald *et al.*, 2012), Ribosomal Database Project (RDP) (Cole *et al.*, 2014) y Silva (Pruesse *et al.*, 2007). El estudio del ARNr 16S es adecuado para el análisis de un gran número de muestras, aunque puede presentar una

resolución taxonómica y funcional algo limitada, ya que no se dirigen a todo el contenido genómico de una muestra (Jovel *et al.*, 2016). Por otro lado, la metagenómica de genoma completo ha aumentado la resolución, lo que permite perfilar la composición taxonómica y el potencial funcional de las comunidades microbianas, así como descubrir nuevos genes y genomas bacterianos. Sin embargo, este enfoque supone un mayor coste y requiere análisis bioinformáticos más complejos (Quince *et al.*, 2017) (**Tabla 4**).

Por otra parte, la contaminación durante la recogida de muestras, la conservación (ciclos de congelación-descongelación o tampones de almacenamiento) y el aislamiento de ácidos nucleicos, en los que los kits comerciales para el aislamiento de ADN y ARN tienen una eficacia diferente para lisar microbios específicos, están afectando sustancialmente la precisión de los datos metagenómicos (Fricker *et al.*, 2019).

Es importante destacar que los enfoques mencionados anteriormente solo describen la presencia de microorganismos o genes, pero no son capaces de describir los miembros activos de los inactivos de un microbioma dado. En este sentido, la secuenciación de ARN (RNASeq) proporciona genes y rutas dentro de un microbioma. Por el contrario, su diseño experimental es muy complejo y presenta limitaciones, y por lo general no es capaz de capturar todos los perfiles de metatranscriptoma debido a la alta diversidad y proporciones relativas de algunas comunidades microbianas, así como a la corta vida media del ARN (Shakya *et al.*, 2019) (**Tabla 4**).

Se pueden emplear otras metodologías directas, como la microscopía electrónica de barrido, para visualizar la organización microbiana en muestras fijas, pero esta no es la tecnología de elección para identificar taxones individuales en comunidades complejas (Earle *et al.*, 2015). Otro ejemplo es la hibridación in situ por fluorescencia (FISH) con sondas de oligonucleótidos dirigidas a ARNr para identificar, visualizar y cuantificar los miembros de la comunidad microbiana en muestras fijadas. Sin embargo, está limitado por el pequeño número de organismos filogenéticamente diferentes detectables simultáneamente (Lukumbuza *et al.*, 2019).



**Tabla 4.-** Enfoques genómicos para estudiar comunidades microbianas.

Métodos	Pros	Contras
Análisis del gen 16S (ARNr 16S)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Preparación y análisis de muestras rápidos y económicos.</li> <li>-Útil en muestras de baja biomasa y altamente contaminadas del hospedador.</li> <li>-Grandes conjuntos de datos públicos para comparar.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Sin discriminación viva / muerta o activa.</li> <li>- Puede existir sesgo de amplificación.</li> <li>-Sesgo introducido por la elección de cebadores y regiones variables.</li> <li>- Resolución limitada normalmente a nivel de género.</li> </ul>
Análisis del metagenoma completo	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Identificación microbiana taxonómica y filogenética hasta la resolución de cepas para organismos conocidos.</li> <li>-Abundancia relativa de genes funcionales de bacterias.</li> <li>-Sin sesgos relacionados con la PCR.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Análisis costosos y laboriosos.</li> <li>-Contaminación frecuente con el ADN proveniente del hospedador</li> <li>- Sin discriminación activa de vivo / muerto</li> <li>-Posibilidad de artefactos de ensamblaje en genomas microbianos.</li> </ul>
Análisis del metatranscriptoma	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Estimación de la transcripción activa de microorganismos cuando se combina con el análisis de genes marcadores.</li> <li>-Captura de la variación dinámica intraindividual y la respuesta a la intervención y la exposición al evento.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-La preparación de muestras es más cara, laboriosa y compleja.</li> <li>-Contaminación frecuente con el ARNm del hospedador y necesidad de eliminar el ARNr.</li> <li>-Recolección y almacenamiento de muestras muy cuidadoso.</li> <li>-Se necesita secuenciación de ADN bidireccional para separar la tasa de transcripción de los cambios en la abundancia bacteriana.</li> </ul>

También podrían emplearse tecnologías metabolómicas y metaproteómicas que utilizan espectrometría de masas (MS) y espectrometría de resonancia magnética nuclear (RMN). De igual forma, son enfoques interesantes para caracterizar los perfiles moleculares del microbioma humano. Se han utilizado para cuantificar proteínas y metabolitos como vitaminas, sales biliares, ácidos grasos y polifenoles producidos por el microbioma (Willis *et al.*, 2020).

En general, la estructura y las funciones del microbioma no se pueden caracterizar empleando una sola estrategia. Los análisis de metagenómica deben complementarse con datos de metatranscriptómica, metaproteómica y metabolómica, así como con información clínica y dietética completa para llevar a cabo estudios de investigación de microbiomas completos e informativos.

## **7.2. El microbioma y la autoinmunidad**

La disbiosis, considerada como un cambio de la microbiota que conduce a la disregulación de la homeostasis inmune y metabólica, de forma crónica, puede contribuir o predisponer a una amplia gama de enfermedades inflamatorias como alergia, asma, obesidad, trastornos metabólicos y trastornos autoinmunes. (West *et al.*, 2015).

Las enfermedades autoinmunes son enfermedades multifactoriales que implican predisposición genética, factores ambientales, influencias hormonales, así como un sistema inmunitario desordenado (Van der Meulen *et al.*, 2016).

Estudios enfocados en linajes bacterianos específicos han revelado que *Bacteroides fragilis*, miembro del filo *Bacteroidetes* (Serreze *et al.*, 2000), presenta la habilidad de reducir la inflamación intestinal, mientras que las bacterias segmentadas filamentosas son capaces de activar la producción de IL, generadas por los linfocitos para establecer comunicación entre las diferentes subpoblaciones de linfocitos, concretamente la IL-17 generada por los linfocitos T helper CD4+ (Th17), lo que estimula la respuesta autoinmune y la producción de IL inflamatorias (Geuking *et al.*, 2011; Kriegel *et al.*, 2011; Mazmanian *et al.*, 2008). Es interesante que la inducción Th17 es dependiente de la predisposición genética individual (Geuking *et al.*, 2011).

Existen hipótesis, como la “The old friends hypothesis”, que propone que el mantenimiento de una microbiota normal es promovido por unos niveles altos de linfocitos T reguladores, que secretan IL-10 y factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ), lo que disminuye la inflamación (Rook GA *et al.*, 2005; Geuking *et al.*, 2011). De hecho, proponen que esta respuesta simbiótica relaciona una variedad de linfocitos T reguladores con una compleja flora intestinal (simbióticos, comensales potencialmente patógenos y microorganismos patógenos). Todas estas respuestas juntas, son las responsables de mantener la autotolerancia, y sugieren un importante papel de las bacterias probióticas (bacterias que benefician al huésped) en el mantenimiento de una flora intestinal saludable (Vaarala *et al.*, 2008).

Varios estudios han destacado posibles vínculos mecanicistas entre el microbioma y la autoinmunidad (Yamamoto EA *et al.*, 2020; Li B *et al.*, 2018). Recientemente, ratones híbridos F1 predispuestos a la autoinmunidad (NZW x BXSB) y ratones C57BL/6 libres de gérmenes monocolonizados con *Enterococcus gallinarum* fueron usados para demostrar la translocación de este microbio al hígado y a otros tejidos sistémicos en los modelos de ratones, lo que resultó en la promoción de la autoinmunidad (Manfredo *et al.*, 2018)

Además, en otro estudio se detectó ADN específico de *E. gallinarum* en biopsias hepáticas de tres pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) pero no en controles sanos, lo que respalda aún más su relevancia. Un estudio probó la hipótesis de que los linfocitos T reactivos a Ro60 (proteína recombinante de 60 kilodaltons) también pueden activarse mediante péptidos de la microbiota comensal utilizando hibridomas de células T de ratones transgénicos HLA-DR3 que reconocen tres regiones del autoantígeno Ro60 relacionado con SS (Szymula *et al.*, 2014).

Otro estudio descubrió que las bacterias comunes de la piel, la cavidad oral y el intestino portan ortólogos (aquellos genes o proteína que tienen la misma identidad en distintas especies) de Ro60 (proteína frente a la cual se generan los autoanticuerpos en el SS), contra los cuales los anticuerpos podrían reaccionar de forma cruzada con Ro60 humano y, por lo tanto, pueden iniciar y mantener la autoinmunidad (Greiling *et al.*, 2018).

Además, un estudio sobre la transferencia de contenido fecal entre diabéticos no obesos (DNO) masculinos y femeninos mostró que el microbioma intestinal influye en las

diferencias a la susceptibilidad específica autoinmune intersexos al inducir protección dependiente de testosterona (Markle *et al.*, 2013). Por lo tanto, una creciente evidencia sugiere que las bacterias comensales pueden estar involucradas como desencadenantes de la autoinmunidad.

Es más, las bacterias del microbioma se ponen en contacto con el sistema inmunitario de la mucosa intestinal y, tras varias interacciones, pueden conducir a una disbiosis con inflamación local e interrupción de la barrera intestinal. Como consecuencia encontraremos citoquinas proinflamatorias en la circulación sistémica, aumento de la inflamación y una mayor exposición a antígenos con el aumento de la producción de autoanticuerpos. Otros autores han sugerido que los linfocitos T y B en la mucosa interfieren y promueven significativamente la homeostasis inmune trabajando en dos campos diferentes, aprovechando la respuesta inmune contra los microbios beneficiosos y manteniendo la integridad de la barrera intestinal (Honda *et al.*, 2016).

Algunas bacterias presentan habilidades únicas para un efecto concreto, fomentando la activación y polarización de ciertos subconjuntos de linfocitos. Por ejemplo, experimentos en ratones revelaron que las células T helper 17 (Ferro *et al.*, 2017) se ven favorecidas por las bacterias filamentosas en el intestino delgado, que podría terminar favoreciendo la enfermedad autoinmune (Ivanov *et al.*, 2009, Wu *et al.*, 2010).

Pero la funcionalidad de las células Th 17 podría presentar los dos lados de la misma moneda, ya que pueden actuar previniendo la infección o ser patógenas al secretar citoquinas proinflamatorias (Christina *et al.*, 2018). Actualmente, no está claramente entendido el mecanismo exacto que rige este procedimiento de diferenciación.

Otra subpoblación de linfocitos importantes son los linfocitos T reguladores (Treg). Los Tregs tienen una contribución esencial en la tolerancia inmune a los antígenos de origen dietético y los microbios intestinales. Los estudios sobre la importancia de la influencia de la microbiota intestinal en la inducción de Tregs todavía está en fases incipientes. Por ejemplo, es conocido que las especies de *Clostridium* inducen Tregs en el intestino con un rendimiento antiinflamatorio (Atarashi *et al.*, 2011, Atarashi *et al.*, 2013).

Por lo tanto, la microbiota comensal o patógena podría funcionar potencialmente como desencadenante ambiental del SS, pero su papel en la enfermedad apenas comienza a entenderse. En el SS, la inflamación autoinmune altera la función de barrera mucocutánea y podría contribuir a favorecer la disbiosis y la colonización con especies patógenas en la boca y el tracto gastrointestinal, pulmones, ojos y vagina. Por lo tanto, es importante tener en cuenta que las observaciones de disbiosis en casos de SS no necesariamente significan que estas condiciones existieran antes del inicio de la enfermedad y confieran un mayor riesgo de enfermedad.

### 7.3. El microbioma y el síndrome de Sjögren

Hasta ahora, algunos estudios han explorado el microbioma intestinal en pacientes con SS. Un estudio comparó pacientes con SS (n = 39) y LES (n = 30) con los controles sanos (n = 965) encontrando que la microbiota fecal en ambas cohortes de pacientes se caracterizaba por una menor riqueza bacteriana y una menor proporción de Firmicutes/ Bacteroidetes en comparación con los controles sanos (Van der Meulen *et al.*, 2019).

En otro estudio, se analizaron muestras de heces de 42 pacientes con SS y 35 controles sanos pareados por edad y sexo (Mandl *et al.*, 2017), encontrando que la disbiosis severa fue significativamente más prevalente en pacientes con SS que en los controles sanos (21% vs. 3%), y los pacientes con disbiosis severa tuvieron puntajes en el índice EULAR de actividad de la enfermedad del SS (ESSDAI) más altos, menor complemento C4 y niveles más altos de calprotectina fecal. ESSDAI es un índice de actividad de la enfermedad sistémica que fue diseñado para medir la actividad de la enfermedad en pacientes con SSP. El ESSDAI ahora se usa como “gold estándar” para medir la enfermedad en estudios clínicos.

De Pavia *et al.*, (2016), no encontraron diferencias en el microbioma conjuntival de pacientes con SS en comparación con controles sanos, pero sí diferencias significativas en la composición de su microbioma oral y fecal. Además, el índice combinado de severidad de SS sistémico y ocular se asoció inversamente con la diversidad microbiana fecal. Estos estudios indican que un estado de disbiosis intestinal puede estar relacionado con una mayor actividad de la enfermedad en pacientes con SS.

Otros autores han analizado el microbioma oral en pacientes con SS. Ya en 2003, Almstahl *et al.*, observaron en la saliva de pacientes con SS un aumento de las especies de *Candida* y *Streptococcus mutans* y un descenso de *Fusobacterium nucleatum* en comparación con pacientes sanos. Del mismo modo, De Paiva *et al.*, (2016) encontraron niveles altos de *Lactobacillus spp.* en muestras de placa supragingival, así como un aumento de *Staphylococcus aureus* junto con *Candida albicans* en mucosa oral y lengua, y una disminución de *Leptotrichia* y *Fusobacterium* en pacientes con SS.

Recientemente, Van der Meulen *et al.*, (2018) investigaron el microbioma de la mucosa bucal en pacientes con SS (n = 37), pacientes con queratoconjuntivitis sicca no SS (n = 86) y controles sanos (n = 24). Mientras que 19 taxones se asociaron con SS en comparación con los controles sanos, el análisis del microbioma no pudo distinguir a los pacientes con SS de los controles con queratoconjuntivitis sicca, que se caracterizaron por una relación *Firmicutes/ Proteobacteria* más alta. Se han observado datos comparables en un estudio de pacientes chinos con SS (Li *et al.*, 2016), donde los autores encontraron que el estado de la enfermedad y la tasa de secreción salival explicaban la variación en la composición bacteriana (Van der Meulen *et al.*, 2018).

Del mismo modo, en un estudio empleando lavados orales, el mismo grupo informó que la tasa de secreción salival tenía una influencia más fuerte en el microbioma que el estado de la enfermedad (Van der Meulen *et al.*, 2018 bis), lo que también fue confirmado en un tercer estudio (Van der Meulen *et al.*, 2019).

Otro pequeño estudio no pudo identificar diferencias significativas en el microbioma vaginal de pacientes premenopáusicas con SS (n = 9) con sequedad vaginal en comparación con los controles sanos (n = 8) (Van der Meulen *et al.*, 2019 bis)

En general, los estudios de la microbiota en pacientes con SS se han centrado principalmente en el microbioma intestinal y oral. Aunque la mayoría de los estudios informan estados de disbiosis en pacientes con SS, los resultados no son concluyentes. Por ejemplo, mientras varios estudios informaron una abundancia relativa menor de estreptococos orales (De Pavia *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016, Siddiqui *et al.*, 2016), otro estudio indicó que su abundancia fue mayor (Van der Meulen *et al.*, 2018 bis). Algunos investigadores han revelado el agotamiento de *Faecalibacterium*, *Bacteroides*, *Parabacteroides* y *Prevotella* y el aumento de los géneros *Escherichia*, *Shigella* y

*Streptococcus* (De Pavia *et al.*, 2016)

La mayoría de los estudios han incluido pocos pacientes con SS que pueden no representar con precisión a toda la población de SS. Además, cabe esperar diferencias regionales y étnicas en la composición del microbioma.

Se ha propuesto repetidamente un vínculo entre las infecciones y el SS, y se ha sugerido que tanto los virus como las bacterias son posibles desencadenantes del desarrollo del SS (Chao *et al.*, 2017) sin embargo, cabe destacar que un estudio epidemiológico reciente no pudo verificar ninguna conexión significativa entre un historial de infecciones gastrointestinales y un mayor riesgo de SS (Mofors *et al.*, 2019).

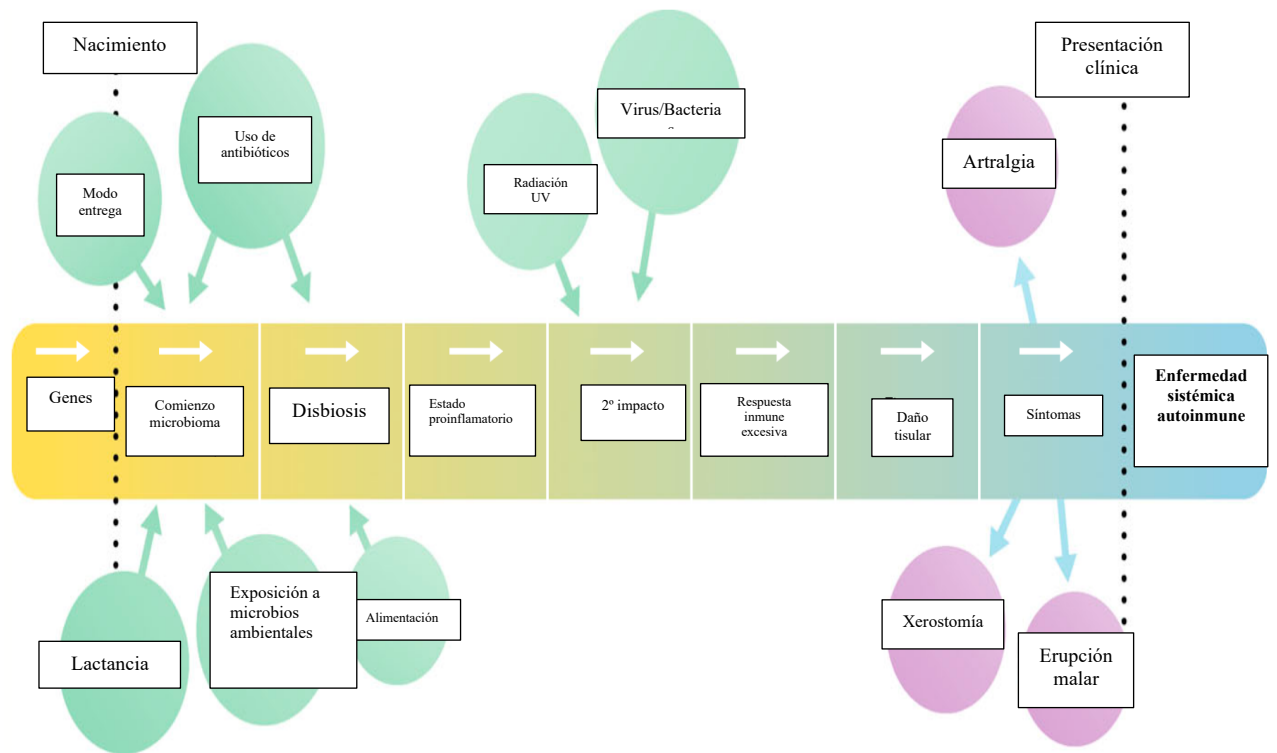
No está claro si las alteraciones reportadas de la microbiota constituyen un factor de riesgo para SS o más bien reflejan eventos posteriores a las alteraciones de nicho que siguen al desarrollo de SS.

Estudios empleando ratones con predisposición genética a la dacrioadenitis han comprobado que la microbiota intestinal puede cambiar el curso de la enfermedad. Así los ratones libres de gérmenes tuvieron una mayor alteración de la barrera corneal, menor densidad de células caliciformes y un inicio más temprano de dacrioadenitis que los ratones convencionales (Zaheer *et al.*, 2018), por lo que parece que las bacterias intestinales podrían ser un factor protector de la inflamación de la glándula lagrimal. Es por ese motivo por el que se han realizado trasplante fecal desde ratones normales a ratones libres de gérmenes observándose la reducción de células T CD4 hasta niveles basales (Zaheer *et al.*, 2018). Esta teoría de que el cambio en la microbiota intestinal puede ser causa de cambios en la evolución de patología inflamatoria (y entre ellas el SS) ha sido ratificada con el hecho de que el aporte oral del probiótico *Lactobacillus reuteri* DSM17938 a ratones mutados sin capacidad para la expresión de células reguladoras hizo que aumentara su supervivencia desde los 25 días en los ratones no suplementados hasta los 120 días en los ratones con aporte de *Lactobacillus*. Además, ese aumento de la supervivencia fue asociado a la disminución de los células Th1 así como a una disminución de la autoinmudidad sistémica en hígado y pulmón. (Zaheer *et al.*, 2018).

Es importante tener en cuenta que pacientes con SS presentan en un porcentaje elevado otras patologías autoinmunes por lo que realmente puede haber ciertos factores

de confusión en algunos estudios.

Es probable que la suma de factores genéticos, sumados a los factores ambientales y entre ellos la disbiosis generen esa cascada de acontecimientos que llevan a los pacientes a presentar una enfermedad de tipo autoinmune, entre ellas el SS (Figura 5).



**Figura 5.** El desarrollo de enfermedades autoinmunes sistémicas en el tiempo (Van der Meulen *et al.*, 2016).

Parece según lo expuesto que podría existir una unión entre la alteración en el microbioma y el SS. Además, sabemos que en el SS existe un proceso de disregulación inmune, motivo por el que es considerada una enfermedad de tipo autoinmune y por lo tanto el mimetismo molecular (como posible mecanismo para la autoinmunidad) podría explicar la conexión microbioma-SS (Szymula *et al.*, 2014), así como una respuesta inmune disregulada que combatiera el microbioma normal podría considerarse como una vía potencial en la patogénesis de SS y la perpetuación de la enfermedad. Aunque realmente sólo algunos datos son los que sugieren esta hipótesis en la actualidad.

En general, se acepta el papel fisiopatológico de los linfocitos B autorreactivos y los linfocitos Th17 en SS y la implicación directa o indirecta del microbioma humano.



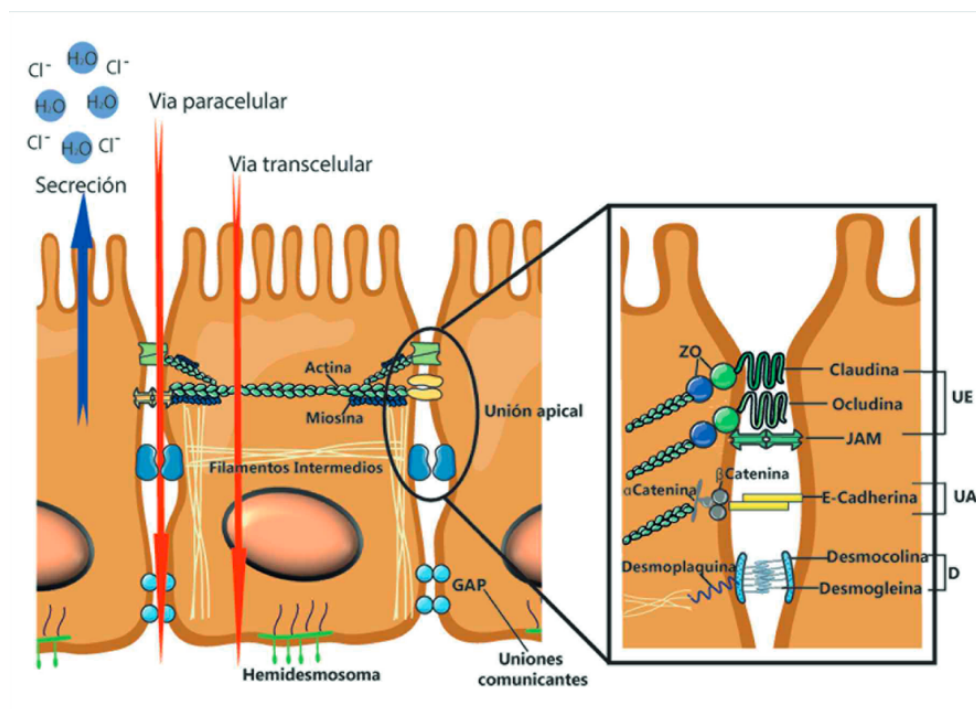
Las células Th17 están presentes en las glándulas salivales de pacientes con SS y también en sangre periférica. Por lo tanto, podría ser una hipótesis sólida que el aumento de esta población a consecuencia de la disbiosis, conduzca a la circulación de ellas llegando a las glándulas exocrinas. Desafortunadamente, todavía no está claro si el origen de las Th17 es la lámina propia del intestino y si la inmunidad intestinal desencadena procedimientos autoinmunes en sitios distales (es decir, glándulas salivales) (Van der Meulen *et al.*, 2016).

En definitiva, diversos estudios sobre SS han presentado evidencia en el cambio del microbioma oral, de la piel y del intestino (Szymula *et al.*, 2014, Lu *et al.*, 2014) pero no una conexión directa que nos lleve a la hipótesis de si el microbioma realmente juega un papel tan importante que pueda llevarnos a formas novedosas de tratamiento, como las intervenciones dietéticas, que podrían teóricamente ofrecer una alternativa a las terapias inmunosupresoras tradicionales.

## 8. Papel de la barrera intestinal en el síndrome de Sjögren

### 8.1. Función de la barrera intestinal.

Los enterocitos son las células más abundantes del epitelio intestinal. Principalmente, se encargan de la absorción de nutrientes y la secreción de agua y cloro al lumen intestinal. Las sustancias que se encuentran en la luz intestinal pueden atravesar el epitelio a través de la ruta transcelular, o entre las células a través de la ruta paracelular (Figura 6).



**Figura 6.** Rutas para y transcelular en la barrera intestinal. Complejos de unión intercelulares. (Salvo- Romero *et al.*, 2015)

El flujo pasivo de solutos a través de la barrera intestinal se produce principalmente a través de la ruta paracelular, dependiendo de la regulación de la unión estrecha intercelular. Ésta presenta resistencia eléctrica de los tejidos epiteliales, que depende del número y la complejidad de los filamentos de proteínas transmembranas dentro de la unión estrecha. En la actualidad se sabe que las uniones estrechas, consideradas hasta el momento como estructuras estáticas, son en realidad dinámicas y se adaptan fácilmente a diversas circunstancias de desarrollo, fisiológicas y patológicas.

Los complejos de unión intercelulares, compuestos por uniones estrechas, uniones adherentes, uniones comunicantes y desmosomas, son estructuras dinámicas

que restringen el paso de macromoléculas de más de 50 armstrong. La integridad y la estructura de la célula epitelial es modulada en gran parte por el citoesqueleto, formado principalmente por actina, miosina y filamentos intermedios. Las células se adhieren a la membrana basal a través de los hemidesmosomas. Las uniones estrechas se componen principalmente de claudinas, ocludinas y proteínas JAM (moléculas de adhesión funcional), las cuales se asocian a las zónulas ocludens que conectan con el citoesqueleto. Las uniones adherentes se componen de caderinas, como la E-caderina, la cual se une a las cateninas ( $\alpha$  y  $\beta$  cateninas) que conectan con el citoesqueleto. Los desmosomas están compuestos principalmente por desmocolina y desmogleína, las cuales interaccionan con la desmoplaquina que está conectada a los filamentos intermedios (Salvo- Romero *et al.*, 2015). Se ha propuesto que la alteración de la microbiota (disbiosis) lleva a una permeabilidad intestinal aumentada debido a la disminución de expresión de proteínas de unión estrecha. Esto se acompaña de la absorción de antígenos de la dieta o de patógenos, que desencadenan inflamación y una hiper respuesta inmune de la mucosa (Neu *et al.*, 2010; Vaarala *et al.*, 2008). Se ha visto, que dietas ricas en grasas modifican la microbiota intestinal y por tanto la permeabilidad intestinal. Esta dieta aumenta la oxidación de ácidos grasos en el hígado y tejido adiposo, y la evidencia disponible sugiere que las especies reactivas de oxígeno (ERO) generadas, reducen la producción de moco en el epitelio intestinal. Uno de los efectos más precoces de estas ERO es la disrupción de las uniones estrechas de las células epiteliales del intestino (Schulzke *et al.*, 2009). Así, la integridad debilitada de la barrera intestinal permite la traslocación intestinal de bacterias (Brownlee *et al.*, 2007). Además, la producción de malondialdehído, como resultado de la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados, induce daño a las membranas celulares epiteliales, aumentando la permeabilidad de las uniones estrechas (Hall *et al.*, 2001; Muccioli *et al.*, 2010).

En modelos murinos, se ha estudiado cómo se modifica la pared intestinal al modificar la microbiota. Los ratones “libres de gérmenes” tienen vellosidades intestinales más largas y finas, lo que aumenta la superficie y puede facilitar la absorción de nutrientes desde el intestino. Además, estos ratones tienen aumentada la expresión de genes que codifican transportadores en el intestino (Bäckhed *et al.*, 2011). Sin embargo, estas estructuras son más vulnerables a las infecciones. Tras colonizarlos con microbiota

intestinal normal, la composición celular cambia completamente y las vellosidades se acortan y ensanchan y aumenta la expresión de moléculas que son esenciales para mantener la función de barrera (Hooper *et al.*, 2001). Aún más, la colonización del intestino promueve el reclutamiento de células inmunes en el intestino delgado y la formación del tejido linfoide asociado a intestino (TLAI) (Mazmanian *et al.*, 2005). Algunos estudios han demostrado que los sistemas inmune innato y adaptativo se complementan para mantener el mutualismo entre huésped y microbiota (Slack *et al.*, 2009).

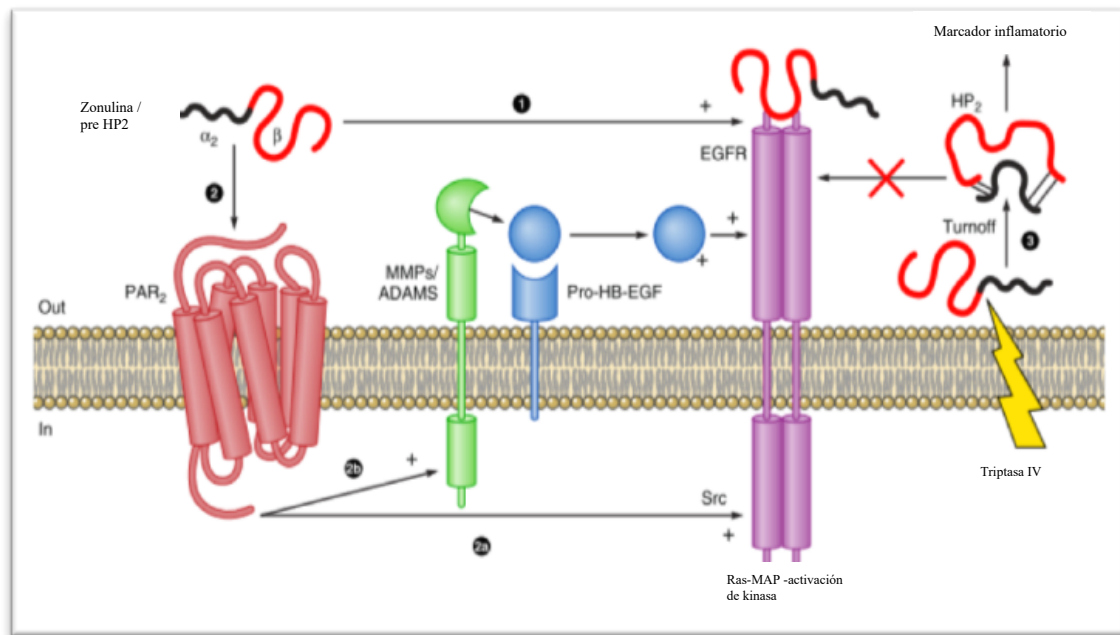
La toxina zonulina ocludens (Zot) es una enterotoxina producida por el *Vibrio cholerae*, que en su extremo COOH-terminal se une a una proteasa específica activadora del receptor celular unido a una porción intracelular y la activa, por lo que se produce la apertura reversible de las uniones estrechas intercelulares. La activación de Zot está mediada, a su vez, por una cascada de eventos intracelulares que, mediante la polimerización de la protein-quinasa C separa la red de microfilamentos de actina (Singh *et al.*, 2009). Parece que las zonas de unión a Zot están presentes en yeyuno e íleon pero no en colon y disminuye en las criptas de las vellosidades intestinales.

La investigación básica ayudó a identificar un homólogo en el intestino de humanos fallecidos, al que llamaron Zonulina (Fasano A *et al.*, 2011).

El descubrimiento de la zonulina, una proteína de 4kDa precursora de haptoglobina 2 (Pre-HP2) que modula reversiblemente la permeabilidad de las uniones estrechas, nos da información de cómo es regulada la función de la barrera intestinal en la salud y la enfermedad (Wang *et al.*, 2000). El descubrimiento de esta molécula aumentó la comprensión de los intrincados mecanismos que regulan la vía paracelular epitelial intestinal y nos llevó a apreciar que su regulación positiva en individuos genéticamente susceptibles conduce a enfermedades autoinmunes.

La zonulina fue identificada (Fasano *et al.*, 2011) como una proteína capaz de aumentar la permeabilidad intestinal en primates, ya que disminuye la resistencia eléctrica transepitelial en yeyuno (35.3%) e íleon (25.6%), pero no en colon. La secuencia de aminoácidos NH<sub>2</sub> terminal de la zonulina muestra grandes similitudes con las inmunoglobulinas. Se sabe que la zonulina participa en el sistema inmune intestinal (**Figura**

7) y está elevada en numerosas enfermedades autoinmunes, en las cuales la disfunción de las uniones estrechas parece ser el defecto inicial (Sapone *et al.*, 2006).



**Figura 7.** Mecanismos propuestos por los que la zonulina activa EGFR (receptor del factor del crecimiento epidérmico). A través de la unión directa (1) o a través de la activación de PAR2 (receptor de proteína G) (2), mediado por señal Src (2a) o por liberación de MMPs (metaloproteinasas) y/o ADAMS (desintegrina y metaloproteína) (2b) que activarán Pro-HB-EGF (proteasas y factor de crecimiento epidérmico que se une a la heparina).

El procesamiento de la zonulina en su forma madura de dos cadenas produce cambios conformacionales que le impiden unirse a EGFR (3), pudiendo convertirse en un marcador de inflamación (Fasano *et al.*, 2011).

Otras moléculas implicadas en la permeabilidad intestinal son la  $\beta$ -catenina, cuya fosforilación es inducida por probióticos, ya que pueden fortalecer el complejo E-cadherina/ $\beta$ -catenina, sustentando el mantenimiento de las uniones de adhesión por el lugar de unión de la E-cadherina al citoesqueleto (Gooding *et al.*, 2004). Así también el butirato, un ácido graso de cadena corta producido por algunas bacterias presentes en la luz intestinal, mejoran la organización de las uniones estrechas (Lewis *et al.*, 2010) y estimulan la síntesis de mucina, una glicoproteína que mantiene la integridad del epitelio intestinal (Paassen *et al.*, 2009). Este hecho reduce la traslocación bacteriana y disminuye la permeabilidad intestinal.

## 8.2. Inmunología de la mucosa intestinal

El epitelio intestinal es la superficie mucosa más extensa del cuerpo humano y proporciona una amplia superficie de interfase entre el medio externo y el hospedador. La pared intestinal está constituida por cuatro capas: serosa, muscularis externa, submucosa y mucosa (Figura 8).

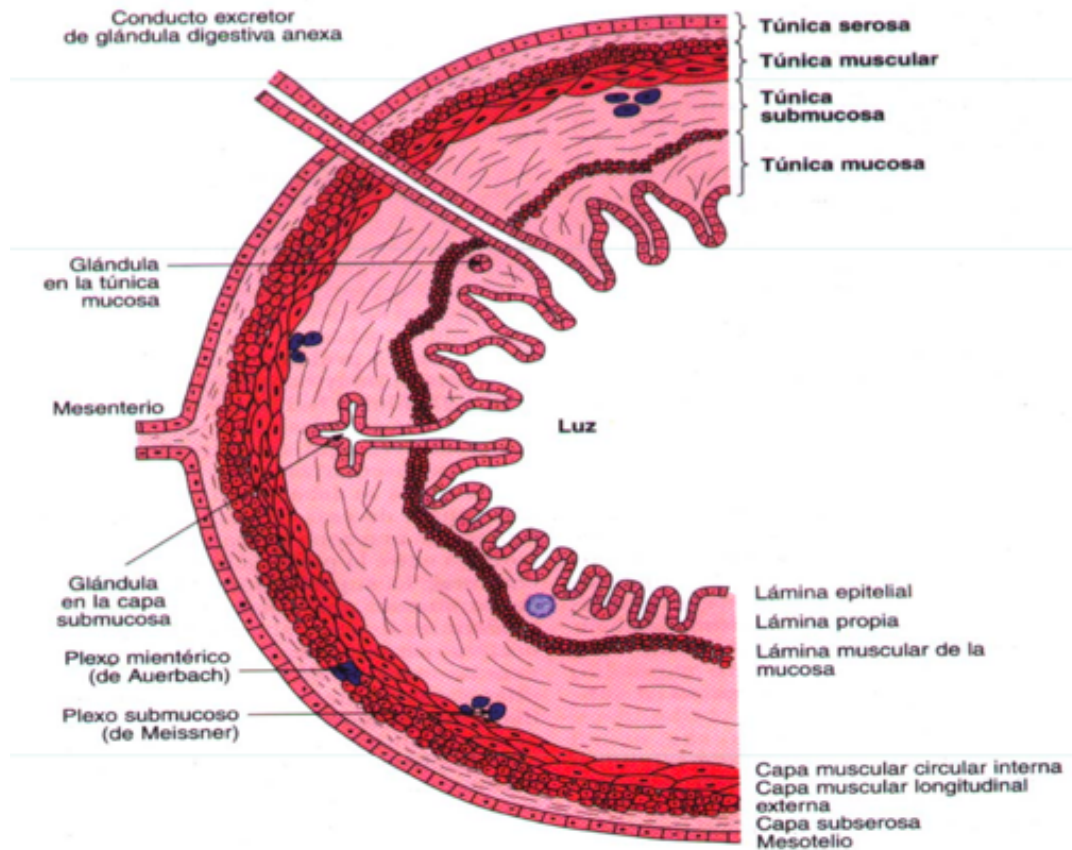


Figura 8. Pared intestinal (Pawlina *et al.*, 2020).

La interacción de la capa de moco, de linfocitos productores de IgA, péptidos antimicrobianos y un complejo sistema de barrera epitelial formado por uniones estrechas y de adhesión (Ohland & Macnaughton 2010) hace que sea la primera línea de defensa frente a antígenos y asegura interacciones específicas entre los antígenos luminales y el huésped, modificando constantemente los mecanismos locales y sistémicos de inmunidad (Fagarasan *et al.*, 2002).

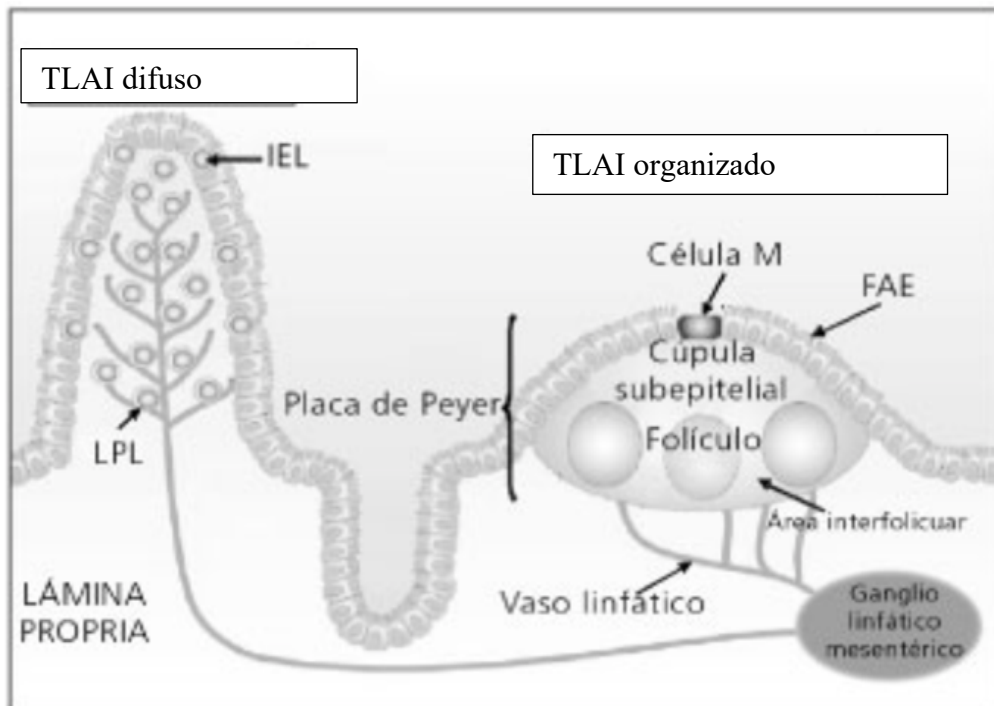
Se considera tejido linfático o linfoide a una forma especial de organización del tejido conjuntivo, constituido por tejido conjuntivo reticular como integrante del estroma y un conjunto de células en el que la mayor parte de sus componentes celulares funcionales son los linfocitos. Por lo tanto, cualquiera que sea la estructura u órgano

linfático que exista en nuestro organismo, el tejido linfático está constituido por tres componentes:

- Un componente fibrilar integrado por *fibras reticulares* (colágena tipo III) que se disponen en la forma de una red tridimensional.
- Un tipo especial de fibroblastos denominados, *células reticulares*, situadas en los puntos de intersección de las fibras que ellas mismos elaboran.
- En este entramado fibrocelular se disponen *células linfáticas* de diversa estirpe que ocupan los espacios de esa red tridimensional. También células plasmáticas y macrófagos libres.

El tejido linfoide asociado al intestino (TLAI) forma parte del tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) el cual es considerado un conjunto de células linfoides sin organización ni estructura estando asociados a la mucosa de las diferentes partes del cuerpo animal. Así existe MALT asociado a la zona bronquial, al intestino (TLAI), a la mucosa nasal o a asociado a la conjuntiva. El TLAI está formado por varias células especializadas que desempeñan funciones clave en la defensa del hospedador (Nagler-Anderson *et al.*, 2001). Uno de los papeles fundamentales del TLAI es la distinción entre microorganismos comensales y patógenos (Lanning *et al.*, 2005). El tránsito paracelular de macromoléculas está controlado por TLAI, el cual actúa como un sistema de contención evitando que antígenos intestinales potencialmente nocivos accedan a la circulación sistémica, a través de un proceso mediado por IgA polimérica y linfocitos T reguladores. Los microorganismos comensales son cruciales para la maduración y el funcionamiento del sistema inmune de la mucosa.

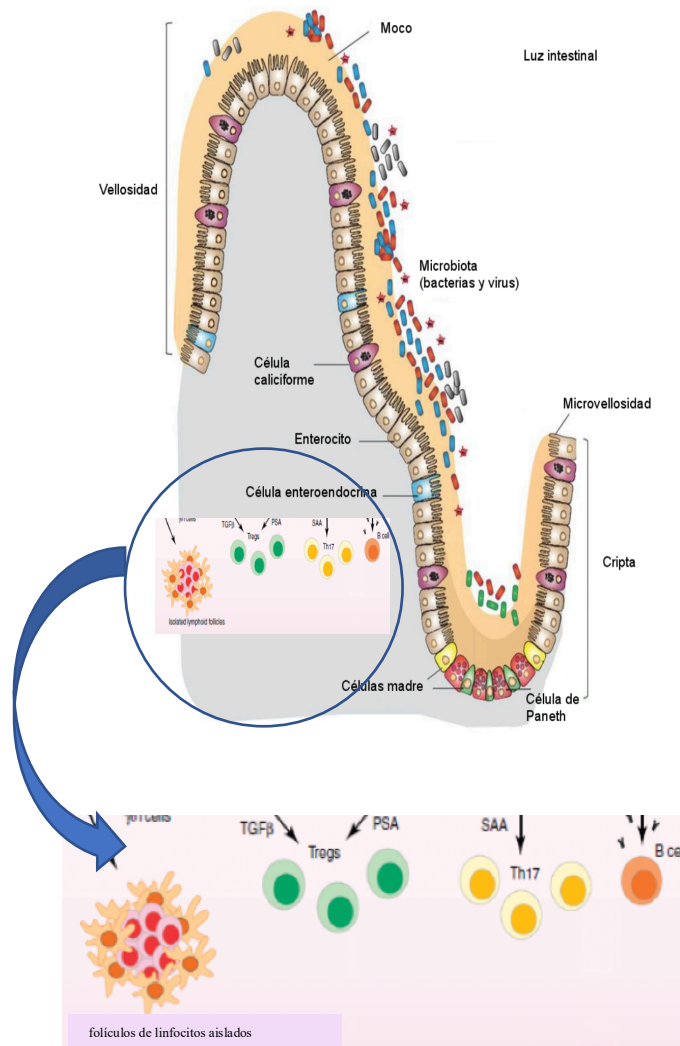
El TLAI se compone de zonas inductivas (placas de Peyer y folículos linfoides aislados) y zonas efectoras (células intraepiteliales y lámina propia) (Ramiro-Puig *et al.*, 2008) (**Figura 9**). Las células epiteliales son participantes activos en la inmunidad de la mucosa a través de la expresión de receptores de tipo Toll (TLR), que inducen la transcripción de respuestas inmunitarias e inflamatorias (Cobrin *et al.*, 2005).



**Figura 9.** Estructura de los distintos componentes del TIAI (Ramiro-Puig *et al.*, 2008).

Las células de Paneth, una población de células epiteliales intestinales especializadas que se sitúan en la base de las criptas intestinales, secretan péptidos antimicrobianos (**Figura 10**). La microbiota puede estimular esta secreción, así como inducir la activación de los TLR en las células de Paneth (Brandl *et al.*, 2007; Vaishnavi *et al.*, 2008).





**Figura 10.** Efectos de la microbiota en la inmunidad (Ubeda *et al.*, 2012)

El TLAI ejerce un papel defensivo muy importante en el intestino, el cual se encuentra constantemente expuesto a una elevada carga antigénica. Su particular estructura diferenciada en tejido organizado (placas de Peyer y ganglios linfáticos mesentéricos) y tejido difuso permite el desarrollo de una respuesta eficaz y adecuada al tipo de estímulo, es decir, frena patógenos invasivos e induce tolerancia oral en respuesta a antígenos inocuos, procedentes de la dieta y del propio epitelio intestinal. Los anticuerpos secretados, fundamentalmente de isotipo IgA, constituyen también un mecanismo de defensa, característico y común, en todas las mucosas del organismo (Ramiro-Puig *et al.*, 2008). Así nuestro sistema defensivo podemos decir que está mediado y controlado en parte por la interacción entre el exterior y nuestra mucosa intestinal.

Los linfocitos son células de carácter defensivo que circulan en nuestro torrente sanguíneo, formando parte del sistema inmunológico y siendo ellos los productores de anticuerpos. Morita *et al.*, (2011) demostraron que los linfocitos Th se pueden dividir en Th1, Th2 y Th17 en función de la expresión de CXCR3 y CCR6, receptores de citoquinas. Estos subconjuntos de linfocitos son diferentes debido a la expresión de diferentes factores de transcripción, produciendo diferentes citoquinas y ejerciendo diferentes capacidades para ayudar a los linfocitos B. Así los linfocitos Th2 aumentan la producción de IgG e IgE y los Th17 contribuyen a la secreción de IgG e IgA (Xu *et al.*, 2019). Estudios recientes mostraron que los desequilibrios en las subpoblaciones de linfocitos Th están asociados con múltiples enfermedades (Ma *et al.*, 2015). Además, las diferencias en la función y / o distribución de Th están asociadas con la patogénesis de muchas enfermedades autoinmunes, enfermedades infecciosas e inmunodeficiencias de un solo gen (Ma *et al.*, 2015).

Los linfocitos Th, incluyendo los Th1, Th2 y Th17, también se ven influidos por la microbiota, que puede inducir la diferenciación Th17 mediante la producción de altos niveles de ATP (Atarashi *et al.*, 2008).

Los linfocitos Th segregan citoquinas antiinflamatorias (IL-10, TGF- $\beta$ ), en respuesta a antígenos que se reconocen como comensales y no patógenos, siendo claves para la inmunotolerancia. En condiciones normales, en la mucosa intestinal hay un predominio de linfocitos Th, con escasos linfocitos Th1 activados, creando una inmunotolerancia que permite la exposición continua a una elevada carga antigénica tanto de la microbiota como de la comida (Aderem *et al.*, 2000).

Las células M, células especializadas en presentar antígenos, captan y transportan eficientemente diversos microorganismos y antígenos (Jang *et al.*, 2004). Las células M desempeñan un papel vital en la respuesta inmunológica que se produce en el intestino delgado y el colon, ya que permiten la captación y el transporte de antígenos desde la luz intestinal hasta la lámina propia y la submucosa, para que los macrófagos y otras células inmunológicas, lleven a cabo la respuesta inmune correspondiente.

Además, las células dendríticas (principales células inmunitarias presentadoras de antígenos) captan antígenos presentes en la luz intestinal mediante la transmisión de las dendritas a través de las uniones estrechas entre las células epiteliales, al tiempo que

mantienen la integridad de la barrera (Bilsborough J. *et al.*, 2004) y posteriormente migran a los ganglios linfáticos (Mellman *et al.*, 2001) donde inducen a los linfocitos T naturales (Alpan *et al.*, 2004). Cuando las células dendríticas presentan antígenos, se desencadena una serie de reconocimientos por receptores. Los TLR son los primeros que participan, ya que dirigen las respuestas inmunitarias activando los fenómenos de transmisión de señales que conducen a la expresión de factores como las citoquinas y las quimiocinas. Éstas reclutan y regulan las células inmunitarias e inflamatorias que inician o intensifican las respuestas inmunitarias del hospedador (Akira *et al.*, 2004).

Otras células como los mastocitos, parecen colaborar con la respuesta inmunitaria adaptativa, liberando mediadores preformados como histamina y serotonina, así como mediadores recién sintetizados como leucotrienos, prostaglandinas, factor activador de plaquetas, IL-4 y TNF $\alpha$ , muchos de los cuales afectan a la permeabilidad intestinal (Xavier *et al.*, 2007).

## 9. Tratamiento oftalmológico del síndrome de Sjögren

La gran mayoría de pacientes con SS precisan tratamiento médico oftalmológico para poder mejorar sus síntomas oculares. El tratamiento dependerá de la situación clínica de cada uno de ellos, así como de la sintomatología asociada a sus signos clínicos evidenciados en una exploración oftalmológica minuciosa. En casos leves en ocasiones el tratamiento es mínimo, siendo suficiente pequeñas medidas de lubricación de la superficie ocular mientras que en casos moderados o severos el tratamiento es intenso y muy variado, el cual exponemos a continuación.

### 9.1. Tratamiento oftalmológico para la afectación moderada del síndrome de Sjögren

**Ungüentos lubricantes:** son múltiples los ungüentos lubricantes comercializados para el tratamiento de la afección moderada de la superficie corneal en pacientes con SS, y en general mejoran a los sustitutos de la lágrima (lágrimas artificiales) en el tiempo en el que perduran sobre la superficie ocular. Por otro lado, son peor tolerados en su uso diurno debido a la visión borrosa que genera debido a su gran densidad, siendo utilizados en la gran mayoría de casos para la hidratación nocturna de los pacientes.

**Agentes inmunomoduladores tópicos:**

**Ciclosporina tópica:** la ciclosporina tópica se administra una gota dos veces al día y se puede usar junto con lágrimas artificiales. Sin embargo, la eficacia aumenta sustancialmente con una dosificación diaria más frecuente (Foulks *et al.*, 2008). El uso está contraindicado en pacientes con infecciones oculares activas. Es por ese motivo por el que podemos tratar a los pacientes con síntomas o signos persistentes con ciclosporina tópica en dosis de hasta cuatro veces al día durante un año antes de considerarlo un fracaso del tratamiento.

En una revisión sistemática de 30 ensayos aleatorizados que evaluaron la eficacia de la ciclosporina tópica en todas las formas de ojo seco (independientemente de la edad, el sexo, la gravedad, la etiología o la clasificación del ojo seco), los beneficios del fármaco sobre los síntomas y signos del ojo seco fueron inconsistentes y no siempre excedió el del vehículo o el control de lágrimas artificiales durante el período de tiempo del ensayo clínico (de Pavia *et al.*, 2019). Estas y otras observaciones han llevado a varios autores a cuestionar el uso generalizado y el costo concomitante de la ciclosporina tópica en los Estados Unidos (Schwartz *et al.*, 2018).

**Lifitegrast tópico:** Lifitegrast tópico (solución oftálmica al 5%) se administra una gota dos veces al día y se puede usar junto con lágrimas artificiales. La utilización de este fármaco durante seis a ocho semanas de duración parece ser suficiente para evaluar la respuesta clínica, ya que se ha observado una mejora en los ensayos clínicos de fase III más precoz de lo que se ha informado para la ciclosporina tópica. No ha sido estudiada la duración óptima de la terapia con Lifitegrast (Holland *et al.*, 2016).

**Esteroides tópicos:** en pacientes con enfermedad de moderada y con signos de inflamación ocular que no han respondido a lágrimas artificiales, lubricantes y ciclosporina tópica o lifitegrast, se pueden usar esteroides tópicos. El tratamiento suele ser de duración limitada debido a la preocupación por los efectos adversos como el glaucoma y la formación de cataratas (Marsh *et al.*, 1999). Un aumento de la presión intraocular es la principal complicación del uso de esteroides tópicos y requiere controles frecuentes de presión para su detección.

**Oclusión puntual:** la oclusión puntual mediante tapones puntuales o cauterización del punto lagrimal es una alternativa en pacientes con sequedad ocular moderada y con hallazgos oculares anormales, en quienes la instilación frecuente de lágrimas artificiales

o lubricantes es inadecuada o poco práctica y el uso apropiado de ciclosporina tópica y lifitegrast no ha proporcionado un alivio adecuado.

## **9.2. Tratamiento oftalmológico para la afectación severa del síndrome de Sjögren.**

Los signos de enfermedad grave pueden incluir erosiones corneales puntiformes marcadas o graves, queratitis filamentosa y tinción importante con colorantes para córnea y conjuntiva, niveles bajos de Schirmer y un aumento significativo de la osmolaridad lagrimal.

Los pacientes con síntomas frecuentes o constantes deben tratarse inicialmente utilizando las medidas descritas para la enfermedad moderada, pero es posible que no respondan adecuadamente a estos enfoques por sí solos. Los pacientes con enfermedad grave pueden requerir la intensificación de las terapias que ya se están empleando o intervenciones adicionales.

Para estos pacientes, las medidas adicionales que pueden emplearse, dependiendo en parte de la preferencia del paciente, incluyen:

Los **insertos oftálmicos de hidroxipropilcelulosa** son un dispositivo patentado para aliviar el ojo seco de moderado a severo. Estos insertos en forma de arroz se colocan en el fondo de saco inferior del ojo donde liberan el demulcente a lo largo del día y lubrican la superficie ocular. La visión borrosa es un efecto secundario potencial de su uso.

Uso de **gafas de protección contra la humedad** u otras barreras físicas para la conservación de las lágrimas.

**Oclusión puntual permanente** de los cuatro conductos (Vrabec *et al.*,1993). Consiste en el cierre definitivo de los puntos lagrimales superiores e inferiores mediante técnicas quirúrgicas específicas.

**Terapias antiinflamatorias e inmunomoduladoras sistémicas**, por lo general, no se utilizan terapias antiinflamatorias o inmunosupresoras sistémicas para el tratamiento de los síntomas de la sequedad ocular solo como tratamiento de primera línea. Los siguientes agentes, que a veces se utilizan en pacientes con enfermedad sistémica o extraglandular, a veces también son beneficiosos para los síntomas del ojo seco en pacientes con SS, Hidroxicloroquina y Rituximab.

**Lentes de contacto**, las lentes de contacto esclerales permeables al gas de gran diámetro pueden usarse en pacientes seleccionados con ojo seco severo (Romero *et al.*, 2000). Estas lentes están completamente soportadas por la esclerótica y tienen un depósito de líquido en el espacio entre la superficie posterior del lente y la superficie anterior de la córnea (Van der Worp *et al.*, 2014). Protegen la superficie ocular y proporcionan una hidratación continua de la superficie ocular. Las principales indicaciones para su uso son la mejora de la agudeza visual y la protección de la superficie ocular de las fuerzas de cizallamiento del párpado al parpadear; requieren un proceso de ajuste complejo y son costosos, lo que limita su disponibilidad.

**Hemoderivados:** varios ensayos aleatorizados y otros estudios han demostrado que una dilución del suero del paciente (suero autólogo) puede ser útil en pacientes con ojo seco refractario a otros tratamientos (Tsubota *et al.*, 1999). Las lágrimas artificiales preparadas a partir de suero de cordón umbilical también se han utilizado en pacientes muy secos (Yoon *et al.*, 2007), así como los derivados plaquetarios o el plasma rico en factores de crecimiento.

**Neuroestimulador lagrimal intranasal:** la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) ha aprobado un neuroestimulador lagrimal intranasal que aumenta la producción natural de lágrimas como un dispositivo domiciliario recetado (Sheppard *et al.*, 2019). La punta del dispositivo se inserta a través de la cavidad nasal y, cuando se activa, estimula la mucosa nasal, que está inervada por el quinto par craneal que también inerva la superficie ocular.

**AINE tópico:** las gotas tópicas de antiinflamatorios no esteroideos (AINE) nunca deben usarse en pacientes con ojo seco relacionado con SS debido a riesgos potenciales como son la lisis corneo-escleral, perforación y queratopatía grave (Guidera *et al.*, 2001).

**Tarsorrafia:** la tarsorrafia es un procedimiento quirúrgico en el que una parte o la totalidad de los párpados superior e inferior se suturan para proteger la córnea [80]. Este procedimiento se aplica principalmente a pacientes con ojo seco con defectos del epitelio corneal que no cicatrizan y con riesgo inminente de perforación

**Cirugía corneal:** siendo las ablaciones con láser excimer y el trasplante corneal técnicas muy utilizadas en pacientes con opacidad corneal secundaria a procesos que

afectan a la viabilidad de la córnea, su utilización en pacientes con SS y afectación corneal severa es muy baja. Los pacientes con SS y pérdida de agudeza visual no corregible con gafa o lentes de contacto sólo podrían mejorar su situación mediante procedimientos quirúrgicos sobre la córnea (tratamientos con excimer y/o trasplante corneal). La alta tasa de complicaciones asociadas a ellos hace que sea muy infrecuente su utilización en paciente con SS. La mayoría de las ocasiones el trasplante queda reservado para casos en los que la córnea sufre perforación espontánea y la viabilidad del globo está en riesgo (Tzamaly *et al.*, 2021). Las posibilidades quirúrgicas pasan por el trasplante en caliente o por el uso de membrana amniótica para intentar frenar la lisis corneal, habitualmente asociada a la presencia de la exposición prolongada del estroma corneal en ausencia de epitelio suprayacente viable (Berguiga *et al* 2013).

### **9.3. Manejo oftalmológico del síndrome de Sjögren en la Unidad de córnea y segmento anterior del Hospital La Arruzafa**

Es habitual en la práctica clínica tener pacientes crónicos con SS y alteración corneal severa. El daño continuado del epitelio corneal, junto con los defectos epiteliales persistentes hacen que los pacientes presenten leucomas, en una parte no despreciable de ellos que les impiden alcanzar unas adecuadas agudezas visuales. La irregularidad corneal generada por los leucomas corneales además de pérdida de visión por opacidad corneal genera pérdida de visión por irregularidad corneal. Para este grupo de pacientes las soluciones terapéuticas pasan por la utilización de lentes de contacto que consiguen minimizar el astigmatismo irregular de la cara anterior de la córnea, aunque no la opacidad corneal o proceder a la utilización de procedimientos quirúrgicos como las ablaciones corneales con láser excimer o los trasplantes corneales.

La práctica clínica habitual nos muestra un número importante de pacientes con SS, los cuales no sólo presentan síntomas leves, moderados o severos de ojo seco, si no que también presentan signos de afectación corneal que varía desde epitelopatía leve a leucomas severos con adelgazamiento corneal. El manejo de los casos leves nos permite conseguir resultados óptimos para nuestros pacientes, pero en los casos graves nos vemos muy limitados debido a que las alternativas quirúrgicas han sido reportadas como opción en la fase desesperada de la enfermedad, cuando la la viabilidad del globo está en

peligro (Tzamalys *et al.*, 2021). En aquellos pacientes en los que tenemos una merma importante de la visión, no solucionable mediante opciones no invasivas (gafas o lentes de contacto gas permeables, LCGP) en ocasiones no ofrecemos las alternativas quirúrgicas que en otros grupos de pacientes podrían mejorarles la calidad de vida, por miedo a las complicaciones reportadas cuando se tiene el SS como enfermedad de base.

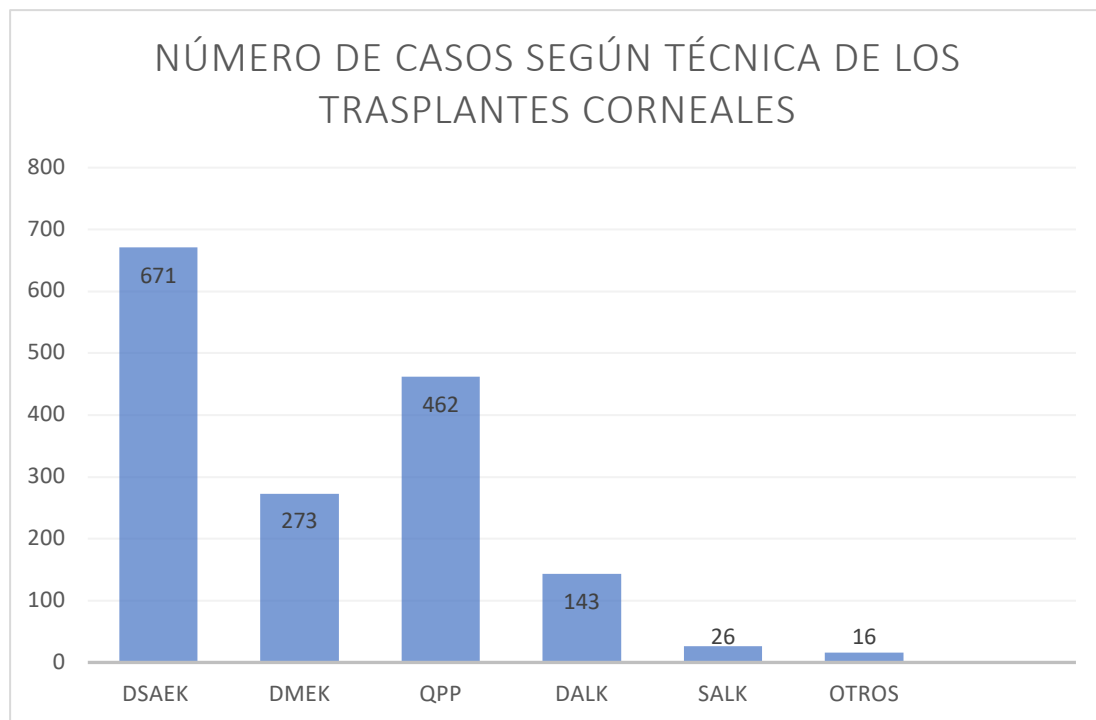
Este perfil de paciente con lesión corneal severa, pérdida de visión no mejorable con gafa o LCGP, suele quedar en una situación de limbo en el que el balance riesgo - beneficio no nos permite mejorar su situación oftalmológica.

Estos hechos nos han llevado a analizar la base de datos de los pacientes trasplantados desde enero de 1999 hasta abril de 2021 en el Hospital de la Arruzafa de Córdoba, para valorar cuál es el porcentaje de pacientes con SS a los cuales les ha sido indicado un trasplante corneal con finalidad visual.

Las técnicas de trasplante en la actualidad se dividen en técnicas endoteliales (DSAEK, queratoplastia endotelial automatizada con retirada de membrana descemet y DMEK, queratoplastia endotelial de la membrana de descemet), técnicas para tratar el estroma corneal preservando el endotelio corneal (DALK, queratoplastia laminar anterior profunda y SALK, queratoplastia laminar anterior superficial) así como la QPP, queratoplastia penetrante o queratoplastia que recambia todas las capas de la córnea.

De los 1.591 trasplantes realizados desde 1999 hasta abril de 2021 en el Hospital de la Arruzafa, la gran mayoría de los pacientes han sido intervenidos mediante trasplante endotelial para resolución de patología del endotelio corneal. Entre ellos 671 pacientes intervenidos mediante técnica DSAEK y 273 pacientes intervenidos mediante técnica DMEK. Eso significa que el 59,33% de la patología intervenida ha sido patología asociada a la disfunción endotelial aislada. En el resto de las ocasiones se ha realizado una cirugía para casos donde había daño estromal aislado o daño estromal asociado a daño endotelial, QPP/DALK/ SALK. De ese grupo de pacientes 143 se intervinieron mediante técnica DALK, 462 mediante técnica QPP y 26 de ellos mediante técnica SALK. El resto de cirugías fueron situaciones poco frecuentes como 3 casos de escleroqueratoplastias, 6 casos de queratoprótesis de Boston y 7 casos de trasplantes de limbo heterólogos, recogidas como “otros” (**Figura 11**).





**Figura 11.** Distribución de casos según técnica quirúrgica

Hemos podido analizar como de todos los pacientes intervenidos sólo 3 presentaban SS como causa primaria de su afectación corneal, de los cuales ninguno de ellos presentó un postoperatorio dentro de los estándares de este tipo de intervención. Dos de los pacientes fueron perdidos en el seguimiento hace más de 10 años mientras que el tercer paciente ha precisado 3 trasplantes en el mismo ojo por complicaciones asociadas. Las complicaciones fueron un absceso corneal en la unión injerto receptor (**Figura 12**) que una vez resuelto generaba gran deformidad corneal y asigmatismo irregular evidenciado por topografía corneal (**Figura 13**), lo que obligó a una nueva queratoplastia. Posteriormente presentó un defecto epitelial persistente en el centro de la córnea, con adelgazamiento corneal (**Figura 14**) que meses después genera perforación corneal central, tratada con queratoplastia lamelar anterior superficial con finalidad tectónica para mantenimiento de la integridad del globo ocular. Finalmente ha precisado queratoplastia penetrante con finalidad visual el pasado mes de febrero de 2020, estando estable en la actualidad con agudezas visuales de 0,6 en gafa y 0,7 con lente de contacto (**Figura 15** y **Figura 16**).

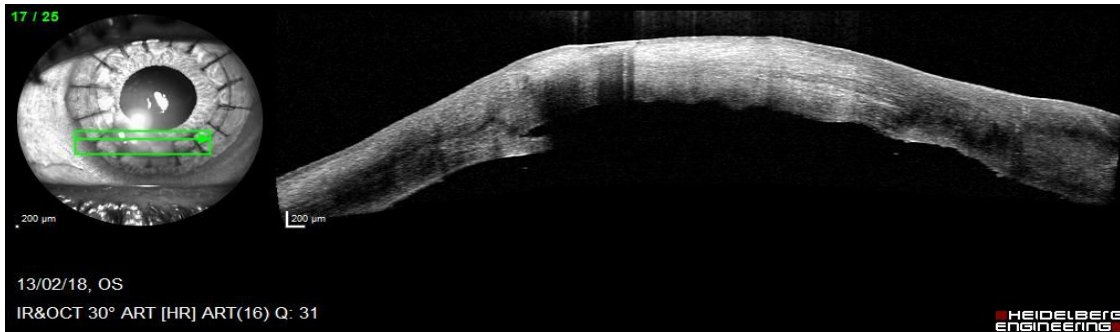


Figura 12. Tomografía de coherencia óptica que muestra el absceso en la unión injerto-receptor

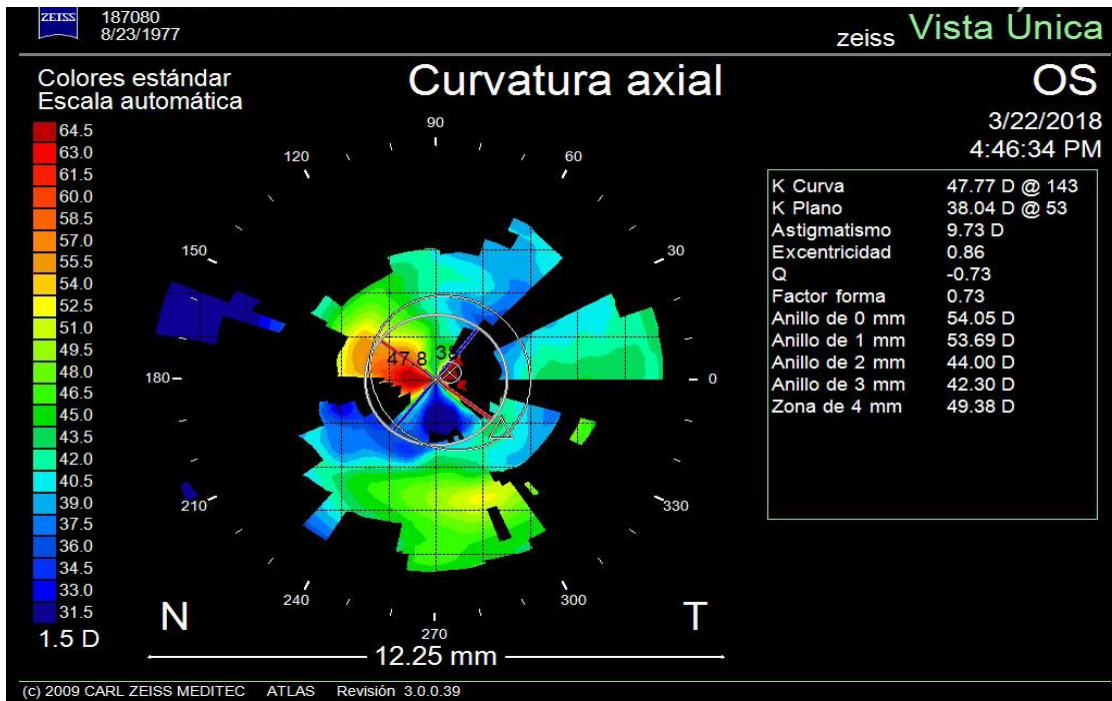


Figura 13. Topografía corneal donde se evidencia la irregularidad corneal

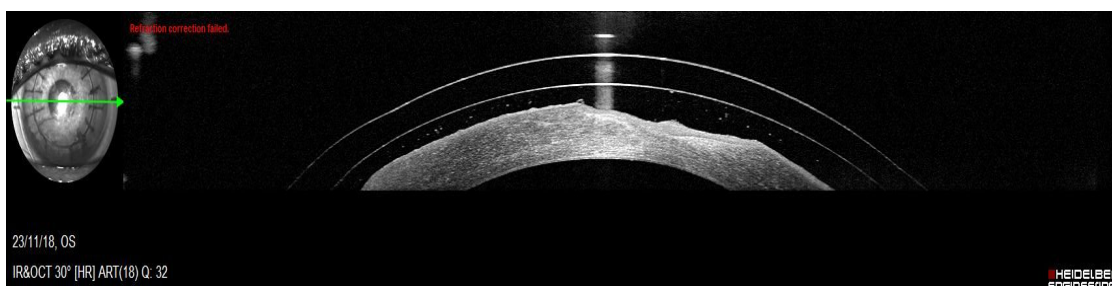


Figura 14. Tomografía de coherencia óptica que muestra el adelgazamiento corneal secundario a un defecto epitelial persistente.

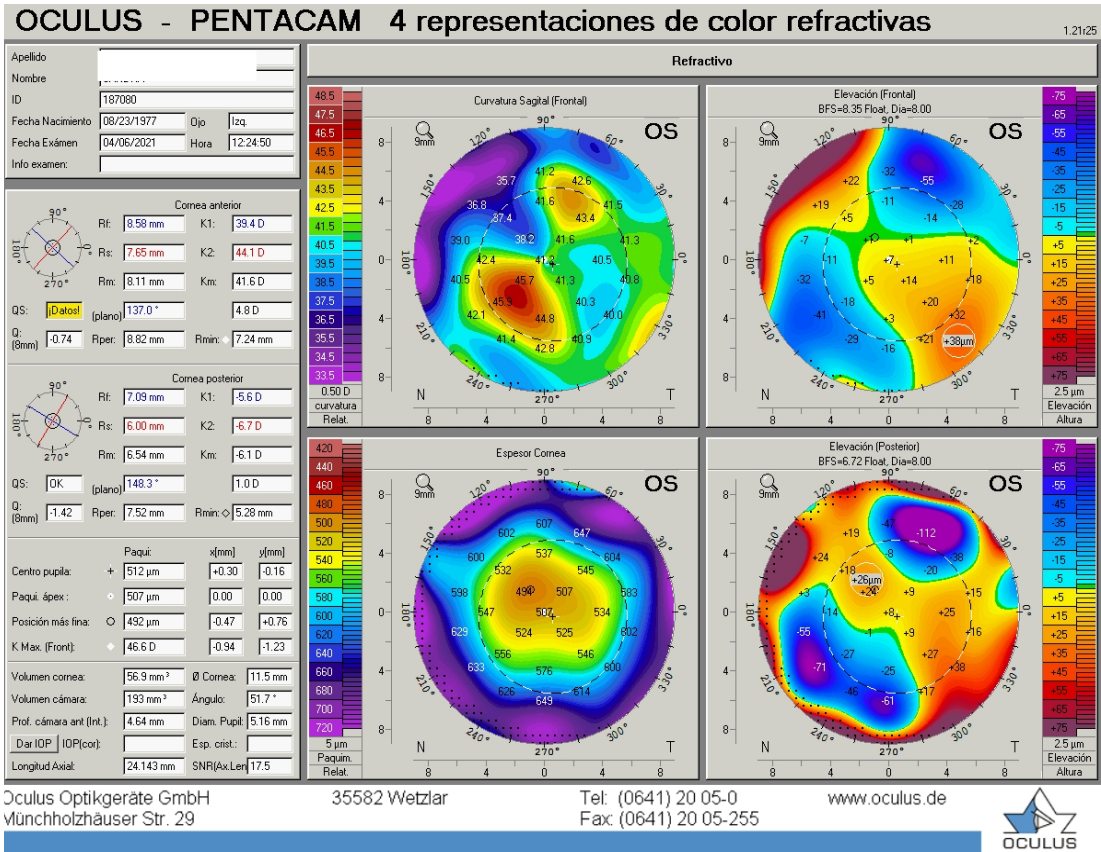


Figura 15. Topografía corneal donde se evidencia el astigmatismo regular

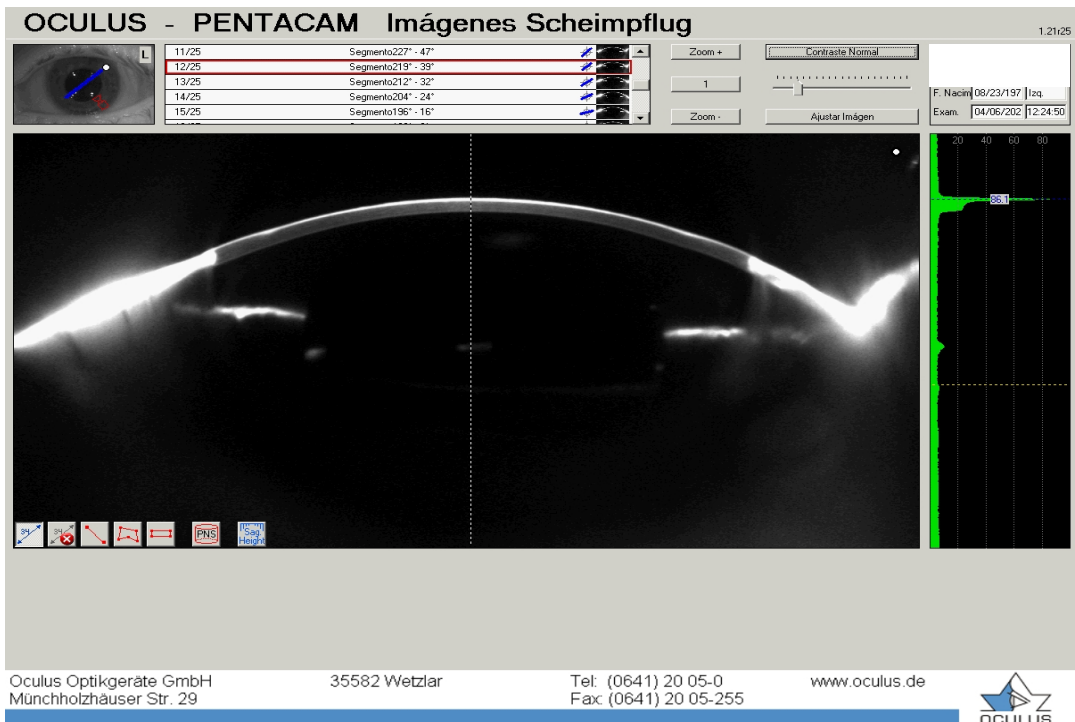


Figura 16. Imagen con tecnología scheimpflug que muestra la situación actual del trasplante

## JUSTIFICACIÓN

---

En la actualidad no se dispone de tratamientos médicos efectivos contra la etiopatogenia de la enfermedad, disponemos de tratamiento sintomático que en un porcentaje no despreciable de pacientes resulta insuficiente y los hace candidatos a tratamiento quirúrgico que permita la recuperación de la transparencia corneal.

Las técnicas quirúrgicas disponibles quedan restringidas por las altas tasas de complicaciones y la falta de resultados en el control de la enfermedad y en su calidad de vida.

Este hecho deja huérfanos de un tratamiento efectivo a un porcentaje elevado de pacientes de SS, lo que justifica la necesidad de mejorar el conocimiento de la etiopatogenia de la enfermedad que nos permita conocer otras dianas terapéuticas efectivas.

Son escasos los estudios de microbiota en pacientes con SS pero muestran diferencias en su caracterización. Este trabajo tiene como objetivo ampliar el conocimiento de la microbiota, permeabilidad intestinal e inflamación en pacientes con SS con el fin de ampliar el conocimiento de esta enfermedad que nos permita estrategias preventivas y terapéuticas que modifiquen el escenario actual de los pacientes con SS.

## HIPÓTESIS

---

La microbiota intestinal en pacientes con SSP podría ser diferente a la microbiota de pacientes sanos.

Los parámetros inflamatorios en plasma de pacientes con SSP podrían ser diferentes a los de los pacientes sanos, así como podrían existir diferencias en la permeabilidad intestinal entre estos dos grupos de pacientes.

## OBJETIVOS

---

- Caracterización de microbiota fecal en pacientes con Síndrome de Sjogren primario (SSP) comparados con pacientes sanos.
- Determinación de parámetros inflamatorios en plasma de pacientes con SSP comparados con pacientes sanos y su relación con microbiota fecal.
- Determinación de permeabilidad intestinal (a través de zonulina plasmática) en pacientes con SSP comparados con pacientes sanos y su relación con microbiota fecal.

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

### 1. Sujetos de estudio

En el Servicio de Oftalmología del Hospital Arruzafa se reclutaron un total de 19 pacientes con SSP con edades comprendidas entre los 18 y los 75 años.

El cálculo del tamaño de muestra se realizó considerando resultados preliminares sobre el cambio en el número de copias por gramo de heces de *Lactobacillus* al comparar pacientes con otras enfermedades autoinmunes (Diabetes Mellitus tipo 1) frente a controles sanos. Dichas bacterias se han seleccionado por ser una de las más importantes formadoras de lactato. Tomando como dato una diferencia significativa en el número de copias por gramo de heces de *Lactobacillus* de 0,76 y asumiendo un error alfa de 0,05% y una potencia del 95%. Para ello se necesitará incluir 10 pacientes en cada grupo. Sin embargo, para aumentar la potencia estadística del estudio, y poder compensar una posible menor diferencia en los resultados esperados, planteamos incluir hasta 19 sujetos en cada grupo de estudio.

Los pacientes de SSP fueron diagnosticados según los criterios de clasificación del American College of Rheumatology / European League Against Rheumatism (ACR-EULAR) (Shiboski *et al.*, 2017). Todos los pacientes con SSP tuvieron una evaluación ocular, oral y reumatológica completa, que incluyó un panel de autoanticuerpos séricos que permitiera el establecimiento de los criterios.

Los criterios de exclusión incluyeron mujeres embarazadas y lactantes, uso de antibióticos o probióticos locales o sistémicos 3 meses antes del examen y presencia de SS secundario y enfermedad intestinal inflamatoria concurrente. Fueron excluidos del estudio los pacientes con SSS, debido a que las enfermedades sistémicas autoinmunes más frecuentemente asociadas, lupus eritematoso sistémico y artritis reumatoide (LES y AR) presentan cambios en la microbiota intestinal, pudiendo ser un factor de confusión en el estudio.

Además, se reclutaron para el estudio a 19 sujetos sanos pareados por edad, sexo e índice de masa corporal (IMC) con el grupo de pacientes con SSP. Los criterios de exclusión para los controles sanos incluyeron el diagnóstico de enfermedades intestinales y / o el uso de antibióticos o probióticos en los últimos 3 meses antes del muestreo.

Las características demográficas de los pacientes fueron recogidas (**Anexo 1**) incluyendo: edad en años, sexo, índice de masa corporal, raza caucásica u otras, así como la presencia o ausencia de tabaquismo en los pacientes

El estudio fue llevado a cabo de acuerdo con las pautas éticas internacionales para la investigación médica en seres humanos preparadas por el consejo de Organizaciones Internacionales de las ciencias Médicas (CIOMS) en colaboración con la Organización Mundial de la Salud (OMS): Ginebra 2002; [http://www.ub.edu/rceue/archivos/Pautas\\_Eticas\\_Internac](http://www.ub.edu/rceue/archivos/Pautas_Eticas_Internac) .

Todos los pacientes incluidos han sido adecuadamente informados de manera oral y escrita (**Anexo 2**) sobre las características y finalidad del estudio y han firmado el consentimiento informado, previamente a su inclusión (**Anexo 3**). El estudio ha sido llevado a cabo de acuerdo con la declaración de Helsinki (Fortaleza 2013). Se ha asegurado en todo momento la seguridad y confidencialidad de la información de los pacientes. La confidencialidad de los datos de cada sujeto ha sido respetada en todo momento. Se ha asegurado que los procedimientos sean adecuados para el cumplimiento del Reglamento (UE) N. 2016/679 General de Protección de datos (RGPD).

Todos los datos que puedan identificar al participante se han mantenido separados del resto de la información recogida. Cada caso del estudio ha contado con un número de identificación que ha sido el que ha figurado en las bases de datos. El análisis

de la información se ha realizado siempre de forma agregada y nunca individual. Todos los investigadores implicados en el proyecto se han comprometido a cumplir las normas necesarias para preservar la confidencialidad de la información de los participantes.

Los datos personales se han desvinculado permanentemente de los datos clínicos con el fin de proteger la identidad de los participantes. Las bases de datos del estudio han estado protegidas electrónicamente con códigos que han limitado el acceso únicamente a los investigadores del proyecto.

El estudio ha sido remitido y evaluado por el Comité ético del Hospital Reina Sofía (**Anexo 4**) y no se ha iniciado el reclutamiento de pacientes hasta su aprobación definitiva. Con la excepción de aquellas situaciones de emergencia, no se han permitido cambios o desviaciones del protocolo sin la aprobación documentada.

Las muestras biológicas han sido vinculadas al Biobanco, siguiendo protocolos normalizados de trabajo, formando parte del Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía y de la Plataforma Nacional de Biobancos (exp. PT17/0015/0041).

## **2. Análisis de variables bioquímicas**

Se recolectaron muestras de sangre de cada uno de los pacientes del estudio después de un ayuno nocturno de al menos 12 horas. El suero se separó por centrifugación y las alícuotas se congelaron inmediatamente a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Los niveles de glucosa en ayunas, insulina, colesterol total, triglicéridos, colesterol HDL, colesterol LDL se midieron por duplicado usando un autoanalizador de dimension (Dade Behring Inc., Deerfield, IL) por métodos enzimáticos (Randox Laboratories Ltd., Reino Unido). El análisis de autoanticuerpos, incluidos los anticuerpos anti-Ro/ SS-A y anti-La/ SS-B, se detectaron mediante un ensayo de inmunopartículas múltiples (Quanta Plex SLE Profile 8; Inova Diagnostics) y se analizaron con un instrumento Luminex 100, aplicando los valores de corte recomendado por el fabricante. Los autoanticuerpos antinucleares (ANA) se analizaron mediante una técnica de inmunofluorescencia indirecta con células HEp2 (Biorad, Marnes la Coquette, Francia) y los niveles de factor reumatoide y complemento evaluados mediante la medición del componente 3 del complemento (C3) y el componente 4 del complemento (C4) se midieron mediante una técnica de nefelometría (nefelómetro BNII; Dade Behring, Manburg, Alemania).

### **3. Recogida de muestras de heces**

Se recogieron muestras de heces de unos 4-8 gramos de peso, por la mañana en un frasco estéril de boca ancha, las cuales fueron congeladas lo antes posible a -80°C hasta su posterior análisis. Las muestras hasta su almacenamiento a -80°C permanecieron a 4°C durante menos de tres horas.

### **4. Extracción de ADN y secuenciación de la microbiota intestinal**

La extracción de ADN se realizó a partir de 200 mg de heces utilizando el QIAamp DNA Stool Mini kit (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones de manufactura (Qiagen, Hilden, Alemania). La concentración de ADN se determinó mediante absorbancia a 260 nm (A260) y la pureza se estimó determinando la relación A260 / A280 con un espectrofotómetro Nanodrop (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, EE.UU.).

Para crear las librerías para la secuenciación del microbioma, cada una de las muestras de ADN (estandarizadas a 10 ng/ul) se amplificaron utilizando cebadores que codifican para las regiones hipervariables V2-4-8 y V3-6, 7-9 del ARNr 16S bacteriano utilizando el 16S Metagenomics Kit (Thermo Fisher Scientific). Las condiciones de PCR utilizadas fueron: 10 min a 95 °C, 30 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 58 °C y 20 s a 72 °C, seguido de 10 min a 72 °C. Los productos de PCR derivados de la amplificación de las regiones hipervariables se purificaron utilizando AMPure® XP beads (Beckman Coulter Genomics) para eliminar cualquier resto de cebadores o dímeros de cebadores. Posteriormente para la creación de las librerías los amplicones fueron tratados utilizando el Ion Plus fragment Library kit (Thermo Fisher Scientific) y se le añadieron los códigos identificativos utilizando el Ion Xpress Barcode Adapters 1-96 kit (Thermo Fisher Scientific). Las librerías creadas fueron purificadas utilizando AMPure® XP beads (Beckman). La emulsión y secuenciación de las librerías se llevó a cabo utilizando el Ion 520™/ 530™ Kit-Chef (Thermo Fisher Scientific) y el Ion 520 chip (Ion 520™ Chip Kit), usando el Ion Chef y la plataforma Ion Torrent S5™ system. Después de la secuenciación, la información obtenida será inicialmente filtrada utilizando el Ion Reporter Software V4.0 para eliminar las secuencias de baja calidad.



## 5. Análisis bioinformático

Se utilizó el software Quantitative Insights into Microbial Ecology (QIIME2, versión 2019.4) (Bolyen *et al.*, 2019) para realizar el análisis taxonómico y de diversidad de las lecturas crudas (sin modificar) del ARNr 16S.

A continuación, se usó el plugin DADA2 con el método denoise. Este método consiste en los siguientes pasos: 1º se filtraron todas las secuencias que no tuvieran la longitud mínima después del recortado de las partes con baja calidad < 25 pb; 2º se combinaron todas las lecturas idénticas en secuencias únicas asignando la abundancia correspondiente a cada secuencia. En este paso DADA2 mantiene un resumen de la calidad de cada secuencia; 3º se eliminaron las secuencias que no presentaron una secuencia homóloga para unirse (conocidas como singletons) y las posibles quimeras (creadas por el proceso de PCR); 4º las lecturas combinadas se usaron para formar secuencias consenso dando lugar a las unidades taxonómicas operacionales (OTUs), obteniendo una tabla de frecuencia de estos OTUs, las cuales fueron utilizadas para la construcción de árboles filogenéticos y la clasificación taxonómica.

A continuación, se realizó la clasificación taxonómica de los OTUs utilizando la base de datos 13\_8 de Greengenes y el clasificador VSEARCH con un 97% de similitud de secuencia. Posteriormente se clasificó la tabla de secuencias representativas con el método classify-sklearn del plugin feature-classifier.

Posteriormente, las lecturas fueron alineadas usando la función de alineamiento de secuencias nucleotídicas MAFFT en QIIME 2, se creó un árbol filogenético para los análisis de diversidad filogenética de las secuencias el cual fue utilizado para los análisis de diversidad alfa (riqueza de especies y distribución de especies por muestra) y beta (diferencia entre la riqueza y distribución de las especies entre muestras) utilizando la extensión de q2- phylogeny en QIIME2.

Para los análisis de diversidad, se seleccionaron 731 secuencias por muestra (siendo este número cercano al total de las secuencias presentes en la muestra con menor cantidad de lecturas) y se analizaron en QIIME2 con la función “core-metric-phylogenetic”. Se realizaron gráficas de análisis de componentes principales (PCoA), lo que nos permitió realizar una comparación entre la similitud, diferencias en tipo y

cantidad de lecturas en las muestras utilizando las métricas de  $\beta$  diversidad. Las métricas de diversidad alfa (Shannon y Chao1) y beta (disimilitud de Bray - Curtis) se estimaron con la prueba de Kruskal–Wallis y el análisis de varianza multivariado permutacional (PERMANOVA) con 999 permutaciones respectivamente.

Las funciones del metagenoma se predijo mediante el Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States (PICRUSt) a través de la selección de OTUs en la base de datos de Greengenes (Zaneveld et al., 2013.). El análisis estadístico se realizó en R 3.6.0 utilizando el paquete de R "pheatmap" para el análisis de datos y su representación gráfica. Los valores de p se corrigieron para comparaciones múltiples utilizando el método de Benjamini-Hochberg. Una  $p < 0,05$  corregida se consideró estadísticamente significativa.

## **6. Análisis de permeabilidad intestinal**

El nivel plasmático de zonulina se determinó mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) usando el kit comercial (Immunodiagnostik AG, Bensheim, Alemania). Las mediciones se realizaron por duplicado y se utilizaron valores medios para el análisis. El límite de detección de zonulina fue de 0,22 ng / ml. Los coeficientes de variación intra e interensayo estuvieron entre el 3-10%.

## **7. Medición de los niveles de citoquinas en suero**

Las concentraciones de IL-6, IL-12, IL-17, TNF-alfa e INF-gamma se cuantificaron mediante kits de ensayo ELISA (Thermo Fisher Scientific, ES) en muestras de suero de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los límites de detección fueron: 7.8-500 pg / mL para IL-6, 1.56-100 pg / mL para IL-12, 0.23-15 pg / mL para IL-17, 15.6-1000 pg / mL para TNF-alfa y 1.6- 100 pg / mL para INF-gamma. La citoquina IL-10 se midió mediante el kit de ELISA Novex® (Life Technology), realizado de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El rango de ensayo fue de 7.8 a 500 pg / mL.

## **8. PCR cuantitativa en tiempo real para células Treg**

El ARN total se extrajo de células mononucleares de sangre periférica utilizando el QIAamp RNA Blood Mini kit de acuerdo con el protocolo del fabricante. El ARN se diluyó

en 20 µl de agua libre de ARNasa y posteriormente se cuantificó con un espectrofotómetro (Nanodrop N-100, Thermo Scientific). La retrotranscripción se realizó utilizando 1 µg de ARN total con el Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) y hexámeros aleatorios en reacciones de 20 µl. Las amplificaciones se realizaron mediante una placa de reacción MicroAmpH Optical de 96 pocillos (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos) en un equipo ABI 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos). Los conjuntos de cebadores / sondas TaqMan® prevalidados y disponibles comercialmente se usaron de la siguiente manera: ARNr 18S (4319413E) usado como control endógeno para el gen diana en cada reacción y gen FOXP3 (RefSeq NM\_001114377.1). Los niveles de expresión de ARNm en relación con el ARNr 18S se calcularon mediante el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Todas las pruebas se realizaron por duplicado.

## 9. Análisis estadístico

Se utilizó la prueba de suma de rangos de Kruskal-Wallis para comparar la abundancia relativa de los diferentes taxones bacterianos entre pacientes con SSP e individuos sanos, y se aplicó la tasa de descubrimiento falso (FDR) mediante el método de Benjamini-Hochberg para corregir los valores p significativos (valor q <0,05).

Las características antropométricas y clínicas se analizaron con el programa SPSS Statistics V.20.0 (SPSS, Chicago, Illinois, EE. UU.). Las variables continuas se compararon entre grupos mediante la prueba U de Mann-Whitney, mientras que las variables categóricas se compararon mediante la prueba exacta de Fisher. Se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman para estimar las correlaciones entre variables. Se realizó un análisis de regresión lineal para identificar bacterias individuales como predictores independientes de los niveles de mediadores inflamatorios, niveles de zonulina sérica y expresión relativa de FOXP3 en los grupos de estudio. Los resultados se presentaron como media  $\pm$  desviación estándar (DE) para las variables cuantitativas y como frecuencias y porcentajes para las cualitativas. Los valores se consideraron estadísticamente significativos cuando p <0.05.

## RESULTADOS

### 1. Características clínicas de los pacientes con SSP y de los controles sanos

Las características demográficas, bioquímicas y clínicas de los participantes se muestran en la **Tabla 5**. No se encontraron diferencias significativas en edad, sexo, IMC, raza, consumo de tabaco, colesterol total, triglicéridos, colesterol HDL, colesterol LDL y glucosa en ayunas entre los grupos estudiados ( $p > 0,05$ ), sólo los niveles séricos de PCR aumentaron significativamente en los pacientes con SSP en comparación con los controles sanos. Las comorbilidades en los pacientes con SSP incluyeron diabetes ( $n = 1$ ), hipotiroidismo ( $n = 3$ ), fibromialgia ( $n = 2$ ), úlceras orales ( $n = 1$ ) y artralgia ( $n = 3$ ), pero ninguno de los pacientes con SSP tuvieron una enfermedad autoinmune concomitante. Además, los pacientes incluidos en el estudio no habían tomado esteroides o inmunosupresores durante al menos 3 meses antes de la recolección de la muestra.

**Tabla 5.-** Datos demográficos, clínicos, bioquímicos y de medicación de los pacientes con SSP y los controles sanos.

	SSP (n= 19)	Controles sanos (n=19)	<i>p</i>
Edad en años, media $\pm$ DE (desviación estándar)	56,43 $\pm$ 8,74	54,70 $\pm$ 8,42	0,545
Sexo femenino, n (%)	19 (100)	19 (100)	0,589
IMC, media $\pm$ DE	26,17 $\pm$ 6,27	26,25 $\pm$ 4,15	0,963
Fumador, n (%)	7 (36,84)	8 (42,10)	0,736
Caucásico, n (%)	19 (100)	19 (100)	0,589
Cumplen criterios ACR-EULAR 2016 para SS, n (%)	19 (100)	NA	-
<b>Bioquímica en sangre</b>			
Glucosa (mg/dl)	93,44 $\pm$ 22,14	92,16 $\pm$ 18,24	0,847
Insulina (mg/dl)	8,81 $\pm$ 3,63	6,82 $\pm$ 3,72	0,104
Triglicéridos (mg/dl)	90,41 $\pm$ 29,65	97,92 $\pm$ 27,51	0,398
Colesterol (mg/dl)	189,38 $\pm$ 22,29	176,3 $\pm$ 34,6	0,175
LDL- colesterol (mg/dl)	123,76 $\pm$ 31,0	118,20 $\pm$ 33,75	0,600
HDL-colesterol (mg/dl)	63,16 $\pm$ 14,73	59,84 $\pm$ 15,60	0,504
Protéina reactiva C (ng/dl)	3,80 $\pm$ 0,49	2,77 $\pm$ 0,63	0,001
ANA positivo, n (%)	15 (78,94)	NA	-
ENA positivo, n (%)	6 (31,57)	NA	-
Ro/SSA positivo, n (%)	11 (57,89)	NA	-
La/SSB positivo, n (%)	12 (63,15)	NA	-
Factor reumatoide positivo, n (%)	13 (68,42)	NA	-

C3 bajo en la inclusión (< 0,90 g/L), n (%)	7 (36,84)	NA	-
C4 bajo en la inclusión (< 0,10 g/L), n (%)	7 (36,84)	NA	-
<b>Otros síntomas reportados</b>			
Hipotiroidismo, n (%)	3(15,78)	0 (0)	-
Fibromialgia, n (%)	2 (10,52)	0 (0)	-
Úlceras orales, n (%)	1 (5,26)	0 (0)	-
Artralgia, n (%)	3 (15,78)	0 (0)	-
Diabetes tipo 2, n (%)	1 (5,26)	0 (0)	-

SSP, síndrome de Sjören primario; IMC, índice de masa corporal; LDL, lipoproteína-colesterol de baja densidad; HDL, lipoproteína-colesterol de alta densidad; ACR EULAR, Colegio Americano de Reumatología / Liga europea contra el reumatismo; ANA, anticuerpo antinuclear, ENA, antígeno nuclear extraíble; Ro/SSA, anticuerpos anti-Ro/autoanticuerpo A para síndrome de Sjörgren; La/SSB, anticuerpos anti-La/autoanticuerpo B para síndrome de Sjörgren; C3/C4, complemento C3/C4

## 2. Análisis de la diversidad de la microbiota intestinal en ambos grupos de estudio.

Se generaron un total de 2.473.675 lecturas de la región V2-V9 del gen de ADNr 16S a partir de las 38 muestras analizadas, con un promedio de 65.096,71 ( $\pm$  10.825,11 SD) lecturas para cada muestra, que van desde 630.489 a 2.582. Un total de 52.844,28 lecturas de alta calidad fueron obtenidas después de recortar y filtrar. En el proceso de agrupación de OTUs se obtuvieron un total de 6.473 OTUs y, después de la alineación de las secuencias representativas de los OTUs, se identificaron 2.582 OTUs con una abundancia relativa superior al 1% en al menos cuatro muestras (97% de corte de similitud). En el proceso de asignación taxonómica, estos OTUs se agruparon en 7 filos, 39 familias, 45 géneros y 53 especies utilizando QIIME2, con Greengenes v13.8 como base de datos de referencia para la clasificación y alineación de secuencias.

La gran mayoría de los métodos propuestos para evaluar la diversidad de especies se refieren a la diversidad dentro de las comunidades (diversidad Alfa). La diversidad Alfa muestra la riqueza de poblaciones dentro de una comunidad homogénea.

Para obtener parámetros completos de la diversidad de especies en un hábitat, es recomendable cuantificar el número de especies y su representatividad. La principal ventaja de los índices es que resumen mucha información en un solo valor y nos permiten hacer comparaciones rápidas y sujetas a comprobación estadísticas entre la diversidad de distintos hábitats o la diversidad de un mismo hábitat a través del tiempo (Moreno *et al.*, 2001).

El **índice de Shannon** es un índice que busca medir la diversidad de especies, considerando la uniformidad de las mismas. Es una aplicación de la teoría de la información, y se basa en la idea de que la mayor diversidad corresponde a una mayor incertidumbre en elegir de manera aleatoria a una especie en específico. En otras palabras, el índice formula la uniformidad de los valores de importancia por medio de todas las especies de la muestra.

Puede tomar los siguientes valores mínimos y máximos: el cero indica que solo hay una especie, mientras que el logaritmo de S (número total de especies en la muestra) significa que todas las especies están representadas por el mismo número de individuos.

El **índice Chao 1** es un estimador del número de especies en una comunidad basado en el número de especies raras en la muestra. Siendo S el número de especies en una muestra, "a" es el número de especies representadas solo por un único individuo en esa muestra y "b" el número de especies representadas por exactamente dos individuos en la muestra (Chao 1984). Este índice nos permite comparar la riqueza observada y la riqueza estimada, y así determinar cuántas especies faltan por registrar en esa comunidad.

$$Chao\ 1 = S + \frac{a^2}{2b}$$

El **índice de Simpson** es el número equivalente de especies igualmente comunes de una comunidad (que también se ha llamado número efectivo de especies, y es una medida correcta de su diversidad (Moreno, 2001)

$$\sum_{i=1}^S p_i^q$$

Donde  $P_i$  es la abundancia relativa de la especie, S= número de especies (la riqueza de especies),  $i$ = abundancia de la especie  $i$ ,  $q$ = es el orden de la diversidad,  $P_i$  es la abundancia relativa de la especie  $i$ , es decir, la abundancia de la especie  $i$  dividida entre la suma total de abundancias de las S especies que integran la comunidad y el exponente  $q$  es el orden de la diversidad.

El **índice ACE** (*abundance coverage estimator*) divide las especies presentes en una muestra en abundantes ( $r_{abun}$ : cuando tienen más de  $k$  individuos en la muestra) y raras ( $r_{rara}$ : aquellas con  $k$  o menos individuos). La estimación del número de especies ausentes, utilizado para corregir el sesgo, se basa enteramente en las especies consideradas raras, ya que las abundantes serán observadas en toda muestra (Chao y Shen, 2003). El estimador propuesto es

$$ACE = r_{abun} + \frac{r_{rara}}{\hat{C}_{rara}} + \frac{f_1}{\hat{C}_{rara}} \hat{\gamma}^2$$

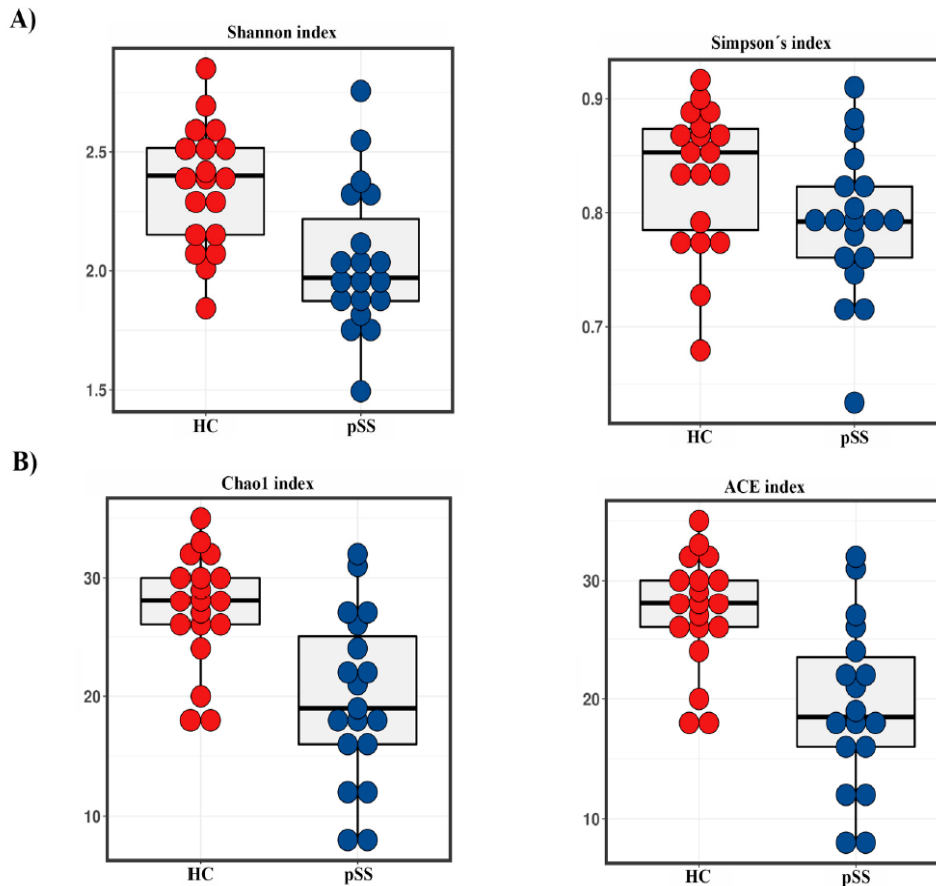
$$, \quad \hat{C}_{rara} = 1 - \frac{f_1}{\sum_{k=1}^{10} kf_k}$$

Siendo el estimador de la 'cobertura muestral' y

$$\hat{\gamma}^2 = \max \left[ \frac{r_{rara} \sum_{k=1}^{10} k(k-1)f_k}{\hat{C}_{rara} \left( \sum_{k=1}^{10} kf_k \right) \left( \sum_{k=1}^{10} kf_k - 1 \right)} - 1, 0 \right]$$

el coeficiente de variación de la abundancia de las especies. Este estimador requiere la selección *a priori* de  $k$ , y no está definido para aquellos casos en que todas las especies raras tienen un solo individuo. Chao y Shen (2003) han sugerido fijar  $k=10$  sobre base empírica.

Para comparar la diversidad Alfa (riqueza de especies bacterianas que hay en una muestra determinada), se calcularon los índices Chao1, ACE, Shannon y Simpson después de una rarefacción de las muestras a 1.731 secuencias, el tamaño de la muestra más pequeña para obtener la misma profundidad de secuenciación. Después del análisis, encontramos una disminución significativa en la riqueza (Chao1 y ACE) y la diversidad (Shannon y Simpson) en pacientes con SSP en comparación con controles sanos (Chao1  $p < 0,001$ , ACE  $p < 0,001$ , Shannon  $p = 0,0017$  y Simpson  $p = 0,05$ ) (**Figura 17 A y B**).



**Figura 17.** Comparación de la diversidad alfa entre pacientes con SSP y controles sanos. (A) Índices de diversidad de Shannon y Simpson; (B) Índices de riqueza Chao1 y ACE.

La diversidad Beta es el grado de reemplazo de especies a través de gradientes ambientales. La diversidad Beta es una dimensión que está basada en proporciones o diferencias. Estas proporciones pueden evaluarse con base en índices o coeficientes de similitud, de disimilitud i de distancia entre las muestras a partir de datos cualitativos (presencia-ausencia de especies) o cuantitativos (abundancia proporcional de cada especie medida con número de individuos, biomasa, densidad, cobertura, etc.), o bien con índices de diversidad Beta propiamente dichos (Moreno *et al.*, 2001).

Los coeficientes de similitud o disimilitud expresan el grado en que dos muestras son semejantes por las especies presentes en ellas, por lo que son una medida inversa de la diversidad beta, que se refiere al cambio de especies entre dos muestras (Moreno *et al.*, 2001). Sin embargo a partir de un valor de similitud (s) se puede calcular fácilmente la disimilitud (d) entre las muestras:  $d=1-s$ . Estos índices pueden obtenerse con base en



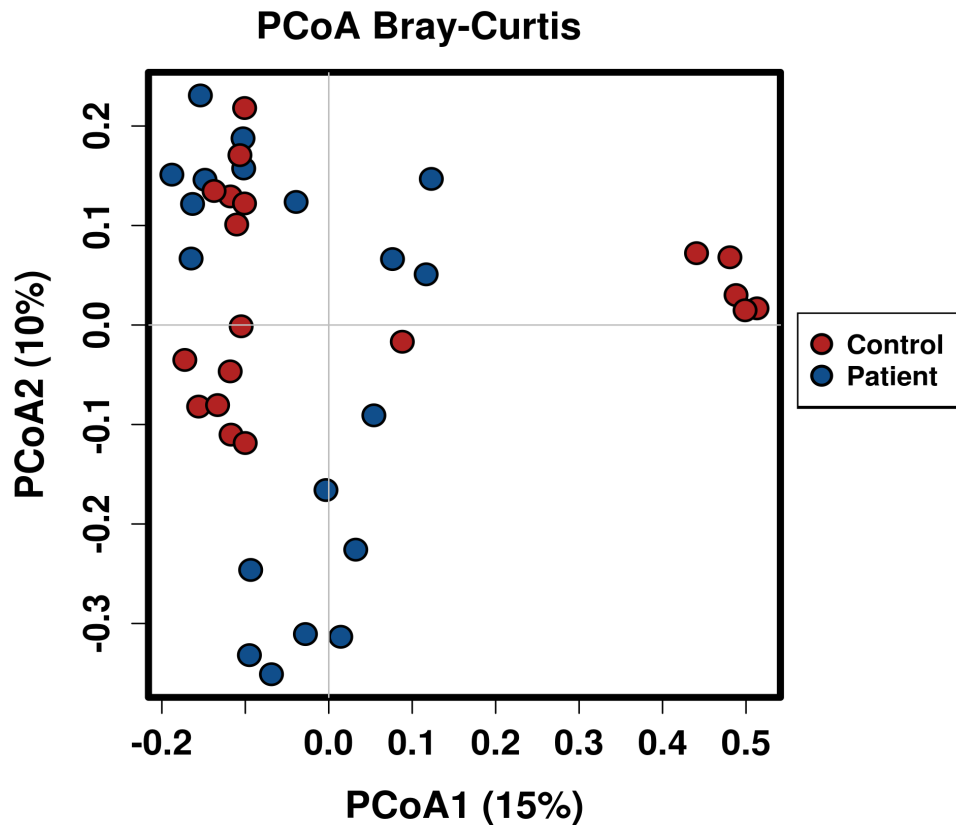
datos cualitativos o cuantitativos directamente o a través de métodos de ordenación o clasificación de las comunidades.

En ecología, uno de los índices de disimilitud más utilizados es el de Bray-Curtis, éste es el opuesto del porcentaje de similitud, que a su vez es la versión de abundancia del índice de Sorensen. Este índice es calculado como:

$$BC_d = \frac{\sum |x_i - x_j|}{\sum (x_i + x_j)}$$

La distancia Bray-Curtis se refiere a la diferencia total en la abundancia de especies entre dos sitios, dividido para la abundancia total en cada sitio. La distancia Bray-Curtis tiende a resultar más intuitiva debido a que las especies comunes y raras tienen pesos relativamente similares, mientras que la distancia euclidiana depende en mayor medida de las especies más abundantes. Esto sucede porque las distancias euclidianas se basan en diferencias al cuadrado, mientras que Bray-Curtis utiliza diferencias absolutas. El elevar un número al cuadrado siempre amplifica la importancia de los valores más grandes.

La diversidad beta (diferencias entre comunidades) se evaluó mediante la métrica del índice de disimilitud de Bray-Curtis a nivel de género, el cual mostró cambios significativos en la distribución y estructura de la comunidad entre los grupos de estudio tras el Análisis de Componentes Principales (PCoA) ( $p = 0,007$ , ANOSIM). Como se muestra en la **Figura 18**, se pudo observar una separación significativa en el patrón de agrupamiento entre SSP y controles sanos a partir de las coordenadas PC1 y PC2 que representaron el 10% y el 12,7% de las variaciones totales.

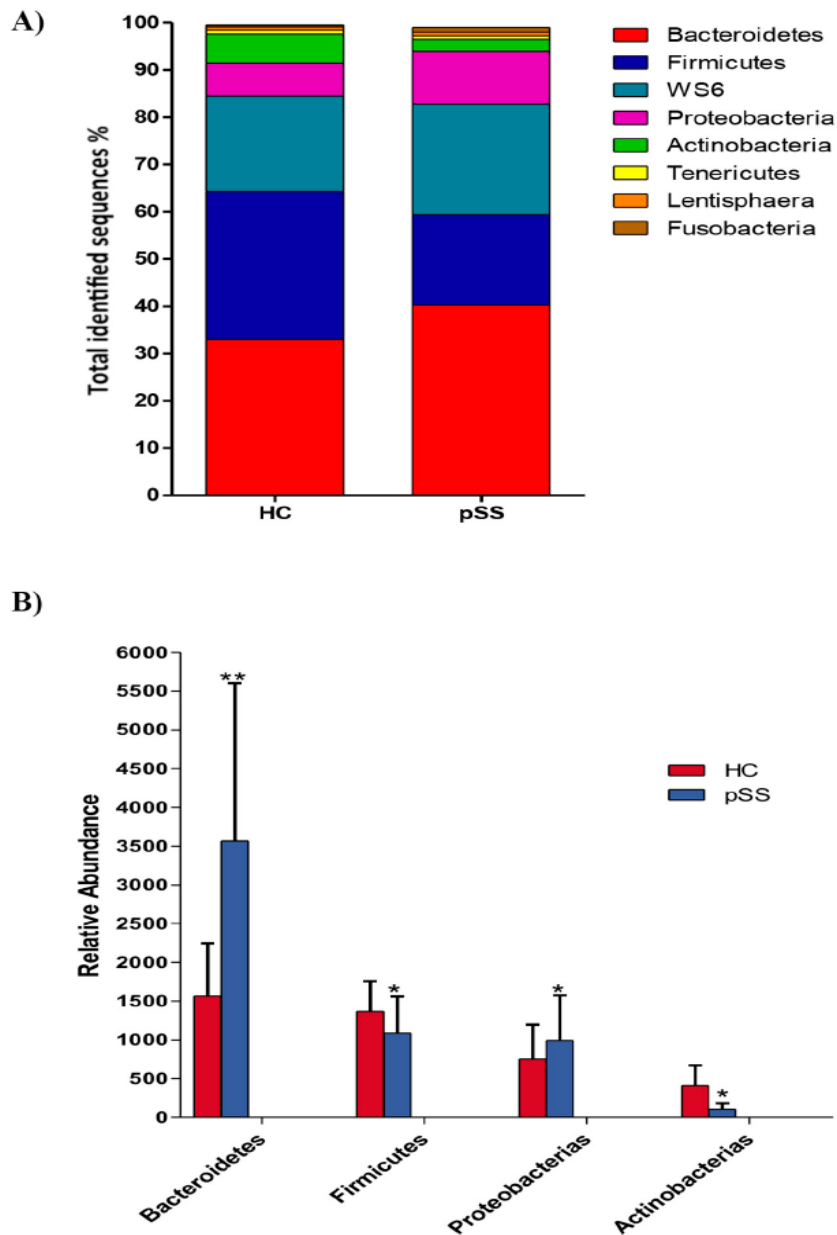


**Figura 18.** Análisis de componentes principales (PCoA) de las comunidades bacterianas de pacientes con SSP y controles sanos mediante el índice de disimilitud de Bray-Curtis a nivel de género. Puntos azules (pacientes con SSP) y puntos rojos (controles sanos).

### 3. Análisis comparativo de la composición microbiana intestinal de pacientes con SSP y controles sanos

Se encontraron diferencias en la composición de la microbiota intestinal a nivel de filo, familia, género y especie entre ambos grupos de estudio. A nivel de filo se encontró un microbioma predominantemente compuesto por Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, WS6 y Actinobacteria (90% de las secuencias) en las muestras fecales de ambos grupos de estudio. El resto de la población bacteriana correspondió a otros filos (Tenericutes, Fusobacterium y Lentisphaerae), que tuvieron una abundancia relativa inferior al 1% en los dos grupos de estudio. Concretamente, encontramos un aumento significativo en Bacteroidetes (40,24% SSP vs 33,05% HC,  $p < 0,001$ , valor  $q < 0,001$ ) y Proteobacterias (11,22% SSP vs 6,98% HC,  $p = 0,0020$ , valor  $q = 0,017$ ) en los pacientes con SSP en comparación con los controles sanos. Mientras que la abundancia de Firmicutes (20,12% SSP vs 31,22% HC,  $p = 0,0021$ , valor  $q = 0,02$ ) y Actinobacteria (2,54%

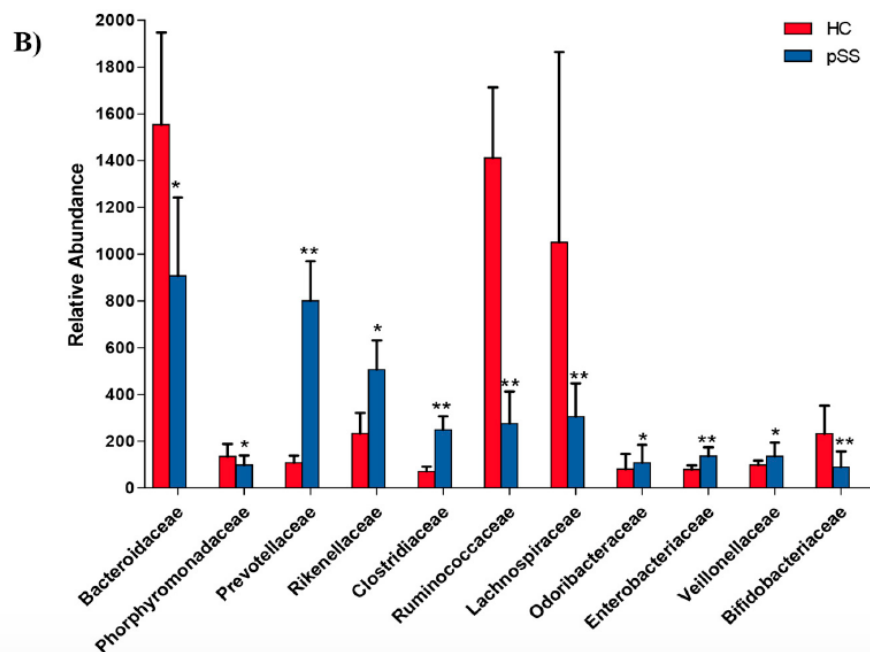
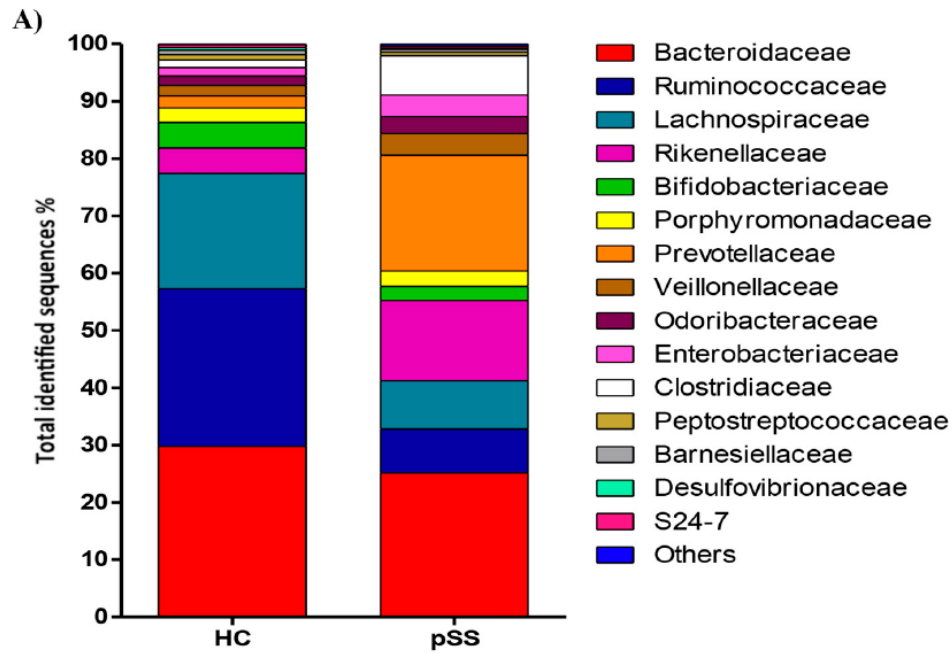
SSP vs 6,12% HC,  $p = 0,012$ , valor  $q = 0,048$ ) estuvieron enriquecidos significativamente en controles sanos en comparación con pacientes con SSP (Figura 19 A y B).



**Figura 19.** Composición de la microbiota fecal a nivel de filo en los pacientes con síndrome de Sjögren primario (SSP) y controles sanos (HC). (A) Los datos se muestran como un porcentaje del total de secuencias identificadas por grupo. (B) Filos diferenciadamente abundantes en las muestras de heces de pacientes con SSP en comparación con los controles HC \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,001$ . Las barras indican la desviación estándar media (DE).

De las 39 familias identificadas, 10 mostraron diferencias significativas en su abundancia entre pacientes con SSP y controles sanos. Dentro del filo Firmicutes, dos familias Clostridiaceae (6,87% SSP vs 1,34% HC,  $p < 0,001$ , valor  $q = < 0,001$ ) y

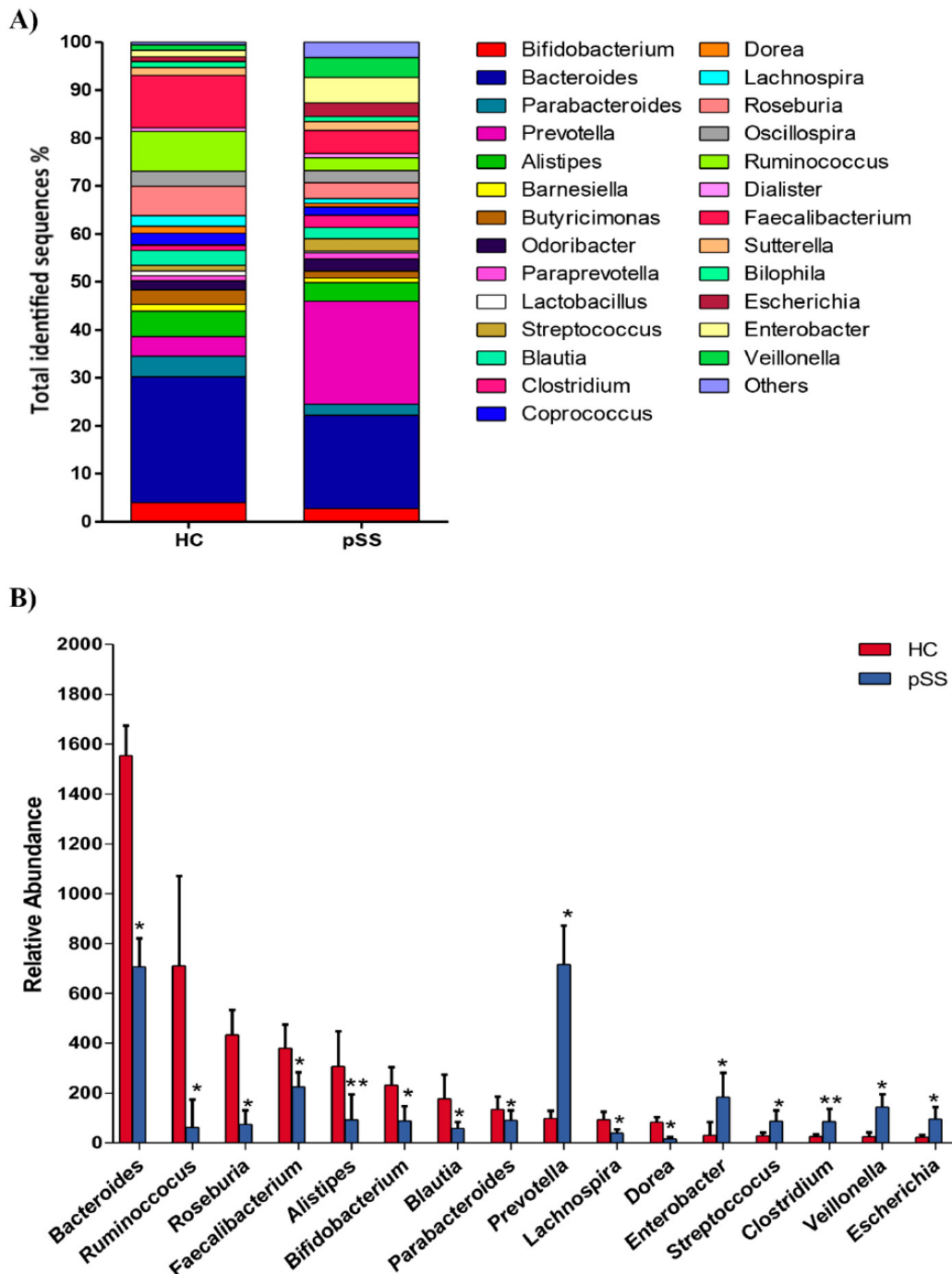
Veillonellaceae (3,75% SSP vs 1,86% HC,  $p = 0.0032$ ,  $q\text{-value} = 0.02$ ) fueron significativamente más altas en los pacientes con SSP en comparación con los controles sanos. Por otro lado, la abundancia de Ruminococcaceae (7.65% SSP vs 27.53% HC,  $p < 0.001$ ,  $q\text{-value} = 0.002$ ) y Lachnospiraceae (8.44% SSP vs 20.10% HC,  $p < 0,001$ ,  $q = 0,001$ ) se redujeron significativamente en SSP frente a controles sanos. Dentro del filo Bacteroidetes, tres familias diferentes fueron significativamente más altas en SSP en comparación con controles sanos: Prevotellaceae (20.18% SSP vs 2.05% HC,  $p < 0.001$ ,  $q < 0.001$ ), Rikenellaceae (14.03% SSP versus 4.44% HC,  $p = 0.013$ ,  $q\text{-valor} = 0,05$ ) y Odoribacteraceae (2,96% SSP vs 1,60% HC,  $p = 0,009$ ,  $q = 0,046$ ). Por el contrario, Bacteroidaceae (25,12% SSP vs 29,79% HC,  $p = 0,011$ ,  $q = 0,046$ ) y Porphyromonadaceae (2,72% SSP vs 2,57% HC,  $p = 0,0021$ ,  $q = 0,017$ ) fueron significativamente más bajas en SSP que en controles sanos. Dentro de las Actinobacteria, se encontró una disminución significativa de Bifidobacteriaceae (2,45% SSP frente a 4,43% HC,  $p < 0,001$ ,  $q < 0,001$ ) en pacientes con SSP en comparación con controles sanos (**Figura 20**). Mientras que en el filo Proteobacteria, hubo un aumento singular en la abundancia de Enterobacteriaceae (3.77% SSP vs 1.50% HC,  $p < 0.001$ ,  $q = 0.001$ ) en pacientes SSP.



**Figura 20.** Clasificación microbiana a nivel de familias en muestras de heces de pacientes con síndrome de Sjögren primario (PSS) y controles sanos (HC). (A) Los datos se muestran como un porcentaje del total de secuencias identificadas por grupo. (B) Familias diferenciadamente abundantes en las muestras de heces de pacientes con SSP en comparación con HC. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,001$ . Las barras indican la desviación estándar media (DE).

Un total de 15 géneros mostraron cambios significativos en su composición en SSP en comparación con los controles sanos. En los pacientes con SSP encontramos un aumento significativo en la abundancia de *Prevotella* (21,43% SSp vs 4,14% HC,  $p = 0,0017$ , valor  $q = 0,014$ ), *Escherichia* (2,78% SSp vs 1,05% HC  $p = 0,011$ , valor  $q = 0.046$ ),

*Clostridium* (2.48% SSP vs 1.11% HC,  $p < 0.001$ , valor  $q = 0.007$ ), *Enterobacter* (5.34% SSP vs 1.30% HC,  $p = 0.0034$ , valor  $q = 0.02$ ), *Veillonella* (4.16% SSP vs 1.12% HC,  $p = 0.0043$ ,  $q$ -value = 0.022) y *Streptococcus* (2.54% SSP vs 1.20% HC,  $p = 0.0043$ ,  $q$ -value = 0.022), acompañados de una disminución significativa de los géneros *Bacteroides* (19.47% SSP vs 26,20% HC,  $p = 0,0017$ , valor  $q = 0,014$ ), *Alistipes* (3,89% SSP vs 5,33% HC,  $p < 0,001$ , valor  $q = 0,006$ ), *Dorea* (0,69% SSP vs 1,45% HC,  $p = 0,008$ , valor  $q = 0.038$ ), *Parabacteroides* (2.33% SSP vs 4.25% HC,  $p = 0.012$ ,  $Q = 0.046$ ), *Blautia* (2.43% SSP vs 3.08% HC,  $p = 0.0033$ , valor  $q = 0.02$ ), *Lachnospira* ( 1,05% SSP vs 2,19% HC,  $p = 0,013$ , valor  $q = 0,05$ ), *Roseburia* (3,29% SSP vs 6,10% HC,  $p = 0,013$ , valor  $q = 0,05$ ), *Faecalibacterium* (4,77% SSP vs 10,97% HC,  $p = 0,0023$ , valor  $q = 0,02$ ), *Ruminococcus* (2,61% SSP frente a 8,34% de HC,  $p = 0,0013$ ,  $p = 0,0013$ , valor  $q = 0,012$ ) y *Bifidobacterium* (2,72% SSP frente a 4,02% de HC,  $p = 0,012$ , valor  $q = 0,046$ ) (**Figura 21**).



**Figura 21.** Abundancia relativa de generos dentro de la microbiota intestinal de pacientes con síndrome de Sjögren primario (SSp) y controles sanos. Los datos se muestran como un porcentaje del total identificado de secuencias por grupo. (B) Géneros diferencialmente abundantes en las muestras de heces de SSP y HC. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,001$ . Las barras indican la media  $\pm$  desviación estándar (DE)

A niveles de especie, hemos observado en el grupo SSP un aumento significativo en *Clostridium clostridioforme* (3,05% SSP vs 2,33% HC,  $p = 0,0037$ , valor  $q = 0,02$ ), *Escherichia coli* (4,12% SSP vs 1,45% HC,  $p = 0,0037$ , valor  $q = 0,02$ ) y *Prevotella copri* (6,78% SSP vs 2,18% HC,  $p < 0,001$ , valor  $q = 0,001$ ) y una disminución significativa de

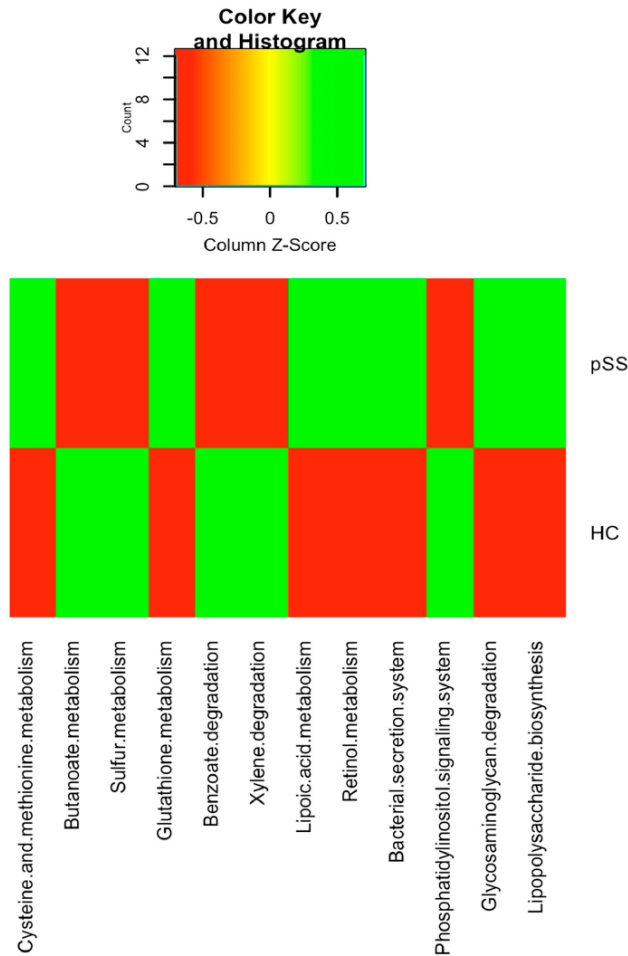
*Bacteroides fragilis* (7,47% SSP vs 13,88% HC,  $p = 0,003$ , valor  $q = 0,0096$ ), *Parabacteroides dictasonic* (2,16% SSP vs 7,37% HC,  $p = 0,0032$ , valor  $q = 0,027$ ), *Dorea longicatena* (6,97% SSP vs 4,77% HC,  $p = 0,0045$ , valor  $q = 0,035$ ), *Ruminococcus lactaris* (2,34% SSP vs 5,23% HC,  $p = 0,005$ , valor  $q = 0,047$ ) y *Faecalibacterium prausnitzii* (1,47% SSP vs 6,72% HC,  $p = 0,0019$ , valor  $q = 0,02$ ).

#### 4. Discrepancia funcional de la microbiota intestinal entre pacientes con SSP e individuos sanos

El KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto) es una colección de bases de datos on line de genomas, rutas enzimáticas y químicos biológicos utilizada desde hace décadas para el estudio biológico de diferentes sistemas.

El análisis de enriquecimiento de la vía KEGG de los datos metagenómicos muestra que los genes para el metabolismo energético, como el metabolismo del azufre (valor  $q = 0,022$ ), el metabolismo de los carbohidratos como el metabolismo del butanoato (valor  $q = 0,019$ ), el metabolismo de otros aminoácidos como el glutathione (valor  $q = 0,026$ ), el mecanismo de transducción de señales como el sistema de señalización de fosfatidilinositol (valor  $q = 0,024$ ), las vías de biodegradación y metabolismo de xenobióticos, incluida la degradación del benzoato (valor  $q = 0,038$ ) y la degradación del xileno (valor  $q = 0,04$ ) se redujeron significativamente en los pacientes con SSP en comparación con los sujetos control sanos. No obstante, en los pacientes con SSP en comparación con los controles sanos, hubo una sobrerrepresentación significativa de los genes implicados en las vías del metabolismo de los aminoácidos como el metabolismo de la cisteína y la metionina (valor  $q = 0,029$ ), así como en los genes implicados en el transporte de membrana, la secreción bacteriana (valor  $q = 0,045$ ), el metabolismo de cofactores y vitaminas como el metabolismo del ácido lipoico (valor  $q = 0,035$ ) y el metabolismo del retinol (valor  $q = 0,027$ ) y la biosíntesis y metabolismo de glicanos como la biosíntesis de lipopolisacáridos (valor  $q = 0,018$ ) y en la degradación de glucosaminoglicanos (valor  $q = 0,023$ ) (Figura 22).





**Figura 22.** Mapa de calor basado en las predicciones funcionales de los genes bacterianos a partir de muestras fecales de pacientes con síndrome de Sjögren primario (SSP) y controles sanos (HC).

### 5. Diferencias en los niveles séricos de mediadores inflamatorios, zonulina y la expresión relativa de FOXP3 en pacientes con SSP en comparación con controles sanos.

Los niveles circulantes de zonulina fueron significativamente más altos en los pacientes con SSP que en los controles sanos ( $82,26 \pm 12,65$  ng / ml de SSP frente a  $35,89 \pm 8,94$  ng / ml de HC,  $P < 0,001$ ).

Además, los pacientes con SSP tuvieron niveles más altos de las citoquinas proinflamatorias IL-6 ( $199,78 \pm 62,91$  pg / ml de SSP frente a  $82,63 \pm 18,86$  pg / ml de HC,  $p < 0,001$ ), IL-17 ( $5,77 \pm 1,79$  pg / ml de SSP frente a  $1,96 \pm 0,61$  pg / ml HC,  $p < 0,001$ ), IL-12 ( $65,38 \pm 15,95$  pg / ml SSP frente a  $27,64 \pm 10,47$  pg / ml HC,  $p < 0,001$ ) y TNF-alfa ( $341,72 \pm 52,75$  pg / ml SSP frente a  $147,48 \pm 22,15$  pg / ml de HC,  $p < 0,001$ ) que los controles sanos. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los niveles

séricos de IFN $\gamma$  entre ambos grupos de estudio ( $2,36 \pm 0,95$  pg / ml SSP vs  $1,91 \pm 0,44$  pg / ml HC,  $p = 0,069$ ). Con respecto a la citokina IL-10 ( $85,86 \pm 26,36$  pg / ml SSP vs  $139,89 \pm 41,72$  pg / ml HC,  $p < 0,001$ ), se encontró una depleción significativa en los pacientes SSP con respecto a los controles sanos. Finalmente, la expresión relativa de ARNm de FOXP3 fue significativamente menor en pacientes con SSP en comparación con controles sanos ( $0,31 \pm 0,11$  SSP frente a  $1,31 \pm 0,23$  HC,  $p < 0,001$ ).

#### **6. Asociación de la microbiota intestinal con los niveles séricos de mediadores inflamatorios, zonulina y la expresión relativa de FOXP3 en pacientes con SSP.**

Se realizaron análisis de correlación entre la composición taxonómica microbiana de ambos grupos de estudio a diferentes niveles taxonómicos y los niveles séricos de las citoquinas ensayadas, de la zonulina y de la expresión de ARNm de FOXP3 (**Tabla 6** y

**Tabla 7).**

**Tabla 6.-** Correlaciones entre la composición de la microbiota intestinal y los niveles séricos de IL-6, IL-12 e IL-17 en pacientes con síndrome de Sjögren primario (SSP) y controles sanos.

	SSP	Controles Sanos	SSP	Controles Sanos	SSP	Controles Sanos
	IL-6		IL-12		IL-17	
<i>Butyriromonas</i>	-0.598 ( $p = 0.030$ )					
<i>Roseburia</i>	-0.718 ( $p = 0.010$ )		-0.767 ( $p = 0.020$ )		-0.511 ( $p = 0.045$ )	-0.675 ( $p = 0.047$ )
<i>Ruminococcus</i>	-0.527 ( $p = 0.020$ )	-0.533 ( $p = 0.029$ )			-0.631 ( $p = 0.025$ )	
<i>Blautia</i>	-0.635 ( $p = 0.007$ )					
<i>Enterobacter</i>			0.873 ( $p = 0.008$ )		0.549 ( $p = 0.039$ )	
<i>Streptococcus</i>			0.466 ( $p = 0.044$ )			
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>		-0.587 ( $p = 0.028$ )	-0.508 ( $p = 0.027$ )	-0.550 ( $p = 0.025$ )		
<i>Escherichia coli</i>	0.723 ( $p = 0.009$ )					
<i>Bifidobacterium</i>		-0.573 ( $p = 0.030$ )	-0.508 ( $p = 0.018$ )	-0.507 ( $p = 0.027$ )	-0.789 ( $p = 0.002$ )	-0.459 ( $p = 0.041$ )
<i>Bacteroides fragilis</i>					-0.473 ( $p = 0.041$ )	
<i>Parabacteroides distasonis</i>		-0.767 ( $p = 0.004$ )				
<i>Lachnospira</i>			-0.514 ( $p = 0.014$ )			
<i>Prevotella</i>	0.465 ( $p = 0.045$ )					
<i>Clostridium</i>	0.462 ( $p = 0.046$ )				0.412 ( $p = 0.043$ )	

**Tabla 7.-** Correlaciones entre la composición de la microbiota intestinal y los niveles séricos de TNF-alfa, IL-10, zonulina y la expresión de ARNm de FOXP3 en los grupos de estudio.

	SSP	Sujetos sanos	SSP	Sujetos sanos	SSP	Sujetos sanos	SSP	Sujetos sanos
	TNF-alpha		IL-10		Zonulina		Expresion FOXP3 mRNA	
<i>Ruminococcus</i>		-0.496 (P=0.031)	0.563 (P=0.035)	0.494 (P=0.032)	-0.496 (P=0.031)	-0.665(P=0.005)		0.573(P=0.034)
<i>Butyriromonas</i>	-0.560 (P=0.033)		0.525 (P=0.021)			-0.542 (P=0.027)	0.598(P=0.043)	
<i>Blautia</i>			0.516 (P=0.024)	0.576 (P=0.005)				
<i>Roseburia</i>					-0.458 (P=0.048)			0.501(P=0.042)
<i>Prevotella copri</i>					0.645(P=0.003)			
<i>Clostridium</i>	0.550 (P=0.025)		-0.651 (P=0.033)					
<i>Bifidobacterium</i>	-0.580 (P=0.009)				-0.631(P=0.010)	-0.584(P=0.017)		
<i>Bacteroides fragilis</i>	-0.567(P=0.041)						0.631(P=0.002)	0.563(P=0.009)
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>			0.651(P=0.010)	0.597 (P=0.025)		-0.502(P=0.029)		
<i>Parabacteroides dictysonis</i>		-0.559 (P=0.009)				-0.700(P=0.035)		

Finalmente, el análisis de regresión lineal mostró que los niveles séricos de zonulina tuvieron una relación positiva y significativa con la abundancia de *Prevotella copri* ( $R^2 = 0,752$  B = 0,520 p = 0,017) y una relación negativa y significativa con la abundancia de *Bifidobacterium* ( $R^2 = 0,752$  B = -1,041 p <0,001) en los pacientes con SSP. En los controles sanos, el nivel de zonulina se asoció negativamente a *Ruminococcus* ( $R^2 = 0,752$  B = -0,411 p = 0,005) y *Bifidobacterium* ( $R^2 = 0,752$  B = -1,182 p <0,001).

De la misma forma, en los pacientes con SSP el análisis de regresión mostró una asociación negativa entre los niveles de las citoquinas proinflamatorias IL-17 y TNF-alfa y la abundancia de *Bifidobacterium* ( $R^2 = 0,742$  B = -1,289 p <0,001 y  $R^2 = 0,697$  B = -0,580 p <0,001, respectivamente) y *Ruminococcus* ( $R^2 = 0,742$  B = -0,815 p <0,001) solo para IL-17; mientras que los niveles de IL-12 se asociaron negativamente a la abundancia de *Lachnospira* ( $R^2 = 0,897$  B = -0,601 p <0,001), *Roseburia* ( $R^2 = 0,897$  B = -0,641 p <0,001) y *Bifidobacterium* ( $R^2 = 0,897$  B = -0,715 p <0,001) y positivamente a la abundancia de *Enterobacter* ( $R^2 = 0,897$  B = 0,562 p <0,001). Con respecto a los niveles de IL-6 en SSP encontramos una asociación negativa con *Blautia* ( $R^2 = 0,835$  B = -0,132 p = 0,022) y *Roseburia* ( $R^2 = 0,835$  B = -0,785 p = 0,001) y una asociación positiva con *Escherichia coli* ( $R^2 = 0,835$  B = 0,678 p <0,001). En los controles sanos, solo se encontró una asociación negativa significativa entre los niveles de las citoquinas proinflamatorias IL-6 y TNF-alfa y la abundancia de *Parabacteroides dictasonic* ( $R^2 = 0,948$  B = 1,139 p <0,001 y  $R^2 = 0,570$  B = 0,570 p = 0,011, respectivamente)

Por otro lado, tanto en SSP como en controles sanos, la citoquina IL-10 reveló tener una fuerte asociación positiva con la abundancia de *Faecalibacterium prauznizii* ( $R^2 = 0,325$  B = 0,570 p = 0,011;  $R^2 = 0,494$  B = 1,337 p <0,001, respectivamente) y *Ruminococcus* ( $R^2 = 0,325$  B = 0,259 p = 0,029;  $R^2 = 0,494$  B = 0,259 p = 0,029, respectivamente). Finalmente, la expresión de ARNm de FOXP3 se asoció positivamente con la abundancia de *Bacteroides fragilis* en los pacientes SSP ( $R^2 = 0,547$  B = 0,548 p = 0,029) y controles sanos ( $R^2 = 0,547$  B = 0,670 p = 0,016).

## DISCUSIÓN

---

Este estudio ha demostrado que los pacientes con SSP muestran una disbiosis intestinal asociada a un aumento en los niveles séricos de citoquinas proinflamatorias como IL-6, IL-12, IL-17 y TNF-alfa (inflamación sistémica) y de zonulina (permeabilidad intestinal) lo que conduce a una mayor exposición microbiana sistémica. Los pacientes con SSP incluidos en nuestro estudio fueron de la misma zona geográfica y tenían un IMC, sexo, edad y origen étnico igual al de los controles sanos para evitar la influencia de estos factores de confusión sobre el análisis de la microbiota intestinal.

La diversidad de la microbiota es esencial para mantener la estabilidad y la eficiencia del ecosistema intestinal. Respecto a la alfa diversidad, los pacientes con SSP mostraron una menor diversidad y riqueza en la microbiota intestinal que los con los controles sanos. Van der Meulen *et al.*, (2019) también encontraron una riqueza significativamente menor en la composición de la microbiota intestinal, pero no encontraron cambios significativos en la diversidad entre los pacientes con SSP y los controles sanos (Van der Meulen TA. *et al.*, 2019). Una diversidad reducida puede favorecer la aparición de bacterias patógenas capaces de alterar la barrera intestinal y estimular la producción de mediadores inflamatorios de las células epiteliales de la mucosa en la lámina propia intestinal y en los ganglios linfáticos mesentéricos (De Paiva *et al.*, 2016). Además, se ha descrito que los sujetos con una riqueza de microbiota intestinal disminuida tienen mayor número de marcadores inflamatorios en sangre (Le Chatelier *et al.*, 2013). Estos datos podrían sugerir un vínculo entre la menor diversidad y riqueza bacteriana y la mayor inflamación sistémica y permeabilidad intestinal encontrada en nuestros pacientes con SSP. Además, el Análisis de componentes Principales de Bray-Curtis para determinar la diversidad beta mostró que los pacientes con SSP se agruparon en un cluster separado con respecto a los controles sanos, lo que sugiere la presencia de cambios microbianos significativos mediados por la enfermedad.

Cuando analizamos la abundancia relativa de los diferentes taxones bacterianos presentes en las muestras de heces de los pacientes con SSP y los controles sanos, encontramos grandes diferencias significativas a nivel de filo, familia, género y especie. A nivel de género, la disbiosis intestinal mostró un aumento en la abundancia de patógenos

oportunistas y degradadores de mucina como *Prevotella*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Escherichia* y *Streptococcus* y un agotamiento en la abundancia relativa de *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Faecalibacterium*, *Roseburia*, *Ruminococcus*, *Dorea*, *Alistipes*, *Blautia* y *Bifidobacterium*. Nuestros hallazgos han demostrado similitudes y diferencias en comparación con datos publicados previamente en pacientes con SS. De Paiva y col. También mostraron que las muestras fecales de los pacientes con SS tenían una reducción de los géneros *Bacteroides*, *Parabacteroides* y *Faecalibacterium* y un aumento de *Escherichia* y de *Streptococcus* en comparación con los controles sanos. Sin embargo, a diferencia de nuestro estudio, estos autores describieron una disminución de la abundancia de *Prevotella* en el intestino de los pacientes con SS (De Paiva *et al.*, 2016). De forma similar a nuestros datos, en un estudio muy reciente, Méndez y cols., encontraron una disminución en la abundancia relativa de *Faecalibacterium* y *Bacteroides* y un aumento en la abundancia relativa de *Prevotella* en pacientes con SS (Mendez *et al.*, 2020). *Prevotella* es un género crucial en la aparición de otros, trastornos inflamatorios crónicos como la artritis reumatoide (Sher *et al.*, 2013). Sher y col. identificaron una fuerte asociación entre *Prevotella copri* y la presencia de artritis reumatoide no tratada de nueva aparición. Además, la mayor abundancia de *Prevotella* en estos pacientes se asoció con una reducción en la abundancia de varios microbios beneficiosos, incluyendo *Bacteroides* (Sher J. *et al.*, 2013). *Bacteroides* spp. y los grupos de Clostridia XIVa y IV (bacterias productoras de butirato) han demostrado ser necesarias para mantener el equilibrio entre las células T reguladoras antiinflamatorias (Treg) y las células Th17 proinflamatorias, que protegen la mucosa de la colonización de microorganismos patógenos (Omenetti S. *et al.*, 2015). Por lo tanto, la reducción encontrada en nuestro estudio tanto en la abundancia de las bacterias productoras de butirato como en el género *Bacteroides* podría afectar el equilibrio entre las células Th17 y Treg en los pacientes con SSP, contribuyendo a la autoinmunidad.

En otro estudio reciente, Moon y cols. demostraron que los pacientes con SS en comparación con los controles sanos mostraron un aumento en los niveles de Bacteroidetes y una relación Firmicutes / Bacteroidetes disminuida, mientras que la abundancia de Actinobacteria (*Bifidobacterium*) y Clostridia (*Blautia*, *Dorea* y *Agathobacter*) disminuyeron significativamente (Moon J.*et al.*, 2020).



La disminución en la abundancia de *Bifidobacterium* encontrada en los pacientes con SSP de nuestro estudio y de otros estudios previos, también han sido descritos en otros estados inflamatorios crónicos como la artritis reumatoide y la Enfermedad de Crohn (Zhong D. *et al.*, 2018, Favier C. *et al.*, 1997). Además, Mandl y cols., indicaron que los pacientes con SS con disbiosis severa y niveles reducidos de *Bifidobacterium* y *Alistipes* podrían tener una mayor actividad de la enfermedad, niveles más bajos del complemento y niveles más altos de calprotectina fecal (Mandl T. *et al.*, 2017). Las posibles causas de las diferencias en la composición de la microbiota intestinal encontradas entre los diferentes estudios podrían ser debidas a diferencias en los hábitos alimentarios, en la gravedad del SS, los medicamentos tomados por los pacientes en el periodo de estudio y el sesgo de edad o el sexo. De hecho, varios estudios han descrito la edad y el sexo como responsables de los cambios en la composición de la microbiota intestinal humana (Radjabzadeh *et al.*, 2020; De La Cuesta-Zuluaga *et al.*, 2019).

Por otro lado, esta disbiosis de la microbiota intestinal también afecta al desequilibrio de las células T helper 1 y T helper 17, a la polarización de Tregs, a el aumento de la permeabilidad de las células epiteliales intestinales y a la producción de ácidos grasos de cadena corta (Zhong D. *et al.*, 2018). En los pacientes con SSP, encontramos una asociación positiva y significativa entre la abundancia de *Prevotella copri* y los niveles séricos de zonulina. La zonulina es una proteína, sintetizada en las células intestinales y hepáticas, que modula reversiblemente la permeabilidad de la barrera epitelial intestinal, disminuyendo las uniones estrechas intercelulares (Fasano A. *et al.*, 2011, Sturgeon C. *et al.*, 2016). Wright y cols. encontraron que *Prevotella* contiene enzimas que son importantes en la degradación de la mucina, pudiendo alterar la barrera mucosa del colon y aumentar la permeabilidad intestinal (Su T. *et al.*, 2018). Esto permitiría la difusión de patógenos, toxinas y antígenos desde el entorno luminal hacia los tejidos mucosos y el sistema circulatorio (Turner JR. *et al.*, 2009), y generando así la activación inmune y la inflamación tisular, aspectos importantes en la aparición o progresión de enfermedades autoinmunes crónicas (Turner JR. *et al.*, 2009). Por el contrario, un estudio reciente en ratones inmunocompetentes ha sugerido que la alteración del microbioma intestinal generado por la colonización de *Prevotella* spp. disminuye los niveles de ácidos grasos de cadena corta, especialmente acetato, lo que

aumenta la inflamación intestinal tras el daño químico generado a la barrera intestinal (Iljazovic *et al.*, 2020). En consecuencia, el aumento significativo en la abundancia de *Prevotella* encontrado en nuestro estudio podría estar asociado con la disregulación inmunológica y el aumento de la inflamación intestinal en los pacientes con SSP.

En nuestro estudio, los pacientes con SSP tuvieron niveles significativamente más altos de citoquinas proinflamatorias como IL-17, IL-12, IL-6 y TNF-alfa, junto con una disminución significativa de los niveles de la citoquina antiinflamatoria IL-10 y de la expresión de ARNm de FOXP3 en comparación con los controles sanos. Además, las correlaciones significativas encontradas entre la microbiota intestinal y los niveles séricos de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias y la expresión de ARNm de FOXP3 del huésped, indican que la reducción significativa en la abundancia de *Roseburia*, *Blautia*, *Lachnospira*, *Ruminococcus*, *Bifidobacterium*, *Faecalibacterium prausnitzii* y *Bacteroides fragilis* capaces de ejercer efectos antiinflamatorios (a través de la producción de citoquinas) y de mejorar la función de la barrera intestinal (a través de la producción de butirato) (Sokol H. *et al.*, 2008, Tamanai-Shacoori Z. *et al.*, 2017), junto con el aumento significativo en la abundancia de *Enterobacter* y *Escherichia coli* (patógenos entéricos potenciales con capacidad proinflamatoria) podrían aumentar la permeabilidad intestinal y la inflamación de bajo grado en los pacientes con SSP.

El butirato (metabolito producido por la microbiota intestinal) es crucial ya que proporciona energía a las células epiteliales del colon para mantener las funciones de barrera intestinal. Además, el butirato actúa como una molécula antiinflamatoria, capaz de inhibir la activación de NF- $\kappa$ B en las células inmunes del huésped al unirse a los receptores acoplados a proteína G (GPR43 y GPR41), bloqueando así respuestas inflamatorias y generando la supresión de la liberación de TNF-alfa e IL-6 (Lewis K. *et al.*, 2010). El butirato también genera una modulación de la expresión de IL-17 (Masui R. *et al.*, 2013) y promueve la diferenciación de las células Treg, que en última instancia pueden suprimir las respuestas proinflamatorias (Singh N. *et al.*, 2014). Fernando y col. revelaron que el butirato disminuye la expresión de los niveles patológicos de IL-17 (Fernando MR. *et al.*, 2016).

Del mismo modo, Säemann *et al.* demostraron que el butirato es capaz de inhibir fuertemente la producción de las citoquinas proinflamatorias IL-12 y TNF-alfa por parte

de los monocitos, mientras que la citoquina antiinflamatoria IL-10 aumentó significativamente después de la estimulación bacteriana (Säemann MD. *et al.*, 2000). Finalmente, la activación de Tregs por el butirato no sólo inhibe las células T efectoras sino que también aumenta la producción de la citoquina antiinflamatoria IL-10 (Chen J *et al.*, 2020). El polisacárido A es una molécula inmunomoduladora derivada de los *Bacteroides fragilis* comensales que media la conversión de células T CD4 + en células Treg FOXP3 + que producen IL-10 durante la colonización del comensal, estimulando el desarrollo inmunológico del hospedador (Round J. *et al.*, 2010). Estos datos pueden indicar la posible asociación entre la disregulación inmunológica asociada con el butirato y las alteraciones en la función de barrera intestinal encontrada en los pacientes con SSP.

Nuestro estudio también ha explorado la funcionalidad de la microbiota intestinal. El análisis Picrust ha mostrado que las vías metabólicas bacterianas también son diferentes entre los pacientes con SSP y los controles sanos. El microbioma intestinal de los pacientes con SSP ha mostrado una depleción en los genes involucrados en funciones metabólicas como el metabolismo del butanoato y el metabolismo del glutatión, así como una sobrerrepresentación de genes necesarios para el metabolismo del ácido lipoico, metabolismo del retinol, biosíntesis de lipopolisacáridos y la degradación de glicosaminoglicanos. La disminución de los genes implicados en el metabolismo del butanoato en los pacientes con SSP podría deberse a la abundancia significativamente menor de las familias Ruminococcaceae (en particular *Faecalibacterium prausnitzii*) y Lachnospiraceae (especialmente *Roseburia* spp.), principales bacterias productoras de butirato pertenecientes al filo Firmicutes, a pesar de la presencia de una abundancia significativamente mayor en estos pacientes de otras bacterias potenciales productoras de butirato como *Clostridiaceae*, *Veillonellaceae* y *Prevotellaceae*. Estas tres últimas familias producen principalmente acetato, succinato y propionato, pero algunos sus miembros podrían promover la producción de butirato a través de la interconversión de acetato o succinato (Louis *et al.*, 2017; Esquivel-Elizondo *et al.*, 2017). La disminución de genes relacionados con la síntesis de butirato debido a una disminución de la abundancia de bacterias beneficiosas productoras de butirato puede predisponer a un aumento de la permeabilidad intestinal asociada a condiciones autoinmunes en el hospedador (de Oliveira. *et al.*, 2017). En pacientes con LES, la falta de glutatión se ha asociado con

diversas anomalías inmunitarias, incluida la disregulación de la apoptosis y la producción anormal de citoquinas y quimiocinas (Shah D, *et al.*, 2013). Por otra parte, las bacterias patógenas pueden implementar estrategias básicas de lipoilación, que pueden afectar a su patogénesis y virulencia (Spalding MD. *et al.*, 2010). Además, el metabolismo del ácido lipoico ha sido ampliamente descrito en la bacteria Gram-negativa *Escherichia coli*, la cual estuvo significativamente aumentada en los pacientes con SSP con respecto a los controles en nuestro estudio. Por otra parte, los glicosaminoglicanos ayudan a formar una barrera protectora para la mucina intestinal, y se ha descrito que la degradación de los glicosaminoglicanos está asociada con una respuesta inflamatoria en la enfermedad inflamatoria intestinal (Winslet MC. *et al.*, 1994). Finalmente, el ácido retinoico (un producto del metabolismo del retinol) media la regulación celular en enfermedades autoinmunes a través de la supresión de las respuestas inflamatorias T helper 1 / Th17 al disminuir los niveles séricos de IFN $\gamma$  e IL-17 (Abdelhamid L. *et al.*, 2018). Todos estos datos sugieren que la microbiota intestinal de los pacientes con SSP está enriquecida en genes de vías asociadas con la patogénesis bacteriana y potencialmente relacionadas con la inflamación crónica en comparación con los controles sanos.

Los resultados de este estudio deben interpretarse teniendo en cuenta las limitaciones de nuestro estudio, que incluyen un pequeño número de pacientes y controles y el sesgo de género de la enfermedad. Por lo tanto, nuestros resultados deberían ser confirmados mediante estudios en poblaciones más grandes con pacientes de ambos sexos que reflejen la población general de pacientes con SSP.

## CONCLUSIONES

---

- Nuestros datos sugieren que la microbiota intestinal en pacientes con SSP difiere tanto a nivel taxonómico como funcional con respecto a la de los controles sanos.
- Los pacientes con SSP se caracterizaron por un perfil de microbiota intestinal menos diverso y rico, con Bacteroidetes dominando a nivel de filo
- Los pacientes con SSP tuvieron una abundancia relativa significativamente mayor de patógenos oportunistas con actividad proinflamatoria y una abundancia relativa menor de bacterias beneficiosas o comensales productoras de butirato.
- Además, los pacientes con SSP tuvieron niveles significativamente más altos de citoquinas proinflamatorias (IL-6, IL-12, IL-17 y TNF-alfa) y zonulina sérica, y niveles significativamente más bajos de IL-10 y de expresión de FOXP3 (implicado en el desarrollo y función de las células Treg) que los controles sanos; capaces de alterar la función de la barrera intestinal y, por lo tanto, contribuir a los procesos inflamatorios asociados a los pacientes con SSP.
- El análisis funcional PICRUSt encontró un descenso en genes involucrados en funciones metabólicas como el metabolismo del butanoato y el metabolismo del glutatión, así como una sobrerrepresentación de genes involucrados en el metabolismo del ácido lipoico, metabolismo del retinol, biosíntesis de lipopolisacáridos y degradación de glicosaminoglicanos, genes de vías asociadas con la patogénesis bacteriana y potencialmente relacionado con la inflamación crónica.
- Son necesarios más estudios para comprender mejor el impacto real de la disbiosis en el curso del SSP y para concebir estrategias preventivas o terapéuticas para contrarrestar la inflamación provocada por el microbioma en estos paientes.
- En definitiva, estos datos proporcionan biomarcadores de diagnóstico novedosos y precisos basados en la microbiota intestinal, así como nuevas bases para el diseño de nuevas terapias basadas en microbios para el tratamiento del SSP.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Abdelhamid L, Luo XM. Retinoic Acid, Leaky Gut, and Autoimmune Diseases. *Nutrients*. 2018;10(8):1016.
- Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 2000; 406:782-787
- Acharya A, Chan Y, Kheur S, Jin LJ, Watt RM, Mattheos N. Salivary microbiome in non-oral disease: A summary of evidence and commentary. *Arch Oral Biol*. 2017; 83: 169–173. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.07.019> PMID: 28780386
- Aho K, Koskenvuo M, Tuominen J, Kaprio J. Occurrence of rheumatoid arthritis in a nationwide series of twins. *J Rheumatol* 1986; 13: 899–902.
- André R, Becker M, Lombardi T, Buchholzer S, Marchal F, Seebach JD. Comparison of Clinical Characteristics and Magnetic Resonance Imaging of Salivary Glands With Magnetic Resonance Sialography in Sjögren's Syndrome. *Laryngoscope*. 2021 Jan;131(1):E83-E89. doi: 10.1002/lary.28742. Epub 2020 May 15. PMID: 32413167.
- Akira S, Takeda K. Toll like receptor signaling. *Nat Rev Immunol* 2004; 4:499-511
- Akpek EK, Mathews P, Hahn S, Hessen M, Kim, Grader-Beck T, Birnbaum J, Baer A. Ocular and systemic morbidity in a longitudinal cohort of Sjögren's syndrome. *Ophthalmology*. 2015;122(1):56-61
- Allali I, Arnold JW, Roach J, Cadenas MB, Butz N, Hassan HM, et al. A comparison of sequencing platforms and bioinformatics pipelines for compositional analysis of the gut microbiome. *BMC Microbiol*. 2017; 17: 194S
- Alfonso AA, Monroy D, Stern ME, Feuer WJ, Tseng SC, Pflugfelder SC. Correlation of tear fluorescein clearance and Schirmer test scores with ocular irritation symptoms. *Ophthalmology*. 1999 Apr;106(4):803-10. doi: 10.1016/S0161-6420(99)90170-7. PMID: 10201606.
- Alpan O, Bachelder E, Isil E, Arnheiter H, Matzinger P. Educated dendritic cells act as messengers from minor to naïve T helper cells. *Nat Immunology* 2004; 5:615-622
- Alpaugh MA, Tam EM. Antibodies to cellular antigens in Sjögren syndrome. *J Clin Invest* 1975; 55: 1067.
- Alspaugh MA, Maddison P. Resolution of the identity of certain antigen-antibody systems in systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome: an interlaboratory collaboration. *Arthr Rheum* 1979;22 796
- Almståhl A, Wikström M, Stenberg I, Jakobsson A, Fagerberg-Mohlin B. Oral microbiota associated with hyposalivation of different origins. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18:1–8. doi:10.1034/j.1399-302X.2003.180101.x
- Amezcu-Guerra LM, Hofmann F, Vargas A, et al. Joint involvement in primary Sjögren's syndrome: an ultrasound "target area approach to arthritis". *Biomed Res Int* 2013; 2013:640265.
- Artis, D. (2008) Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nat. Rev. Immunol*. 8,411–420

- Atarashi K, Nishimura J, Shima T, Umesaki Y, Yamamoto M, Onoue M, Yagita H, Ishii N, Evans R, Honda K, Takeda K. ATP drives lamina propria TH17 cell differentiation. *Nature* 2008; 455, 808–812
- Atarashi K, Tanoue T, Shima T, Imaoka A, Kuwahara T, Momose Y, et al. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science* 2011;331:337–41. doi:10.1126/science.1198469
- Atarashi K, Tanoue T, Oshima K, Suda W, Nagano Y, Nishikawa HT, et al. Treg induction by a rationally selected mixture of *Clostridia* strains from the human microbiota. *Nature* 2013; 500:232–6. doi:10.1038/nature12331
- Aung W, Yamada I, Umehara I, Ohbayashi N, Yoshino N, Shibuya H. Sjögren's syndrome: comparison of assessments with quantitative salivary gland scintigraphy and contrast sialography. *J Nucl Med.* 2000 Feb;41(2):257-62. PMID: 10688108.
- Bäckhed F. Programming of host metabolism by the gut microbiota. *Annals of Nutrition and Metabolism* 2011; 58: 44-52
- Baer AN, Medrano L, McAdams-DeMarco M, Gniadek TJ. Association of Anticentromere Antibodies With More Severe Exocrine Glandular Dysfunction in Sjögren's Syndrome: Analysis of the Sjögren's International Collaborative Clinical Alliance Cohort. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2016; 68:1554.
- Baughman RP, Teirstein AS, Judson MA, et al. Clinical characteristics of patients in a case control study of sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:1885.
- Berguiga M, Mameletzi E, Nicolas M, Rivier D, Majo F. Long-term follow-up of multilayer amniotic membrane transplantation (MLAMT) for non-traumatic corneal perforations or deep ulcers with descemetocoele. *Klin Monbl Augenheilkd.* 2013 Apr;230(4):413-8. doi: 10.1055/s-0032-1328394. Epub 2013 Apr 29. PMID: 23629794.
- Bhute S, Pande P, Shetty SA, Shelar R, Mane S, Kumbhare SV, et al. Molecular characterization and meta-analysis of gut microbial communities illustrate enrichment of *Prevotella* and *Megasphaera* in Indian subjects. *Front Microbiol.* 2016; 7: 660-674.
- Bian F, Barbosa FL, Corrales RM, Pelegriño FS, Volpe EA, Pflugfelder SC, de Paiva CS. Altered balance of interleukin-13/interferon-gamma contributes to lacrimal gland destruction and secretory dysfunction in CD25 knockout model of Sjögren's syndrome. *Arthritis Res Ther.* 2015 Mar 10;17(1):53. doi: 10.1186/s13075-015-0582-9. PMID: 25889094; PMCID: PMC4392623.
- Bianciardi G, Latronico ME, Traversi C. Entropy of corneal nerve fibers distribution observed by laser scanning confocal microscopy: A noninvasive quantitative method to characterize the corneal innervation in Sjögren's syndrome patients. *Microsc Res Tech.* 2015;78(12):1069e74
- Bilsborough J, Viney JL. Gastrointestinal dendritic cells play a role in immunity, tolerance and disease. *Gastroenterology* 2004;127:300-309

- Birnbaum J, Peripheral nervous system manifestations of Sjögren's syndrome: clinical patterns, diagnostic paradigms, etiopathogenesis, and therapeutic strategies. *Neurologist*. 2010;16(5): 287–297 <https://doi.org/10.1097/NRL.0b013e3181e59f>
- Brauner S, Folkersen L, Kvarnström M, Meisgen S, Petersen S, Franzén-Malmros M, Mofors J, Brokstad KA, Klareskog L, Jonsson R, Westerberg LS, Trollmo C, Malmström V, Ambrosi A, Kuchroo VK, Nordmark G, Wahren-Herlenius M. H1N1 vaccination in Sjögren's syndrome triggers polyclonal B cell activation and promotes autoantibody production. *Ann Rheum Dis*. 2017 Oct;76(10):1755-1763. doi: 10.1136/annrheumdis-2016-210509. Epub 2017 Jul 31. PMID: 28760805; PMCID: PMC5629946.
- Brito Zeron P, Kostov BA, Zeher M et al (2015) OP0089 Big Data Sjögren Project (Eular-SS Task Force International Network): characterization at Diagnosis of 5027 patients with primary Sjögren syndrome. *Ann Rheum Dis* 74 (Suppl 2): 102. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2015-eular.4035>
- Bodewes ILA, Al-Ali S, van Helden-Meeuwsen CG, Maria NI, Tarn J, Lendrem DW, Schereurs MWJ, Steenwijk EC, van Daele PLA, Both T, Bowman SJ, Griffiths B, Wan-Fai, Versnel MA. Systemic interferon type I and type II signatures in primary Sjögren's syndrome reveal differences in biological disease activity. *Rheumatology (Oxford)* 2018; 57: 921–30.
- Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*. 2019; 37: 852-857
- Bonilla FA, Oettgen HC. Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S33-40. doi: 10.1016/j.jaci.2009.09.017. Epub 2010 Jan 12. PMID: 20061006.
- Botsios C, Furlan A, Ostuni P, et al. Elderly onset of primary Sjögren's syndrome: clinical manifestations, serological features and oral/ocular diagnostic tests. Comparison with adult and young onset of the disease in a cohort of 336 Italian patients. *Joint Bone Spine* 2011; 78:171.
- Bournia VK, Diamanti KD, Vlachoyiannopoulos PG, Moutsopoulos HM. Anticentromere antibody positive Sjögren's Syndrome: a retrospective descriptive analysis. *Arthritis Res Ther* 2010; 12:R47.
- Bouskra D, Brezillon C, Bérard M, Werst C, Varona R, Boneca G, Eberl G. Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis. *Nature* 2008; 456, 507–510
- Bowman SJ, Booth DA, Platts RG. Measurement of fatigue and discomfort in primary Sjögren's syndrome using a new questionnaire tool. *Rheumatology (Oxford)* 2004; 43: 758–64.
- Brandl K, Plitas G, Schnabl B, DeMatteo RP, Pamer EG. MyD88-mediated signals induce the bactericidal lectin RegIII gamma and protect mice against intestinal *Listeria monocytogenes* infection. *J. Exp. Med*. 2007; 204: 1891–1900
- Brito-Zerón P, Kostov B, Solans R, Fraile G, Suárez-Cuervo C, Casanovas A, Rascón FJ, Qanneta R, Pérez-Alvarez R, Ripoll M, Akasbi M, Pinilla B, Bosch JA, Nava-Mateos J, Díaz-López B, Morera-Morales ML, Gheitasi H, Retamozo S, Ramos-Casals M.



- Systemic activity and mortality in primary Sjögren syndrome: predicting survival using the EULAR-SS Disease Activity Index (ESSDAI) in 1045 patients. *Ann Rheum Dis* 2016; 75: 348–55.
- Brito-Zerón P, Acar-Denizli N, Zeher M, et al. Influence of geolocation and ethnicity on the phenotypic expression of primary Sjögren's syndrome at diagnosis in 8310 patients: a cross-sectional study from the Big Data Sjögren Project Consortium. *Ann Rheum Dis* 2017; 76:1042.
- Brkic Z, Naomi IM, van Helden-Meeuwsen CG, van de Merwe JP, van Daele PL, Dalm VA, Wildenberg ME, Beumer W, Drexhage HA, Versnel MA .Prevalence of interferon type I signature in CD14 monocytes of patients with Sjögren's syndrome and association with disease activity and BAFF gene expression. *Ann Rheum Dis* 2013; 72: 728–35.
- Brocker C, Thompson D, Matsumoto A, Nebert D, Vasiliou V. Evolutionary divergence and functions of the human interleukin(IL) gene family. *Human Genomics* 5(1) 30-55. ISSN 14739542. PMC 3390169. PMID 21106488. doi:10.1186/1479-7364-5-1-30.
- Brownlee M, Knight J, Dettmar PW, Pearson JP: Action of reactive oxygen species on colonic mucus secretions. *Free Radic Biol Med* 2007, 43:800–808.
- Bron AJ, de Paiva CS, Chauhan SK, Bonini S, Gabison EE, Jain S, Knop E, Markoulli M, Ogawa Y, Perez V, Uchino Y, Yokoi N, Zoukhri D, Sullivan DA. TFOS DEWS II pathophysiology report. *Ocul Surf.* 2017 Jul;15(3):438-510. doi: 10.1016/j.jtos.2017.05.011. Epub 2017 Jul 20. Erratum in: *Ocul Surf.* 2019 Oct;17(4):842. PMID: 28736340.
- Burbelo PD, Ferré EMN, Chaturvedi A, et al. Profiling Autoantibodies against Salivary Proteins in Sicca Conditions. *J Dent Res* 2019; 98:772.
- Burke C, Steinberg P, Rusch D, Kjelleberg S, Thomas T. Bacterial community assembly based on functional genes rather than species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2011; 108:14288–14293
- Canfora EE, Jocken JW, Blaak EE. Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity. *Nat Rev Endocrinol* 2015; 11: 577–91.
- Carrozzo M. Oral diseases associated with hepatitis C virus infection. Part 1. sialadenitis and salivary glands lymphoma. *Oral Dis* 2008; 14:123.
- Chan EK, Hamel JC, Buyon JP, Tan EM. Molecular definition and sequence motifs of the 52-kD component of human SS-A/Ro autoantigen. *J Clin Invest* 1991; 87:68.
- Chao, A. 1984. Non-parametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of Statistics* **11**, 265-270
- Chao WC, Lin CH, Liao TL, Chen YM, Chen DY, Chen HH. Association between a history of mycobacterial infection and the risk of newly diagnosed Sjögren's syndrome: a nation-wide, population-based case-control study. *PLoS ONE* 2017; 12: e0176549.
- Chen YI, Nikulina K, Lazarev S, Bahrami AF, Noble LB, Gallup M and McNamara NA. Interleukin-1 as a phenotypic immunomodulator in keratinizing squamous

- metaplasia of the ocular surface in Sjögren's syndrome. *Am J Pathol.* 2010;177(3):1333e43
- Chen J, Vitetta L. The Role of Butyrate in Attenuating Pathobiont-Induced Hyperinflammation. *Immune Netw.* 2020;20(2): e15.
- Cheuk W, Chan JK. IgG4-related sclerosing disease: a critical appraisal of an evolving clinicopathologic entity. *Adv Anat Pathol* 2010; 17:303.
- Christina Tsigalou, Elisavet Stavropoulo, Eugenia Bezirtzoglou. Current insights in Microbiome Shifts in Sjögren's Syndrome and Possible Therapeutic interventions. *Frontiers in Immunology* 2018 doi: 10.3389/fmmu.2018.01106
- Christodoulou MI, Kapsogeorgou EK ,Moutsopoulos H.M. Characteristics of the minor salivary gland infiltrates in Sjögren's syndrome, *J. Autoimmun.* 34 (2010) 400–407.
- Clarke, TB, Davis KM, Lysenko ES, Zhou AY, Yu Y and Weiser JN .Recognition of peptidoglycan from the microbiota by Nod1 enhances systemic innate immunity. *Nat. Med.* 2010;16, 228–231
- Cobrin GM, Abreu MT. Defects in mucosal immunity leading to Crohn's disease. *Immunol Rev* 2005; 206:277-295
- Cole JR, Wang Q, Fish JA, Chai B, McGarrell DM, Sun Y, et al. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 2014;42:D633-42.
- Coursey TG, Bohat R, Barbosa FL, Pflugfelder SC, de Paiva CS. Desiccating stress-induced chemokine expression in the epithelium is dependent on upregulation of NKG2D/RAE-1 and release of IFN- $\gamma$  in experimental dry eye. *J Immunol.* 2014 Nov 15;193(10):5264-72. doi: 10.4049/jimmunol.1400016. Epub 2014 Oct 6. PMID: 25288568; PMCID: PMC4225173.
- Coursey TG, Bian F, Zaheer M, Pflugfelder SC, Volpe EA, de Paiva CS. Age-related spontaneous lacrimal keratoconjunctivitis is accompanied by dysfunctional T regulatory cells. *Mucosal Immunol.* 2017 May;10(3):743-756. doi: 10.1038/mi.2016.83. Epub 2016 Oct 5. PMID: 27706128; PMCID: PMC5380589.
- Davidson A, Diamond B. Autoimmune diseases. *N Engl J Med* 2001; 345:340.
- De La Cuesta-Zuluaga, J.; Kelley, S.T.; Chen, Y.; Escobar, J.S.; Mueller, N.T.; Ley, R.E.; McDonald, D.; Huang, S.; Swa\_ord, A.D.; Knight, R.; et al. Age- and Sex-Dependent Patterns of Gut Microbial Diversity in Human Adults. *mSystems* 2019, 4, e00261-19.
- Daniels TE. Labial salivary gland biopsy in Sjögren's syndrome. Assessment as a diagnostic criterion in 362 suspected cases. *Arthritis Rheum* 1984; 27:147.
- De Oliveira, G., Leite, A. Z., Higuchi, B. S., Gonzaga, M. I., & Mariano, V. S. Intestinal dysbiosis and probiotic applications in autoimmune diseases. *Immunology*, 2017;152(1):1–12.
- De Paiva CS, Villarreal AL, Corrales RM, Rahman HT, Chang VY, Farley WJ, Stern ME, Niederkorn JY, Li DQ, Pflugfelder SC. Dry eye-induced conjunctival epithelial squamous metaplasia is modulated by interferon-gamma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007 Jun;48(6):2553-60. doi: 10.1167/iovs.07-0069. PMID: 17525184.

- De Paiva CS, Jones DB, Stern ME, Bian F, Moore QL, Corbiere S, Streckfus CF, Hutchinson DS, Ajami NJ, Petrosino JF, Pflugfelder SC. Altered mucosal microbiome diversity and disease severity in Sjögren Syndrome. *Sci Rep* 2016; 6: 23561.
- De Paiva CS, Pflugfelder SC, Ng SM, Akpek EK. Topical cyclosporine A therapy for dry eye syndrome. *Cochrane Database Syst Rev* 2019; 9:CD010051.
- Earle K.A., Billings G., Sigal M., Lichtman J.S., Hansson G.C., Elias J.E., Amieva M.R., Huang K.C., Sonnenburg J.L. Quantitative imaging of gut microbiota spatial organization. *Cell Host Microbe*. 2015;18:478–488.
- Ebert EC. Gastrointestinal and hepatic manifestations of Sjögren syndrome. *J Clin Gastroenterol* 2012; 46:25.
- Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA: Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 2005; 308: 1635–1638.
- Ekström Smedby K, Vajdic CM, Falster M, et al. Autoimmune disorders and risk of non-Hodgkin lymphoma subtypes: a pooled analysis within the InterLymph Consortium. *Blood* 2008; 111:4029.
- Ellis GL. Lymphoid lesions of salivary glands: malignant and benign. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2007; 12:E479.
- Erkelens MN, Mebius RE. Retinoic Acid and Immune Homeostasis: A Balancing Act. *Trends Immunol*. 2017; 38(3):168-180.
- Esquivel-Elizondo, S.; Ilhan, Z.E.; Garcia-Peña, E.I.; Krajmalnik-Brown, R. Insights into Butyrate Production in a Controlled Fermentation System via Gene Predictions. *mSystems* 2017, 2, e00051-17.
- Fagarasan S, Muramatsu M, Suzuki K, Nagaoka H. Critical roles of activation-induced cytidine deaminase in the homeostasis of gut flora. *Science* 2002; 298:1414-1427
- Fasano A. Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: the biological door to inflammation, autoimmunity, and cancer. *Physiol Rev*. 2011;91(1):151–75
- Favier C, Neut C, Mizon C, Cortot A, Colombel JF, Mizon J. Fecal beta-D-galactosidase production and Bifidobacteria are decreased in Crohn's disease. *Dig Dis Sci*. 1997 Apr; 42(4):817-22.
- Feinstein AJ, Ciarleglio MM, Cong X, et al. Parotid gland lymphoma: prognostic analysis of 2140 patients. *Laryngoscope* 2013; 123:1199.
- Fernando MR, Saxena A, Reyes JL, McKay DM (2016) Butyrate enhances antibacterial effects while suppressing other features of alternative activation in IL-4-induced macrophages. *Am J Physiol-Gastr L* 310(10): G822–G831.
- Ferro F, Marcucci E, Orlandi M, Baldini C, Bartoloni-Bocci E. One year in review 2017: primary Sjögren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 2017; 35(2):179–91.
- Fisher BA, Jonsson R, Daniels T, et al. Standardisation of labial salivary gland histopathology in clinical trials in primary Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2017; 76:1161.

- Foulks GN. Treatment of dry eye disease by the non-ophthalmologist. *Rheum Dis Clin North Am* 2008; 34:987.
- Franceschini F, Cavazzana I, Andreoli L, Tincani A. The 2016 classification criteria for primary Sjögren's syndrome: what's new. *BMC Med* 2017; 15:69.
- Fricke A.M., Podlesny D., Fricke W.F. What is new and relevant for sequencing-based microbiome research? A mini-review. *J. Adv. Res.* 2019;19:105–112.
- Gaboriau-Routhiau V, Cerf-Bensussan N. Microbiote intestinale et développement du système immunitaire [Gut microbiota and development of the immune system]. *Med Sci (Paris)*. 2016 Nov;32(11):961-967. French. doi: 10.1051/medsci/20163211011. Epub 2016 Dec 23. PMID: 28008836.
- Geuking MB, Cahen zli J, Lawson MA: Intestinal bacterial colonization induces mutualistic regulatory T cell responses. *Immunity* 2011, 34:794–806.
- Ghrenassia E, Martis N, Boyer J, et al. The diffuse infiltrative lymphocytosis syndrome (DILS). A comprehensive review. *J Autoimmun* 2015; 59:19.
- Gooding JM, Yap KL, Ikura M: The cadherin-catenin complex as a focal point of cell adhesion and signalling: new insights from three-dimensional structures. *BioEssays* 2004; 26:497–511.
- Gottenberg JE, Cagnard N, Lucchesi C, Letourneur F, Mistou S, Lazure T, Jacques S, Ba N, Ittah M, Lepajolec C, Labetoulle M, Ardizzone M, Sibilia J, Fournier C, Chiocchia G, Mariette X. Activation of IFN pathways and plasmacytoid dendritic cell recruitment in target organs of primary Sjögren's syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 2770–5.
- Greiling TM, Dehner C, Chen X, Hughes K, Iñiguez AJ, Boccitto M, Ruiz DZ, Renfro SC, Vieira SM, Ruff WE, Sim S, Kriegel C, Glanternik J, Chen X, Girardi M, Degnan P, Costenbader KH, Goodman AL, Wolin SL, Kriegel MA. Commensal orthologs of the human autoantigen Ro60 as triggers of autoimmunity in lupus. *Sci Transl Med* 2018; 10: ean2306.
- Guidera AC, Luchs JJ, Udell JJ. Keratitis, ulceration, and perforation associated with topical nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Ophthalmology* 2001; 108:936.
- Hall DM, Buettner GR, Oberley LW, Xu L, Matthes RD, Gisolfi CV: Mechanisms of circulatory and intestinal barrier dysfunction during whole body hyperthermia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280:H509–H521
- Hall JC, Baer AN, Shah AA, Criswell LA, Shiboski CH, Rosen A, Casciola-Rosen L. Molecular Subsetting of Interferon Pathways in Sjögren's Syndrome. *Arthritis Rheumatol*. 2015 Sep;67(9):2437-46. doi: 10.1002/art.39204. PMID: 25988820; PMCID: PMC4551661.
- Hao WL, Lee YK. Microflora of the gastrointestinal tract; A review. *Methods Mol Biol* 2004; 268:491-502
- Harley JB, Sestak AL, Willis LG, et al. A model for disease heterogeneity in systemic lupus erythematosus. Relationships between histocompatibility antigens, autoantibodies, and lymphopenia or renal disease. *Arthritis Rheum* 1989; 32:826.

- Heverhagen JT, Kalinowski M, Rehberg E, Klose KJ, Wagner HJ. Prospective comparison of magnetic resonance sialography and digital subtraction sialography. *J Magn Reson Imaging*. 2000 May;11(5):518-24. doi: 10.1002/(sici)1522-2586(200005)11:5<518::aid-jmri7>3.0.co;2-5. PMID: 10813861.
- Hevia, C. Milani, P. López, A. Cuervo, S. Arboleya, S. Duranti, et al., Intestinal dysbiosis associated with systemic lupus erythematosus, *mBio* 5 (2014) e01548-14.
- Hirai N, Kawasaki S, Tanioka H, Connon CJ, Yamasaki K, Yokoi N, Komuro A, Kinoshita S. Pathological keratinisation in the conjunctival epithelium of Sjögren's syndrome. *Exp Eye Res*. 2006 Mar;82(3):371-8. doi: 10.1016/j.exer.2005.07.009. Epub 2005 Sep 6. PMID: 16143330.
- Holland EJ, Mannis MJ, Lee WB. The Tear Film: Anatomy, Structure and Function. In: Holland EJ, Mannis MJ (eds) Lee WB: *Ocular Surface Disease: Cornea, Conjunctiva and Tear film*. London, Elsevier Health Sciences; 2013
- Holland EJ, Whitley WO, Sall K, et al. Lifitegrast clinical efficacy for treatment of signs and symptoms of dry eye disease across three randomized controlled trials. *Curr Med Res Opin* 2016; :1.
- Honda K, Littman DR. The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease. *Nature* 2016; 535: 75–84.
- Hooper LV, Wong MH, Thelin A, Hansson L, Falk PG, Gordon JI: Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science* 2001; 291: 881–884.
- Hsi ED, Zukerberg LR, Schnitzer B, Harris NL. Development of extrasalivary gland lymphoma in myoepithelial sialadenitis. *Mod Pathol* 1995; 8:817.
- Hyphantis T, Mantis D, Voulgari PV, Tsifetaki N, Drosos AA. The psychological defensive profile of primary Sjögren's syndrome patients and its relationship to health-related quality of life. *Clin Exp Rheumatol* 2011; 29: 485–93.
- Iljazovic, A.; Roy, U.; Gálvez, E.J.C.; Lesker, T.R.; Zhao, B.; Gronow, A.; Amend, L.; Will, S.E.; Hofmann, J.D.; Pils, M.C.; et al. Perturbation of the gut microbiome by *Prevotella* spp. enhances host susceptibility to mucosal inflammation. *Mucosal Immunol*. 2020, 1–12.
- Imanguli MM, Atkinson JC, Mitchell SA, et al. Salivary gland involvement in chronic graft-versus-host disease: prevalence, clinical significance, and recommendations for evaluation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010; 16:1362.
- Ivanov II, Frutos R de L, Manel N, Yoshinaga K, Rifkin DB, Sartor RB, Finlay BB, Littman DR: Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. *Cell Host Microbe* 2008; 4:337–349.
- Ivanov II, Atarashi K, Manel N, Brodie EL, Shima T, Karaoz U, et al. Induction of intestinal 17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* 2009; 139:485–98.
- Jabs DA, Prendergast RA, Rorer EM, Hudson AP, Whittum-Hudson JA. Cytokines in autoimmune lacrimal gland disease in MRL/MpJ mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001 Oct;42(11):2567-71. PMID: 11581200.

- Jackson DC, Zeng W, Wong CY, Mifsud EJ, Williamson NA, Ang CS, Vingrys AJ, Downie LE. Tear Interferon-Gamma as a Biomarker for Evaporative Dry Eye Disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016 Sep 1;57(11):4824-4830. doi: 10.1167/iovs.16-19757. PMID: 27654409.
- Jang MH, Kweon MN, Iwatani K, Yamamoto M, Terahara K, Sasakawa C, Suzuki T, Nochi T, Yokota Y, Rennert PD, Hiroi T, Tamagawa H, Iijima H, Kunisawa J, Yuki Y, Kiyono H. Intestinal villous M cells: an antigen entry site in the mucosal epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:6110-6115
- Jonsson R, Theander E, Sjostrom B, Brokstad K, Henriksson G. Autoantibodies present before symptom onset in primary Sjögren syndrome. *JAMA* 2013; 310: 1854–5.
- Jousse-Joulin S, Nowak E, Cornec D, Brown J, Carr A, Carotti M, Fisher B, Fradin J, Hocevar A, Jonsson MV, Luciano N, Milic V, Rout J, Theander E, Stel A, Bootsma H, Vissink A, Baldini C, Baer A, Ng WF, Bowman S, Alavi Z, Saraux A, Devauchelle-Pensec V. Salivary gland ultrasound abnormalities in primary Sjögren's syndrome: consensual US-SG core items definition and reliability. *RMD Open*. 2017 Jun 9;3(1):e000364. doi: 10.1136/rmdopen-2016-000364. PMID: 28879042; PMCID: PMC5575597.
- Jovel J., Patterson J., Wang W., Hotte N., O'Keefe S., Mitchel T., Perry T., Kao D., Mason A.L., Madsen K.L., et al. Characterization of the Gut Microbiome Using 16S or Shotgun Metagenomics. *Front. Microbiol*. 2016;7:459.
- Kamada N, Chen GY, Inohara N, Nunez G. Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nat Immunol* 2013; 14: 685–90.
- Kawasaki S, Kawamoto S, Yokoi N, Connon C, Minesaki Y, Kinoshita S, Okubo K. Up-regulated gene expression in the conjunctival epithelium of patients with Sjögren's syndrome. *Exp Eye Res*. 2003 Jul;77(1):17-26. doi: 10.1016/s0014-4835(03)00087-3. PMID: 12823984.
- Kazi S, Cohen PR, Williams F, et al. The diffuse infiltrative lymphocytosis syndrome. Clinical and immunogenetic features in 35 patients. *AIDS* 1996; 10:385.
- Kim J, Sun D, Ozi R, et al. A validated method of labial minor salivary gland biopsy for the diagnosis of Sjögren's syndrome. *Laryngoscope* 2016; 126:2041.
- Kittridge A, Routhouska SB, Korman NJ. Dermatologic manifestations of Sjögren syndrome. *J Cutan Med Surg* 2011; 15:8.
- Kobayashi, K.S, Chamaillard M, Ogura Y, Henegariu O, Inohara N, Nuñez G, Flavell RA. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* 2005; 307, 731–734
- Kostic A, Gevers D, Siljander H, Vatanen T, Hyötyläinen T, Hämäläinen A, Peet A, Tillmann V, Pöhö P, Mattila I, Lähdesmäki H, Franzosa E, Vaarala O, De Goffau M, Harmsen H, Ilonen J, Virtanen S, Clish C, Orešič M, Huttenhower C, Knip M, Xavier R for the DIABIMMUNE Study Group. The dynamics of the human infant gut microbiome in development and in progression toward type 1 diabetes. *Cell Host Microbe* 2015; 17: 260–73.

- Kriegel MA, Sefik E, Hill JA, Wu HJ, Benoist C, Mathis D: Naturally transmitted segmented filamentous bacteria segregate with diabetes protection in nonobese diabetic mice. *Proc Natl Acad* 2011; 108:11548–11553.
- Kvarnstrom M, Ottosson V, Nordmark B, Wahren-Herlenius M. Incident cases of primary Sjögren's syndrome during a 5- year period in Stockholm County: a descriptive study of the patients and their characteristics. *Scand J Rheumatol* 2015; 44: 135–42.
- Lanning DK, Rhee KJ. Intestinal bacteria and development of the B-lymphocyte repertoire. *Trends Immunol* 2005; 26:419-425
- Lessard CJ, Li H, Adrianto I et al. Variants at multiple loci implicated in both innate and adaptive immune responses are associated with Sjögren's syndrome. *Nat Genet* 2013; 45: 1284–92.
- Lewis K, Lutgendorff F, Phan V, Söderholm JD, Sherman PM, McKay DM: Enhanced Translocation of Bacteria Across Metabolically Stressed Epithelia is Reduced by Butyrate. *Inflammatory Bowel Diseases* 2010; 16:1138–1148.
- Le Chatelier E., T. Nielsen, J. Qin, E. Prifti, F. Hildebrand, G. Falony, et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* 2013; 500:541-546.
- Li B, Selmi C, Tang R, Gershwin ME, Ma X. The microbiome and autoimmunity: a paradigm from the gut-liver axis. *Cell Mol Immunol*. 2018 Jun;15(6):595-609. doi: 10.1038/cmi.2018.7. Epub 2018 Apr 30. PMID: 29706647; PMCID: PMC6079090.
- Li M, Zou Y, Jiang Q, Jiang L, Yu Q, Ding X, Yu Y. A preliminary study of the oral microbiota in Chinese patients with Sjögren's syndrome. *Arch Oral Biol* 2016; 70: 143–8.
- Liew MS, Zhang M, Kim E, Akpek EK. Prevalence and predictors of Sjogren's syndrome in a prospective cohort of patients with aqueous-deficient dry eye. *Br J Ophthalmol* 2012; 96:1498.
- Liu SY, Vlantis AC, Lee WC. Bilateral parotid and submandibular gland enlargement: rare features of Wegener's granulomatosis. *J Laryngol Otol* 2003; 117:148.
- Lorenz RG, Chaplin DD, McDonald KG, McDonough JS, Newberry RD. Isolated lymphoid follicle formation is inducible and dependent upon lymphotoxin -sufficient B lymphocytes, lymphotoxin beta receptor, and TNF receptor I function. *J Immunol*. 2003;170(11):5475-82.
- Louis, P.; Flint, H.J. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environ. Microbiol*. 2017, 19, 29–41.
- Lourenco TG, Heller D, Silva-Boghossian CM, Cotton SL, Paster BJ, Colombo AP. Microbial signature profiles of periodontally healthy and diseased patients. *J Clin Periodontol*. 2014; 41: 1027–1036. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12302> PMID: 25139407
- Lu M-C, Jheng C-H, Tsai T-Y, Koo M, Lai N-S. Increased dental visits in patients prior to diagnosis of primary Sjögren's syndrome: a population-based study in Taiwan. *Rheumatol Int* 2014; 34:1555–61.
- Luni FK, Malik SA, Khan AR, et al. Risk of Ischemic Heart Disease in Patients With Sjögren's Syndrome. *Am J Med Sci* 2017; 354:395.

- Lukumbuzya M., Schmid M., Pjevac P., Daims H.A. Multicolor Fluorescence in situ Hybridization Approach Using an Extended Set of Fluorophores to Visualize Microorganisms. *Front. Microbiol.* 2019;10:1383.
- Lynch DA. Lung disease related to collagen vascular disease. *J orac Imaging* 2009; 24(4): 299–309.
- Ma Q, Song H. Diagnosis and management of lymphoepithelial lesion of the parotid gland. *Rheumatol Int* 2011; 31:959.
- Ma CS, Wong N, Rao G, Avery DT, Torpy J, Hambridge T, Bustamante J, Okada S, Stoddard JL, Deenick EK, Pelham SJ, Payne K, Boisson-Dupuis S, Puel A, Kobayashi M, Arkwright PD, Kilic SS, El Baghdadi J, Nonoyama S, Minegishi Y, Mahdavian SA, Mansouri D, Bousfiha A, Blincoe AK, French MA, Hsu P, Campbell DE, Stormon MO, Wong M, Adelstein S, Smart JM, Fulcher DA, Cook MC, Phan TG, Stepensky P, Boztug K, Kansu A, İkinçioğullari A, Baumann U, Beier R, Roscioli T, Ziegler JB, Gray P, Picard C, Grimbacher B, Warnatz K, Holland SM, Casanova JL, Uzel G, Tangye SG. Monogenic mutations differentially affect the quantity and quality of T follicular helper cells in patients with human primary immunodeficiencies, *J. Allergy Clin. Immunol.* 136 (4)2015;993–1006.
- Marsh P, Pflugfelder SC. Topical nonpreserved methylprednisolone therapy for keratoconjunctivitis sicca in Sjögren syndrome. *Ophthalmology* 1999; 106:811.
- McDonald D, Price MN, Goodrich J, Nawrocki EP, DeSantis TZ, Probst A, et al. An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *ISME J.* 2012 Mar;6(3):610-8.
- Maciel G, Crowson CS, Matteson EL, Cornec D. Incidence and Mortality of Physician-Diagnosed Primary Sjögren Syndrome: Time Trends Over a 40-Year Period in a Population-Based US Cohort. *Mayo Clin Proc* 2017; 92:734.
- Maldini C, Seror R, Fain O, et al. Epidemiology of primary Sjögren's syndrome in a French multiracial/multiethnic area. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2014; 66:454.
- Mandl T, Marsal J, Olsson P, Ohlsson B, Andreasson K. Severe intestinal dysbiosis is prevalent in primary Sjögren's syndrome and is associated with systemic disease activity. *Arthritis Res Ther* 2017; 19: 237.
- Manfredo Vieira S, Hiltensperger M, Kumar V, Zegarra-Ruiz D, Dehner C, Khan N, Costa FRC, Tiniakou E, Greiling T, Ruff W, Barbieri A, Kriegel C, Mehta SS, Knight JR, Jain D, Goodman AL, Kriegel MA. Translocation of a gut pathobiont drives autoimmunity in mice and humans. *Science* 2018; 359: 1156–61.
- Mariette X, Criswell LA. Primary Sjögren's syndrome. *N Engl J Med* 2018; 378: 931–9
- Mark DP Willcox, Pablo Argüeso, Georgi A. Georgi A Georviev, Juha M. Holopainen, Gordon W. Laurie, Tom J. Millar, Eric B. Papas, Jannick P. Rolland, Tannin A. Schmidt, Ulrike Stahl, Tatiana Suarez, Lakshman N. Subbaraman, Optom, Omür O. Uçakhan, Lyndon Jones. TFOS DEWS II Tear Film Report. *The Ocular Surface* 15 2017; 366-403.
- Markle JG, Frank DN, Mortin-Toth S, Robertson CE, Feazel LM, Rolle-Kampczyk U, von Bergen M, McCoy KD, Macpherson AJ, Danska JS. Sex differences in the gut



microbiome drive hormone-dependent regulation of autoimmunity. *Science* 2013; 339: 1084–8.

Masui R, Sasaki M, Funaki Y, Ogasawara N, Mizuno M, Iida A, Izawa S, Kondo Y, Ito Y, Tamura Y, Yanamoto K, Noda H, Tanabe A, Okaniwa N, Yamaguchi Y, Iwamoto T, Kasugai K. G protein-coupled receptor 43 moderates gut inflammation through cytokine regulation from mononuclear cells. *Inflamm Bowel Dis* 2013;19(13):2848–2856.

Mathews PM, Hahn S, Hessen M, Kim J, Grader-Beck T, Birnbaum J, Baer AN, Akpek EK. Ocular complications of primary Sjögren syndrome in men. *Am J Ophthalmol*. 2015;160(3):447e5

Mazmanian SK, Liu CH, Tzianabos AO, Kasper DL: An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell* 2005; 122: 107–118.

Mazmanian SK, Round JL, Kasper DL: A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature* 2008; 453:620–625.

Mellman I, Steinman RM. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 2001; 106:255–258

Mendez, R., Watane, A., Farhangi, M. et al. Gut microbial dysbiosis in individuals with Sjögren's syndrome. *Microb Cell Fact* 2020;19: 90.

Menéndez A, Gómez J, Escanlar E, et al. Clinical associations of anti-SSA/Ro60 and anti-Ro52/TRIM21 antibodies: Diagnostic utility of their separate detection. *Autoimmunity* 2013; 46:32.

Meng ID, Kurose M. The role of corneal afferent neurons in regulating tears under normal and dry eye conditions. *Exp Eye Res*. 2013; 117:79e87

Meng Z, Klingam W, Edman MC, Hamm-Alvarez SF. Interferon- $\gamma$  treatment in vitro elicits some of the changes in cathepsin S and antigen presentation characteristic of lacrimal glands and corneas from the NOD mouse model of Sjögren's Syndrome. *PLoS One*. 2017 Sep 13;12(9):e0184781. doi: 10.1371/journal.pone.0184781. PMID: 28902875; PMCID: PMC5597228.

Menzies KL, Srinivasan S, Prokopich CL, Jones L. Infrared imaging of meibomian glands and evaluation of the lipid layer in Sjögren's syndrome patients and nondry eye controls. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015; 56(2):836e41

Milic VD, Petrovic RR, Boricic IV, Marinkovic-Eric J, Radunovic GL, Jeremic PD, Pejnovic NN, Damjanov NS. Diagnostic value of salivary gland ultrasonographic scoring system in primary Sjogren's syndrome: a comparison with scintigraphy and biopsy. *J Rheumatol*. 2009 Jul;36(7):1495–500. doi: 10.3899/jrheum.081267. Epub 2009 Jun 1. PMID: 19487274.

Mofors J, Arkema EV, Björk A, Westermark L, Kvarnström M, Forsblad-d'Elia H, Bucher SM, Eriksson P, Mandl T, Nordmark G, Wahren-Herlenius M. Infections increase the risk of developing Sjögren's syndrome. *J Intern Med* 2019; 285: 670–80.

Moon J, Choi SH, Yoon CH, Kim MK. Gut dysbiosis is prevailing in Sjögren's syndrome and is related to dry eye severity. *PLoS One*. 2020;15(2):e0229029.

- Moreno C . M&T – Manuales y Tesis SEA, vol. 1. Primera Edición: 2001 Título del volumen: Métodos para medir la biodiversidad ISSN (colección): 1576 – 9526 ISBN (volumen): 84 – 922495 – 2 – 8 Depósito Legal: Z– 2655 – 2000.
- Morgan WS, Castleman B. A clinicopathologic study of Mikulicz's disease. *Am J Pathol* 1953; 29:471.
- Mossel E, Delli K, van Nimwegen JF, Stel AJ, Kroese FGM, Spijkervet FKL, Vissink A, Arends S, Bootsma H; EULAR US-pSS Study Group. Ultrasonography of major salivary glands compared with parotid and labial gland biopsy and classification criteria in patients with clinically suspected primary Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis*. 2017 Nov;76(11):1883-1889. doi: 10.1136/annrheumdis-2017-211250. Epub 2017 Jul 28. PMID: 28754802.
- Muccioli GG, Naslain D, Bäckhed F, Reigstad CS, Lambert DM, Delzenne NM, Cani PD: The endocannabinoid system links gut microbiota to adipogenesis. *Mol Syst Biol* 2010, 6:392–405.
- Morita R, Schmitt N, Bentebibel SE, Ranganathan R, Bourdery L, Zurawski G, Foucat E, Dullaers M, Oh S, Sabzghabaei N, Lavecchio EM, Punaro M, Pascual V, Banchereau J, Ueno H. Human blood CXCR5(+) CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. *Immunity* 34 (1) 2011; 108–121.
- Nagler-Anderson C. Man the barrier! Strategic defences in the intestinal mucosa. *Nat Rev Immunol* 2001;1:59-67
- Neu J, Lorca G, Kingma SDK, Triplett EW: The Intestinal Microbiome: Relationship to Type 1. *Diabetes* 2010, 39:563–571.
- Niemelä RK, Pääkkö E, Suramo I, Takalo R, Hakala M. Magnetic resonance imaging and magnetic resonance sialography of parotid glands in primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum*. 2001 Dec;45(6):512-8. doi: 10.1002/1529-0131(200112)45:6<512::aid-art376>3.0.co;2-r. PMID: 11762685.
- Nocturne G, Mariette X. Advances in understanding the pathogenesis of primary Sjögren's syndrome. *Nat Rev Rheumatol*. 2013 Sep;9(9):544-56. doi: 10.1038/nrrheum.2013.110. Epub 2013 Jul 16. PMID: 23857130.
- Nocturne G, Mariette X. Sjögren Syndrome-associated lymphomas: an update on pathogenesis and management. *Br J Haematol* 2015; 168:317.
- Nordmark, G.; Kristjansdottir, G.; Theander, E.; Eriksson, P.; Brun, J.G.; Wang, C.; Padyukov, L.; Truedsson, L.; Alm, G.; Eloranta, M.L.; et al. Additive effects of the major risk alleles of IRF5 and STAT4 in primary Sjögren's syndrome. *Genes Immun*. 2009, 10, 68–76)
- Ogawa Y, Kuwana M, Yamazaki K, Mashima Y, Yamada M, Mori T, Okamoto S, Oguchi Y, Kawakami Y. Periductal area as the primary site for T-cell activation in lacrimal gland chronic graft-versus-host disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003 May;44(5):1888-96. doi: 10.1167/iops.02-0699. PMID: 12714620.
- Ogawa Y, Yamazaki K, Kuwana M, Mashima Y, Nakamura Y, Ishida S, Toda I, Oguchi Y, Tsubota K, Okamoto S, Kawakami Y. A significant role of stromal fibroblasts in

- rapidly progressive dry eye in patients with chronic GVHD. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001 Jan;42(1):111-9. PMID: 11133855.
- Ohland CL, Macnaughton WK: Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010; 298:G807–G819.
- Olszak T, An D, Zeissig S, Vera MP, Richter J, Franke A, Glickman JN, Siebert R, Baron RM, Kasper DL, Blumberg RS. Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. *Science* 2012; 336:489–93. doi:10.1126/science.1219328
- Omenetti S, Pizarro TT. The Treg/Th17 axis: a dynamic balance regulated by the gut microbiome. *Front Immunol* 2015; 6:639.
- Paassen BN, Vincent A, Puiman PJ, van der Sluis M, Bouma J, Boehm G, van Goudoever JB, van Seuningen I, Renes IB: The regulation of intestinal mucin MUC2 expression by short-chain fatty acids: implications for epithelial protection. *Biochem J* 2009; 420:211–219.
- Pawlina, Wojciech; Ross, Michael H. Spa-Ross histologia texto y at. ISBN 10: 8417602658 ISBN 13: 9788417602659 Editorial: LIPPINCOTT RAVEN, 2020
- Peck AB, Nguyen CQ. What can Sjögren's syndrome-like disease in mice contribute to human Sjögren's syndrome? *Clin Immunol.* 2017 Sep;182:14-23. doi: 10.1016/j.clim.2017.05.001. Epub 2017 May 3. PMID: 28478104; PMCID: PMC5763483.
- Per Brandtzaeg *Immunological Investigations*, 39:303–355, 2010 Copyright © Informa Health 0131003680369
- Percival RS, Challacombe SJ, Marsh PD. Flow rates of resting whole and stimulated parotid saliva in relation to age and gender. *J Dent Res.* 1994 Aug;73(8):1416-20. doi: 10.1177/00220345940730080401. PMID: 8083437.
- Pruesse E, Quast C, Knittel K, Fuchs BM, Ludwig W, Peplies J, Glöckner FO. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(21):7188-96.
- Qin B, Wang J, Yang Z, Yang M, Ma N, Huang F, Zhong R. Epidemiology of primary Sjögren's syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Ann Rheum Dis* 2015; 74: 1983–9.
- Quince C., Walker A.W., Simpson J.T., Loman N.J., Segata N. Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. *Nat. Biotechnol.* 2017;35:833–844.
- Radfar L, Kleiner DE, Fox PC, Pillemer SR. Prevalence and clinical significance of lymphocytic foci in minor salivary glands of healthy volunteers. *Arthritis Rheum* 2002; 47:520.
- Radjabzadeh, D.; Boer, C.G.; Beth, S.A.; Van Der Wal, P.; Jong, J.C.K.-D.; Jansen, M.A.E.; Konstantinov, S.R.; Peppelenbosch, M.P.; Hays, J.P.; Jaddoe, V.W.; et al. Diversity, compositional and functional differences between gut microbiota of children and adults. *Sci. Rep.* 2020, 10, 1–13.

- Ramiro-Puig E, Pérez-Cano FJ, Castellote C, Franch A, Castell M. El intestino: pieza clave del sistema inmunitario [The bowel: a key component of the immune system]. *Rev Esp Enferm Dig.* 2008 Jan;100(1):29-34. Spanish. doi: 10.4321/s1130-01082008000100006. PMID: 18358058.
- Ramos-Casals M, García-Carrasco M, Brito MP, et al. Autoimmunity and geriatrics: clinical significance of autoimmune manifestations in the elderly. *Lupus* 2003; 12:341.
- Ramos-Casals M, Brito-Zerón P, García-Carrasco M, Font J. Sarcoidosis or Sjögren syndrome? Clues to defining mimicry or coexistence in 59 cases. *Medicine (Baltimore)* 2004; 83:85.
- Ramos-Casals M, Loustaud-Ratti V, De Vita S, et al. Sjögren syndrome associated with hepatitis C virus: a multicenter analysis of 137 cases. *Medicine (Baltimore)* 2005; 84:81.
- Ramos-Casals M, Solans R, Rosas J, Camps MT, Gil A, del Pino-Montes J, Calvo-Alen J, Jiménez-Alonso J, Micó ML, Beltrán J, Belenguer R, Pallarés L, and the GEMESS Study Group. Primary Sjögren syndrome in Spain: clinical and immunologic expression in 1010 patients. *Medicine (Baltimore)*. 2008;87(4):210e9
- Rasmussen A, Stone DU, Kaufman CE, Hefner KS, Fram NR, Siatkowski RL, Huang AJW, Chodosh J, Rasmussen PT, Fife DA, Pezant N, Grundahl K, Radfar L, Lewis DM, Weisman MH, Venuturupalli S, Wallace DJ, Rhodus NL, Brennan MT, Montgomery CG, Lessard CJ, Scofield RH, Sivils KL. Reproducibility of Ocular Surface Staining in the Assessment of Sjögren Syndrome-Related Keratoconjunctivitis Sicca: Implications on Disease Classification. *ACR Open Rheumatol.* 2019 Jul;1(5):292-302. doi: 10.1002/acr2.1033. Epub 2019 Jun 7. PMID: 31453437; PMCID: PMC6710016.
- Retamozo S, Akasbi M, Brito-Zerón P, et al. Anti-Ro52 antibody testing influences the classification and clinical characterisation of primary Sjögren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 2012; 30:686.
- Rocha EM, Alves M, Rios JD, Dartt DA. The aging lacrimal gland: changes in structure and function. *Ocul Surf.* 2008;6(4):162e74.
- Romero-Rangel T, Stavrou P, Cotter J, et al. Gas-permeable scleral contact lens therapy in ocular surface disease. *Am J Ophthalmol* 2000; 130:25.
- Rook GA, Brunet LR: Microbes, immunoregulation, and the gut. *Gut* 2005; 54:317–320.
- Round, J. L., and Mazmanian, S. K. Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010; 107:12204–12209.
- Rúa Figueroa I, Calvo J, Cuadrado MJ, Freire MM, Martínez-Taboada VM, Muñoz S, Úcar E. Manual SER de diagnóstico y tratamiento de las enfermedades reumáticas autoinmunes sistémicas. 2014. Sociedad Española de Reumatología (SER). ISBN edición impresa: 978-84-9022-857-9
- Rusthen S, Kristoffersen AK, Young A, Galtung HK, Petrovski BÉ, Palm Ø, Enersen M, Jensen JL. Dysbiotic salivary microbiota in dry mouth and primary Sjögren's

- syndrome patients. *PLoS One*. 2019 Jun 18;14(6):e0218319. doi: 10.1371/journal.pone.0218319. PMID: 31211815; PMCID: PMC6581286.
- Säemann MD, Böhmig GA, Osterreicher CH, Burtscher H, Parolini O, Diakos C, Stöckl J, Hörl WH, Zlabinger GJ. Anti-inflammatory effects of sodium butyrate on human monocytes: potent inhibition of IL-12 and up-regulation of IL-10 production. *The FASEB Journal*,2000; 14(15):2380–2382.
- Salvo-Romero Eloisa, Carmen Alonso-Cotoner, Cristina Pardo-Camacho, Maite Casado-Bedmar y María Vicario. Función barrera intestinal y su implicación en enfermedades digestivas *Rev esp enferm dig* Vol. 107, N.º 11, pp. 686-696, 2015
- Sapone a. Zonulin Upregulation Is Associated With Increased Gut Permeability in Subjects With Type 1 Diabetes and Their Relatives. *Diabetes*. 2006; 55(5):1443–9
- Scharschmidt TC, Vasquez KS, Truong HA, Gearty SV, Pauli ML, Nosbaum A, Gratz IK, Otto M, Moon JJ, Liese J, Abbas AK, Fischbach MA, Rosenblum MD. A wave of regulatory T cells into neonatal skin mediates tolerance to commensal microbes. *Immunity* 2015; 43:1011–21.
- Schwartz LM, Woloshin S. A Clear-eyed View of Restasis and Chronic Dry Eye Disease. *JAMA Intern Med* 2018; 178:181.
- Schoenborn JR, Wilson CB. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol*. 2007;96:41-101. doi: 10.1016/S0065-2776(07)96002-2. PMID: 17981204.
- Schulzke JD, Ploeger S, Amasheh M, Fromm A, Zeissig S, Troeger H, Richter J, Bojarski C, Schumann M, Fromm M. Epithelial tight junctions in intestinal inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1165:294---300.
- Scott J. Qualitative and quantitative observations on the histology of human labial salivary glands obtained post mortem. *J Biol Buccale* 1980; 8:187.
- Serreze DV, Post CM, Chapman HD, Johnson EA, Lu B, Rothman PB: Interferon-gamma receptor signaling is dispensable in the development of autoimmune type 1 diabetes in NOD mice. *Diabetes* 2000; 49:2007–2011
- Shah D, Sah S, Nath SK. Interaction between glutathione and apoptosis in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev*. 2013;12(7):741-751.
- Shakya M., Lo C.C., Chain P.S.G. Advances and Challenges in Metatranscriptomic Analysis. *Front. Genet*. 2019;10:904.
- Sharma R, Zheng L, Guo X, Fu SM, Ju ST, Jarjour WN. Novel animal models for Sjögren's syndrome: expression and transfer of salivary gland dysfunction from regulatory T cell-deficient mice. *J Autoimmun*. 2006 Dec;27(4):289-296. doi: 10.1016/j.jaut.2006.11.003. Epub 2007 Jan 3. PMID: 17207605; PMCID: PMC3970716.
- Sharma D, Sandhya P, Vellarikkal SK, Surin AK, Jayarajan R, Verma A, Kumar A, Ravi R, Danda D, Sivasubbu S, Scaria V. Saliva microbiome in primary Sjögren's syndrome reveals distinct set of disease-associated microbes. *Oral Dis*. 2020 Mar;26(2):295-301. doi: 10.1111/odi.13191. Epub 2020 Jan 10. PMID: 31514257.

- Shen L, Suresh L, Lindemann M, et al. Novel autoantibodies in Sjogren's syndrome. *Clin Immunol* 2012; 145:251.
- Sheppard JD, Torkildsen GL, Geffin JA, et al. Characterization of tear production in subjects with dry eye disease during intranasal tear neurostimulation: Results from two pivotal clinical trials. *Ocul Surf* 2019; 17:142.
- Sher J., Sczesnak A., Longman R., Segata N., Ubeda C., Bielski C., et al. Expansion of intestinal *Prevotella copri* correlates with enhanced susceptibility to arthritis. *Elife* 2013;2: e01202.
- Shiboski sc, Shiboski CH, Criswell LA, Baer AN, Challacombe S, Lanfranchi H, Schidt M, Umehara H, Vivino F, Zhao Y, Dong Y, Greenspan D, Heidenreich AM, Helin P, Kirkham B, Kitagawa K, Larkin G, Li M, Lietman T, Lindegaard J, Mcnamara N, Sack K, Shirlaw P, Sugai S, Vollenweider C, Witcher J, Wu A, Zhang S, Zhang W, Greenspan JS, Daniels TE. American College of Rheumatology classification criteria for Sjögren's syndrome: a data-driven, expert consensus approach in the Sjögren's International Collaborative Clinical Alliance Cohort. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 64: 475–487.
- Shiboski CH, Shiboski SC, Seror R, Criswell LA, Labetoulle M, Lietman TM, Rasmussen A, Scofield H, Vitali C, Bowman SJ, Mariette X; International Sjögren's Syndrome Criteria Working Group. American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism classification criteria for primary Sjögren's syndrome: A consensus and data-driven methodology involving three international patient cohorts. *Ann Rheum Dis.* 2017;76(1):9-16
- Siddiqui H, Chen T, Aliko A, Mydel PM, Jonsson R, Olsen I. Microbiological and bioinformatics analysis of primary Sjögren's syndrome patients with normal salivation. *J Oral Microbiol* 2016; 8: 31119.
- Silman AJ, MacGregor AJ, Thomson W, HOLLIGAN S, CARTHY D, FARHAN A, OLLIER WER. Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study. *Br J Rheumatol* 1993; 32: 903–7.
- Singh N, Gurav A, Sivaprakasam S, Brady E, Padia R, Shi H, Thangaraju M, Prasad PD, Manicassamy S, Munn DH, Lee JR, Offermanns S, Ganapathy V. Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis. *Immunity.* 2014; 40(1):128-39.
- Singh R, Lei P, Andreadis ST: PKC- $\delta$  binds to E-cadherin and mediates EGF-induced cell scattering. *Exp Cell Res* 2009; 315:2899–2913.
- Sjögren H. Zur Kenntnis der Keratoconjunctivitis sicca. *Acta Ophthalmomol* 1933; 11(suppl II):1.
- Slack E, Hapfelmeier S, Stecher B, Velykoredko Y, Stoel M, Lawson MA, Geuking MB, Beutler B, Tedder TF, Hardt WD, Bercik P, Verdu EF, McCoy KD, Macpherson AJ: Innate and adaptive immunity cooperate flexibly to maintain host-microbiota mutualism. *Science* 2009; 325: 617–620
- Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, et al. Faecalibacterium *prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105:16731-36.

- Spalding MD, Prigge ST. Lipoic acid metabolism in microbial pathogens. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2010;74(2):200-228.
- Stevenson W, Pugazhendhi S, Wang M. Is the main lacrimal gland indispensable? Contributions of the corneal and conjunctival epithelia. *Surv Ophthalmol.* 2016;61(5):616e27
- Sturgeon C, Fasano A. Zonulin, a regulator of epithelial and endothelial barrier functions, and its involvement in chronic inflammatory diseases. *Tissue Barriers.* 2016; 4(4):e1251384.
- Su T, Liu R, Lee A, et al. Altered Intestinal Microbiota with Increased Abundance of *Prevotella* Is Associated with High Risk of Diarrhea-Predominant Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterol Res Pract.* 2018; 2018:6961783
- Sullivan DA, Dana R, Sullivan RM, Krenzer KL, Sahin A, Arica B, Liu Y, Kam WR, Papas AS, Cermak JM. Meibomian Gland Dysfunction in Primary and Secondary Sjögren Syndrome. *Ophthalmic Res.* 2018;59(4):193e205 .
- Szymula A, Rosenthal J, Szczerba BM, Bagavant H, Fu SM, Deshmukh US. T cell epitope mimicry between Sjögren's syndrome antigen A (SSA)/Ro60 and oral, gut, skin and vaginal bacteria. *Clin Immunol* 2014; 152:1–9.
- Takahashi H, Asano K, Nakamura S, Ishida-Yamamoto A, Iizuka H. Interferon-gamma-dependent stimulation of human involucrin gene expression: STAT1 (signal transduction and activators of transcription 1) protein activates involucrin promoter activity. *Biochem J.* 1999 Dec 15;344 Pt 3(Pt 3):797-802. PMID: 10585866; PMCID: PMC1220701.
- Tamanai-Shacoori Z, Smida I, Bousarghin L, et al. Roseburia spp.: a marker of health? *Future Microbiol* 2017; 12: 157-70.
- Tan EM. Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv Immunol* 1989; 44:93.
- Theander E, Henriksson G, Ljungberg O, et al. Lymphoma and other malignancies in primary Sjögren's syndrome: a cohort study on cancer incidence and lymphoma predictors. *Ann Rheum Dis* 2006; 65:796.
- Thorne I, Sutcliffe N, Sjögren's Syndrome. *Br J Hosp Med (Lond)* 2017 Aug 2;78(8):438-442. doi: 10.12968/hmed.2017.78.8.438
- Torrente-Segarra V, Corominas H, Sánchez-Piedra C, et al. Fibromyalgia prevalence and associated factors in primary Sjögren's syndrome patients in a large cohort from the Spanish Society of Rheumatology registry (SJOGRENSER). *Clin Exp Rheumatol* 2017; 35 Suppl 105:28.
- Tsubota K, Xu KP, Fujihara T, Katagiri S, Takeuchi T. Decreased reflex tearing is associated with lymphocytic infiltration in lacrimal glands. *J Rheumatol.* 1996;23(2):313e20
- Tsubota K, Goto E, Fujita H, et al. Treatment of dry eye by autologous serum application in Sjögren's syndrome. *Br J Ophthalmol* 1999; 83:390.
- Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 2009; 457: 480–484.

- Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2009; 9(11):799-809.
- Tzamalīs A, Matsou A, Anastasopoulos E, Ziakas N. Treatment of spontaneous corneal perforation secondary to undiagnosed Sjögren's syndrome using regenerating agent and autologous serum eye drops. *Eur J Ophthalmol.* 2021 Jan;31(1):NP17-NP21. doi: 10.1177/1120672119853106. Epub 2019 May 29. PMID: 31137968.
- Ubeda C, Pamer EG. Antibiotics, microbiota, and immune defense. *Trends in Immunology* September 2012; 33(9):459-66
- Ulf-Møller CJ, Svendsen AJ, Viemose LN, Jacobsen S. Concordance of autoimmune disease in a nationwide Danish systemic lupus erythematosus twin cohort. *Semin Arthritis Rheum* 2018; 47: 538–44.
- Vaarala O, Atkinson MA, Neu J: The “perfect storm” for type 1 diabetes - the complex interplay between intestinal microbiota, gut permeability, and mucosal immunity. *Diabetes* 2008; 57:2555–2562.
- Vaishnava S, Behrendt CS, Ismail AS, Eckmann L, Hooper LV. Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008; 105, 20858–20863
- Van Bijsterveld OP. Diagnostic tests in the Sicca syndrome. *Arch Ophthalmol.* 1969 Jul;82(1):10-4. doi: 10.1001/archopht.1969.00990020012003. PMID: 4183019.
- Van der Meulen, HJM Harmsen, H Bootsma, FKL Spijkervet, FGM Kroese, A Vissink. INVITED MEDICAL REVIEW. The microbiome–systemic diseases connection. *Oral Diseases* 2016;
- Van der Meulen TA, Harmsen HJM, Bootsma H, Liefers SC, Vila AV, Zhernakova A, Fu J, Wijmenga C, Spijkervet FKL, Kroese FGS, Vissink A. Dysbiosis of the buccal mucosa microbiome in primary Sjögren’s syndrome patients. *Rheumatology (Oxford)* 2018; 57: 2225–34.
- Van der Meulen TA, Harmsen HJM, Bootsma H, Liefers SC, Vila AV, Zhernakova A, Weersma RK, Spijkervet FKL, Kroese FGS, Vissink A. Reduced salivary secretion contributes more to changes in the oral microbiome of patients with primary Sjögren’s syndrome than underlying disease. *Ann Rheum Dis* 2018; 77: 1542–4. BIS
- Van der Meulen TA, Harmsen HJM, Vila AV, Kurilshikov A, Liefers SC, Zhernakova A, Fu J, Wijmenga C, Weersma RK, de Leeuw K, Bootsma H, Spijkervet FKL, Vissink A, Kroese FGM. Shared gut, but distinct oral microbiota composition in primary Sjögren’s syndrome and systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun* 2019; 97: 77–87.
- Van der Meulen TA, van Nimwegen JF, Harmsen HJM, Liefers SC, van der Tuuk K, Kroese FGM, Mourits MJE, Vissink A, Bootsma H. Normal vaginal microbiome in women with primary Sjögren’s syndrome-associated vaginal dryness. *Ann Rheum Dis* 2019; 78: 707–9. BIS
- Van der Worp E, Bornman D, Ferreira DL, et al. Modern scleral contact lenses: A review. *Cont Lens Anterior Eye* 2014; 37:240.
- Van Nimwegen JF, Mossel E, Delli K, van Ginkel MS, Stel AJ, Kroese FGM, Spijkervet FKL, Vissink A, Arends S, Bootsma H. Incorporation of Salivary Gland Ultrasonography



Into the American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism Criteria for Primary Sjögren's Syndrome. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2020 Apr;72(4):583-590. doi: 10.1002/acr.24017. PMID: 31254454; PMCID: PMC7155092.

Varela-Centelles P, Sanchez-Sanchez M, Seoane J. Lip biopsy for the diagnosis of Sjögren's syndrome: beware of the punch. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2014 Jan;43(1):127-30. doi: 10.1016/j.ijom.2013.05.014. Epub 2013 Jul 6. PMID: 23838523.

Verstappen GM, Corneth OBJ, Bootsma H, Kroese FGM. Th17 cells in primary Sjögren's syndrome: Pathogenicity and plasticity. *J Autoimmun*. 2018 Feb;87:16-25. doi: 10.1016/j.jaut.2017.11.003. Epub 2017 Nov 27. PMID: 29191572.

Villani E, Magnani F, Viola F, Santaniello A, Scorza R, Nucci P, Ratiglia R. In vivo confocal evaluation of the ocular surface morpho-functional unit in dry eye. *Optom Vis Sci*. 2013;90(6):576e86

Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, Daniels TE, Fox PC, Fox RI, Kassan SS, Pillemer SR, Talal N, Weisman MH, and the European Study Group on Classification Criteria for Sjögren's Syndrome. 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(6):554-8

Vrabec MP, Elsing SH, Aitken PA. A prospective, randomized comparison of thermal cautery and argon laser for permanent punctal occlusion. *Am J Ophthalmol* 1993; 116:469.

Wang C, Zaheer M, Bian F, Quach D, Swennes AG, Britton RA, Pflugfelder SC, de Paiva CS. Sjögren-Like Lacrimal Keratoconjunctivitis in Germ-Free Mice. *Int J Mol Sci*. 2018 Feb 13;19(2):565. doi: 10.3390/ijms19020565. PMID: 29438346; PMCID: PMC5855787.

Wang W, Uzzau S, Goldblum SE, Fasano A. Human zonulin, a potential modulator of intestinal tight junctions. *J Cell Sci*. 2000;113 Pt 24:4435-40.

Warner BM, Baer AN, Lipson EJ, et al. Sicca Syndrome Associated with Immune Checkpoint Inhibitor Therapy. *Oncologist* 2019; 24:1259.

West CE, Renz H, Jenmalm MC, Kozyrskyj AL, Allen KJ, Vuillermin P, Prescott SL; in-FLAME Microbiome Interest Group. The gut microbiota and inflammatory noncommunicable diseases: associations and potentials for gut microbiota therapies. *J Allergy Clin Immunol* 2015; 135(1):3-13.

Whitcher JP, Shiboski CH, Shiboski SC, Heidenreich AM, Kitagawa K, Zhang S, Hamann S, Larkin G, McNamara NA, Greenspan JS, Daniels TE; Sjögren's International Collaborative Clinical Alliance Research Groups. A simplified quantitative method for assessing keratoconjunctivitis sicca from the Sjögren's Syndrome International Registry. *Am J Ophthalmol*. 2010 Mar;149(3):405-15. doi: 10.1016/j.ajo.2009.09.013. Epub 2009 Dec 29. PMID: 20035924; PMCID: PMC3459675.

Willis J.R., Gabaldón T. The Human Oral Microbiome in Health and Disease: From Sequences to Ecosystems. *Microorganisms*. 2020;8:308

- Winslet MC, Poxon V, Allan A, et al. Mucosal glucosamine synthetase activity in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 1994;39(3):540-4).
- Wu H-J, Ivanov II, Darce J, Hattori K, Shima T, Umesaki Y, Littman DR, Benoist C, Mathis D. Gut-residing segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells. *Immunity* 2010; 32:815–27.
- Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2007; 448:427-434
- Xu M, Jiang Y, Wang J, Liu D, Wang S, Yi H, Yang S. Distribution of distinct subsets of circulating T follicular helper cells in Kawasaki disease, *BMC Pediatrics* 2019; 19(1)
- Yamamoto EA, Jørgensen TN. Relationships Between Vitamin D, Gut Microbiome, and Systemic Autoimmunity. *Front Immunol.* 2020 Jan 21;10:3141. doi: 10.3389/fimmu.2019.03141. PMID: 32038645; PMCID: PMC6985452.
- Yasunaga H, Takeshita T, Shibata Y, Furuta M, Shimazaki Y, Akifusa S, et al. Exploration of bacterial species associated with the salivary microbiome of individuals with a low susceptibility to dental caries. *Clin Oral Investig.* 2017; 21: 2399–2406. <https://doi.org/10.1007/s00784-016-2035-5> PMID: 28013437
- Yoon KC, Heo H, Im SK, et al. Comparison of autologous serum and umbilical cord serum eye drops for dry eye syndrome. *Am J Ophthalmol* 2007; 144:86.
- Youinou P, Pers JO. Disturbance of cytokine networks in Sjögren's syndrome. *Arthritis Res Ther.* 2011 Jul 6;13(4):227. doi: 10.1186/ar3348. PMID: 21745420; PMCID: PMC3239335.
- Yoshimoto K, Tanaka M, Kojima M, Setoyama Y, Kameda H, Suzuki K, Tsuzaka K, Ogawa Y, Tsubota K, Abe T, Takeuchi T. Regulatory mechanisms for the production of BAFF and IL-6 are impaired in monocytes of patients of primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Res Ther.* 2011;13(5):R170. doi: 10.1186/ar3493. Epub 2011 Oct 21. PMID: 22018243; PMCID: PMC3308105.
- Zaheer M, Wang C, Bian F, Yu Z, Hernandez H, de Souza RG, Simmons KT, Schady D, Swennes AG, Pflugfelder SC, Britton RA, de Paiva CS. Protective role of commensal bacteria in Sjögren Syndrome. *J Autoimmun.* 2018;Sep;93:45-56. doi: 10.1016/j.jaut.2018.06.004. Epub 2018 Jun 20.
- Zaneveld, J.\*; Caporaso, J. G.; McDonald, D.; Knights, D.; a Reyes, J.; Clemente, J. C.; Burkepille, D. E.; Vega Thurber, R. L.; Knight, R.; Beiko, R. G.; and Huttenhower, C. *Nature Biotechnology*, 1-10. 8 2013.).
- Zhang X, Chen W, De Paiva CS, Corrales RM, Volpe EA, McClellan AJ, Farley WJ, Li DQ, Pflugfelder SC. Interferon- $\gamma$  exacerbates dry eye-induced apoptosis in conjunctiva through dual apoptotic pathways. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011 Aug 9;52(9):6279-85. doi: 10.1167/iovs.10-7081. PMID: 21474767; PMCID: PMC3176027.
- Zhong D, Wu C, Zeng X, Wang Q. The role of gut microbiota in the pathogenesis of rheumatic diseases. *Clin Rheumatol.* 2018;37(1):25–34.

- Zhou Z, Ling G, Ding N, Xun Z, Zhu C, Hua H, et al. Molecular analysis of oral microflora in patients with primary Sjögren's syndrome by using high-throughput sequencing. *PeerJ*. 2018; 6: e5649. <https://doi.org/10.7717/peerj.5649> PMID: 30280027
- Zou Y, Xue W, Luo G, Deng Z, Qin P, Guo R, et al. 1,520 reference genomes from cultivated human gut bacteria enable functional microbiome analyses. *Nat Biotechnol*. 2019;37(2):179-185.

## ANEXOS

---

### Anexo 1. Datos demográficos del paciente

#### Hoja de recogida de datos

#### Estudio: microbiota intestinal en síndrome de sjögren primario.

- Nombre:
- Teléfono:
- Fecha nacimiento: -/-/ - Edad: x años
- Tipo Parto: vaginal
- Peso al nacimiento: ----- gramos
- ¿Tomó lactancia materna? SI/ NO ¿Cuántos meses?
- ¿Recibió antibiótico en los primeros 6 meses de vida? Si/NO. ¿Cuál y por qué motivo?
- ¿Tiene o ha tenido animales en domicilio? SI/NO ¿Cuáles?
- ¿Vive en zona rural o urbana?
- Peso actual: KG
- Talla actual:
- Antecedentes: Reseñar si la niña o algún familiar presentan enfermedades de tipo autoinmune (dermatitis atópica, asma alérgico, celiaquía, diabetes, enfermedad Crohn, artritis reumatoide...) u otras enfermedades importantes: SI/NO
- Antecedentes personales de interés:
  
- Antecedentes familiares de interés:

## **Anexo 2. Hoja de información al paciente**

### **Páginas de información al paciente**

Centro: Hospital la Arruzafa. Unidad de córnea y segmento anterior (UCSA).

Dirección: Av. de la Arruzafa, 9.

14012 Córdoba. Teléfono: 957 767610

Médicos que informan: D. A Cano

### **Estudio para evaluar la microbiota fecal en pacientes con síndrome de Sjögren primario comparado con adultos sanos.**

Estimado Sr/Sra:

Le invitamos a participar en el estudio “Análisis de la microbiota intestinal en pacientes con síndrome de Sjögren primario comparado con adultos sanos, que se describe en las páginas siguientes.

El formulario actual tiene dos partes:

-una hoja de información para compartirla con Ud (la conservará Ud consigo) y una hoja de consentimiento firmado para participar si decide hacerlo.

#### **INFORMACIÓN**

Introducción: La microbiota fecal nos permite conocer la microbiota intestinal que habita en cada individuo. Se sabe que cada individuo tiene una microbiota intestinal diferente.

La microbiota intestinal más conocida como flora intestinal, se conoce como el conjunto de microorganismos que habitan en nuestro intestino. En un pasado no muy lejano, se postulaba que eran huéspedes silenciosos. Actualmente se conoce que no son silenciosos sino que tienen un papel importante tanto en la configuración de nuestro sistema inmune así como en la producción calórica y en el desarrollo de algunas enfermedades autoinmunes.

Existen múltiples factores que condicionan las diferencias en microbiota intestinal en diferentes individuos como la vía del parto, el número de hermanos, la convivencia con animales, el tipo de vida rural/urbana, el uso de antibióticos, la higiene materna en el periodo neonatal, la lactancia materna versus artificial, la prematuridad... entre otros.

Se sabe que el apéndice tiene un papel destacado en la configuración de la microbiota fecal.

Objetivo: Estudiar la composición de la microbiota intestinal intestinal en pacientes con síndrome de Sjögren primario comparado con adultos sanos.

Para el estudio de microbiota intestinal se recoge una muestra de heces que requiere un procesamiento concreto. La muestra de heces se recogerá en las 24 horas previas de su entrega y hasta su entrega se mantendrá conservada en congelador a -20°C. A su entrega se conservará a -70°C hasta su análisis por secuenciación en el instituto de investigación biomédica de Málaga (IBIMA). Como preparación en el mes previo a la recogida de la muestra, el paciente no debe tomar antibióticos ni pro/prebióticos ni ningún alimento que los contenga (actimel®, activia®, etc)

Participación voluntaria: La participación en el estudio es totalmente voluntaria. Sólo se podrá participar si el paciente da consentimiento oral y por escrito. Si no lo desean, incluso con el estudio ya iniciado, se puede retirar el consentimiento sin consecuencias.

Si no comprende algún concepto o procedimiento, no dude en consultar. Si prefiere meditar un poco más la decisión de participar en el estudio, puede tomarse el tiempo que estime oportuno.

Riesgos y beneficios. No se esperan riesgos adicionales derivados de su participación en este estudio. No se esperan beneficios inmediatos derivados de su participación en este estudio. Con la realización de este estudio se esperan ampliar los conocimientos sobre los factores que influyen en la conformación de la microbiota intestinal así como de las posibles consecuencias que puede tener en la modificación del sistema inmune.

Retribuciones. No se realizará retribución económica por la participación en el estudio.

Confidencialidad. Durante el estudio se mantendrán los máximos niveles de confidencialidad. No se transmitirá ninguna información personal fuera de la propia UCSA y sus profesionales, dado que este estudio se realiza sólo en este centro y no tiene promotor comercial.

Durante la realización del estudio los datos estarán protegidos mediante el estricto cumplimiento de la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre de Protección de Datos de carácter personal.

Derecho a retirarse del estudio. Si desea abandonar el estudio puede informar al personal en cualquier momento. No es necesario indicar los motivos. No sufrirá ninguna penalización en su tratamiento o en su relación con sus profesionales. Los datos recogidos hasta el momento en que abandona el estudio no serán eliminados, y pueden ser analizados a posteriori.

Persona de contacto: D A. Cano . Centro: Hospital la Arruzafa. Tlf: 957767610

**Anexo 3.** Consentimiento informado entregado y firmado por el paciente antes de entrar en el estudio

**Consentimiento informado**

Análisis de la relación entre la microbiota intestinal y el síndrome de Sjögren primario.

Declaración legal: He leído la información anterior (o ha sido leída para mí). He tenido la oportunidad de formular preguntas, y las que he realizado han sido contestadas de forma satisfactoria. Doy mi conformidad para participar de forma voluntaria en este estudio.

Autorizo a que mis datos personales sean procesados tal como se ha expuesto, incluyéndose en ficheros en papel y en formato digital que son propiedad del Centro.

He sido debidamente informado de que mi participación es voluntaria y de que puedo retirar mi consentimiento en cualquier momento, sin desventaja para mí, pero que los datos recogidos hasta ese momento con mi consentimiento previo pueden ser analizados en el estudio.

Los espacios en blanco deben ser cumplimentados a mano por el propio paciente:

Nombre del participante (mayúsculas): Firma y fecha (día/mes/año)

Nombre y apellidos: .....

DNI: .....

Declaración del médico:

He informado de forma precisa al posible participante de todo el contenido de esta hoja de información y he hecho todo lo posible para garantizar que comprenda los procedimientos que se llevarán a cabo en este estudio.

Confirmando que el participante ha tenido la oportunidad de realizar preguntas sobre el estudio, y que han sido respondidas de la mejor forma posible.

El participante ha otorgado su consentimiento de forma libre y voluntaria. Se le ha suministrado una copia del presente formulario firmado y fechado.

Nombre del médico:

Firma y fecha (día/mes/año)



**Revocación de consentimiento**

Análisis de la relación entre la microbiota intestinal y el síndrome de Sjögren primario.

He decidido de forma voluntaria retirarme del estudio “Análisis de la la microbiota intestinal en pacientes con síndrome de Sjögren primario comparado con adultos sanos”

Declaración del tutor legal si procede:

Deseo/ No deseo (elegir lo que proceda) explicar las causas de mi retirada:

.....  
.....

Entiendo que la información sobre mi caso que ya forme parte del estudio no será retirada, y que los responsables del estudio me garantizan su manejo confidencial.

Se me ha explicado apropiadamente que la retirada no supone ninguna merma en la calidad de la atención que venía recibiendo previamente a participar en el estudio, y que paso de nuevo al seguimiento periódico en mi consulta habitual.

Fecha.....

Firmado: ..... DNI:

**Anexo 4.** Aprobación del comité de ética de la investigación provincial de Córdoba.



## DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN PROVINCIAL DE CÓRDOBA

D<sup>a</sup>. Alicia Marmolejo Alcalá, Secretaria Técnica del Comité de Ética de la Investigación Provincial de Córdoba

### CERTIFICA

Que este Comité en virtud de lo previsto en en la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y el Decreto 8/2020, de 30 de enero, por el que se regulan los órganos de ética asistencial y de la investigación biomédica en Andalucía ha evaluado el siguiente proyecto de investigación:

Referencia comité: 4840

Versión y fecha del protocolo: 2.0 – 17/02/2021

Versión y fecha HIP-CI: 2.0 – 26/01/2021

Versión y fecha HIP-CI Biobanco: 1.0 – 17/02/2021

Título: "Connection between the gut microbiome, systemic inflammation, gut permeability and FOXP3 expression in patients with primary Sjogrens syndrome".

Código: SJOGREN-HLA

Investigador Principal: D. Antonio Cano Ortiz

Dpto./Servicio/UGC: Oftalmología. Hospital La Arruzafa

### Y considera:

Que se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y se ajusta a los principios éticos aplicables a este tipo de estudios y recogidos en la Declaración de Helsinki.

Que la capacidad del/de la investigador/a y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Que dicho Comité está constituido y actúa de acuerdo con la normativa vigente y las directrices de la Conferencia Internacional de Buena Práctica Clínica.

Por todo lo anterior, el Comité de Ética de la Investigación Provincial de Córdoba, en su reunión de 24/02/2021 (Acta nº 319), emite **DICTAMEN FAVORABLE**.

De acuerdo con el artículo 18 de la Ley 40/2015, de 1 de octubre, de Régimen Jurídico del Sector Público, la resolución a la que se refiere el punto anterior se emite con anterioridad a la aprobación del acta correspondiente.

Lo que firmo en Córdoba, a 25 de febrero de 2021

Secretaria Técnica

D<sup>a</sup>. Alicia Marmolejo Alcalá

Vº Bº Presidente

D. Javier Caballero Villarraso





Anexo I

COMPOSICION DEL CEI

**PRESIDENTE:**

D. Javier Caballero Villarraso

**VICEPRESIDENTA:**

D<sup>a</sup>. M<sup>a</sup> Esther Pacheco Rodríguez

**SECRETARIA TÉCNICA:**

D<sup>a</sup>. Alicia Marmolejo Alcalá

**VOCALES:**


Rosario M.<sup>a</sup> Arenas Cano  
M<sup>a</sup> Isabel Baena Parejo  
Manuel Jesús Cárdenas Aranzana  
Alfonso Cepeda Almagro  
Marisol de Cristino Espinar  
Sonia García Cabezas  
M<sup>a</sup> Mercedes Gil Campos  
Ana León Acuña  
Eloy Girela López  
Antonio Miguel Luque Pineda  
Antonio Román Mesa Cerda  
Eduardo Morán Fernández  
Juan Manuel Parras Rejano  
Natalia Pérez Fullerat  
Carlos Pérula de Torres  
María Pleguezuelo Navarro  
Enrique Quesada Moraga  
Miguel Ángel Romero Moreno  
Juan Alberto Ruano Ruiz  
Paula Zamora Gálvez

## Anexo 5. Publicación



Article

# Connection between the Gut Microbiome, Systemic Inflammation, Gut Permeability and FOXP3 Expression in Patients with Primary Sjögren's Syndrome

Antonio Cano-Ortiz <sup>1</sup>, Aurora Laborda-Illanes <sup>2,3</sup>, Isaac Plaza-Andrades <sup>2</sup>,  
Alberto Membrillo del Pozo <sup>1</sup>, Alberto Villarrubia Cuadrado <sup>1</sup>,  
Marina Rodríguez Calvo de Mora <sup>4</sup> , Isabel Leiva-Gea <sup>5</sup>, Lidia Sanchez-Alcoholado <sup>2,3,\*</sup>  
and María Isabel Queipo-Ortuño <sup>2,\*</sup> 

<sup>1</sup> Servicio de Oftalmología, Hospital de la Arruzafa. Universidad de Córdoba, 14012 Córdoba, Spain; antoniocanoortiz@gmail.com (A.C.-O.); alberto.membrillo@gmail.com (A.M.d.P.); alvillarrubia@yahoo.com (A.V.C.)

<sup>2</sup> Unidad de Gestión Clínica Intercentros de Oncología Médica, Hospitales Universitarios Regional y Virgen de la Victoria, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA)-CIMES-UMA, 29010 Málaga, Spain; auroralabordaillanes@gmail.com (A.L.-I.); isaacplazaandrade@gmail.com (I.P.-A.)

<sup>3</sup> Facultad de Medicina, Universidad de Málaga, 29071 Málaga, Spain

<sup>4</sup> Servicio de Oftalmología, Hospital Regional Universitario, 29009 Málaga, Spain; marocalmo@gmail.com

<sup>5</sup> Unidad de Endocrinología Pediátrica, Hospital Materno-Infantil, 29009 Málaga, Spain; isabeleiva@hotmail.com

\* Correspondence: l.s.alcoholado@gmail.com (L.S.-A.); maribelqo@gmail.com (M.I.Q.-O.)

Received: 27 October 2020; Accepted: 18 November 2020; Published: 19 November 2020



**Abstract:** The aims of this study were to explore intestinal microbial composition and functionality in primary Sjögren's syndrome (pSS) and to relate these findings to inflammation, permeability and the transcription factor Forkhead box protein P3 (FOXP3) gene expression in peripheral blood. The study included 19 pSS patients and 19 healthy controls matched for age, sex, and body mass index. Fecal bacterial DNA was extracted and analyzed by 16S rRNA sequencing using an Ion S5 platform followed by a bioinformatics analysis using Quantitative Insights into Microbial Ecology (QIIME II) and Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States (PICRUSt). Our data suggest that the gut microbiota of pSS patients differs at both the taxonomic and functional levels with respect to healthy controls. The gut microbiota profile of our pSS patients was characterized by a lower diversity and richness and with Bacteroidetes dominating at the phylum level. The pSS patients had less beneficial or commensal butyrate-producing bacteria and a higher proportion of opportunistic pathogens with proinflammatory activity, which may impair intestinal barrier function and therefore contribute to inflammatory processes associated with pSS by increasing the production of proinflammatory cytokines and decreasing the release of the anti-inflammatory cytokine IL-10 and the peripheral FOXP3 mRNA expression, implicated in the development and function of regulatory T cells (Treg) cells. Further studies are needed to better understand the real impact of dysbiosis on the course of pSS and to conceive preventive or therapeutic strategies to counteract microbiome-driven inflammation.

**Keywords:** primary Sjögren's syndrome; gut microbiota; inflammation; intestinal permeability; FOXP3 expression

## 1. Introduction

Primary Sjögren's syndrome (pSS) is a systemic inflammatory autoimmune disease characterized by chronic inflammation of the exocrine glands, in particular the salivary and lacrimal glands, resulting in oral and ocular dryness (sicca) complaints [1]. Additionally, patients develop fatigue, depression, and inflammation in extraglandular tissues including the brain, lungs, and gastrointestinal tract [2].

The etiology of pSS remains to be elucidated, although both environmental and genetic factors are believed to be involved in the pathogenesis [3]. Individuals with autoimmune diseases such as spondyloarthritis [4], rheumatoid arthritis [5] and lupus erythematosus [6] have been found to have gut microbiome alterations compared to healthy controls. Several recent studies have described differences in the gut and oral microbiota of pSS patients compared with healthy and symptom controls. The study by de Paiva et al. showed a significant increase in *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* accompanied by a decrease in *Leptotrichia* and *Fusobacterium* in the oral mucosa and the tongue samples of SS patients. In addition, high levels of *Lactobacillus* spp. were found in supragingival plaque samples [7]. Concerning gut microbiota, these authors observed depletion of *Faecalibacterium*, *Bacteroides*, *Parabacteroides* and *Prevotella* and enhancement of *Escherichia*, *Shigella*, and *Streptococcus* genera [7]. Mandl et al. found that severe intestinal dysbiosis was more prevalent in pSS patients in comparison to healthy controls and this dysbiosis was associated with clinical and laboratory markers of systemic disease activity and with gastrointestinal inflammation [8].

The gut microbiota is involved in maintaining balance in immune responses between regulatory T cells (Tregs) and T helper 17 (Th17) cells on the mucosal surface and acts as a trigger for the induction of autoimmunity, such as in rheumatic diseases [9].

The strong anti-inflammatory effects exhibited by Treg cells expressing the transcription factor Forkhead box protein P3 (FOXP3) are necessary to balance immune responses and prevent chronic inflammation. In fact, the depletion of these Treg cells has been reported to result in autoimmune diseases [10]. The interplay between the gut microbiota, the epithelium and the immune cells of the gastrointestinal mucosa has been shown to have significant effects on the local and systemic immune systems [11] and may both decrease and increase local and systemic inflammatory disease [12]. In pSS patients, it has been considered that, the integrity of the gastrointestinal epithelium and its barrier function may be altered through inflammation and diminished secretions of the exocrine glands, producing an altered microbiota–host immune system interaction [13,14]. Exocrine gland dysfunction is driven by high levels of key factors such as proinflammatory cytokines including interleukin (IL)-12, IL-6, interferon-gamma (IFN-gamma) and tumor necrosis factor (TNF)-alpha; serum autoantibodies including antinuclear antibodies (ANA), antibodies against anti-Ro/Sjögren's syndrome autoantibody A (Ro/SSA) and anti La/Sjögren's syndrome autoantibody B (La/SSB), and rheumatoid factor (RF); and significant infiltration of T and B cells [15]. Gut microbiome dysbiosis can modulate systemic inflammation but systemic inflammation can also reduce beneficial gut bacteria, promoting the growth of commensal bacteria with the potential to be pathogenic [16,17].

The aims of this study were therefore to explore intestinal microbial composition and functionality in pSS and to relate these findings to inflammation, permeability and FOXP3 gene expression in peripheral blood.

## 2. Results

### 2.1. Clinical Characteristics of the pSS and the Healthy Control Groups

Demographic and clinical characteristics of the participants are shown in Table 1. No significant differences in age, sex, body mass index (BMI), race, smoking, total cholesterol, triglycerides, high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol, low-density lipoprotein (LDL)-cholesterol or fasting glucose were found between study groups ( $p > 0.05$ ). Only the serum levels of c-reactive proteins (CRP) were significantly increased in pSS patients compared to healthy controls. Comorbidities in the pSS patients included type 2 diabetes ( $n = 1$ ), hypothyroidism (no Hashimoto's thyroiditis) ( $n = 3$ ),

fibromyalgia ( $n = 2$ ), oral ulcers ( $n = 1$ ) and arthralgia ( $n = 3$ ) but none of the pSS patients had a comorbid autoimmune disease. We included patients that had not taken steroids or immunosuppressant for at least 3 months prior to sample collection.

Adherence to the Mediterranean diet assessed via a 14-item food frequency questionnaire reflected high adherence to the Mediterranean diet in both study groups.

**Table 1.** Demographic and clinical characteristics of primary Sjögren's syndrome (pSS) patients and healthy controls.

	pSS ( $n = 19$ )	Healthy Controls ( $n = 19$ )	<i>p</i>
Age in years, mean $\pm$ SD	56.43 $\pm$ 8.74	54.70 $\pm$ 8.42	0.545
Female sex, n (%)	19 (100)	19 (100)	0.589
BMI, mean $\pm$ SD	26.17 $\pm$ 6.27	26.25 $\pm$ 4.15	0.963
Smoking, n (%)	7 (36.84)	8 (42.10)	0.736
Caucasian, n (%)	19 (100)	19 (100)	0.589
Fulfilling ACR EULAR 2016 criteria for SS, n (%)	19 (100)	NA	-
<b>Serum biochemistry</b>			
Glucose (mg/dl)	93.44 $\pm$ 22.14	92.16 $\pm$ 18.24	0.847
Insulin (mg/dl)	8.81 $\pm$ 3.63	6.82 $\pm$ 3.72	0.104
Triglycerides (mg/dl)	90.41 $\pm$ 29.65	97.92 $\pm$ 27.51	0.398
Cholesterol (mg/dl)	189.38 $\pm$ 22.29	176.3 $\pm$ 34.6	0.175
LDL-cholesterol (mg/dl)	123.76 $\pm$ 31.0	118.20 $\pm$ 33.75	0.600
HDL-cholesterol (mg/dl)	63.16 $\pm$ 14.73	59.84 $\pm$ 15.60	0.504
CRP (ng/mL)	3.80 $\pm$ 0.49	2.77 $\pm$ 0.63	0.001
ANA positive, n (%)	15 (78.94)	NA	-
ENA positive, n (%)	6 (31.57%)	NA	-
Ro/SSA positive, n (%)	11 (57.89)	NA	-
La/SSB positive, n (%)	12 (63.15)	NA	-
Rheumatoid factor positive, n (%)	13 (68.42)	NA	-
C3 low at inclusion ( $<0.90$ g/L), n (%)	7 (36.84)	NA	-
C4 low at inclusion ( $<0.10$ g/L), n (%)	7 (36.84)	NA	-
<b>Other symptoms reported</b>			
Hypothyroidism, n (%)	3(15.78)	0 (0)	-
Fibromyalgia, n (%)	2 (10.52)	0 (0)	-
Oral ulcers, n (%)	1 (5.26)	0 (0)	-
Arthralgia, n (%)	3 (15.78)	0 (0)	-
Type 2 diabetes, n (%)	1 (5.26)	0 (0)	-

pSS, primary Sjögren's syndrome; BMI, body mass index; CRP, c-reactive protein; LDL, Low density lipoprotein-cholesterol; HDL-cholesterol, high density lipoprotein-cholesterol; ACR EULAR, American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism; ANA, antinuclear antibody; ENA, extractable nuclear antigen; Ro/SSA, anti-Ro/Sjögren's syndrome autoantibody A; La/SSB, anti La/Sjögren's syndrome autoantibody B; C3/C4, complement C3/C4.

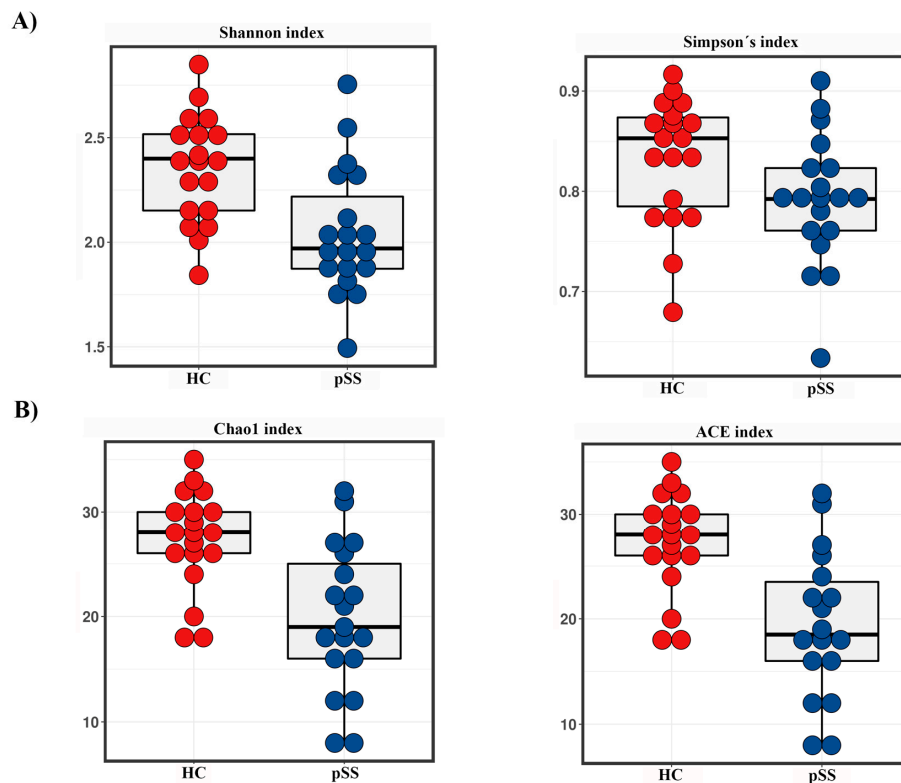
## 2.2. Taxonomic Composition and Diversity of Gut Microbiota

A total of 2,473,675 reads of the 16S rDNA gene V2–V9 region were generated from the 38 analyzed samples, with an average of 65,096.71 ( $\pm 10,825.11$  standard deviation (SD)) reads for each sample, ranging from 630,489 to 2582. A total of 52,844.28 high quality reads were obtained after trimming and filtering. In the operational taxonomic unit (OTU) clustering process, a total of 6473 OTUs were obtained, and after alignment of the OTUs representative sequences, 2582 OTUs with a relative abundance higher than 1% in at least four samples (97% similarity cut-off) were identified. In the taxonomic assignment process, these OTUs were binned in 7 phyla, 39 families, 45 genera and 53 species



using the Quantitative Insights into Microbial Ecology (QIIME2) pipeline, with Greengenes v13.8 as the reference database for sequence classification and alignment.

To compare the alpha diversity, the Chao1, ACE, Shannon and Simpson indices were calculated after rarefying the OTU table to 1731 sequences, the size of the smallest sample to obtain equal sequencing depth. These analyses revealed a significant decrease in richness (Chao1 and ACE) and diversity (Shannon and Simpson) in pSS patients compared to healthy controls (Chao1  $q < 0.001$ , ACE  $p < 0.001$ , Shannon  $p = 0.0017$  and Simpson  $p = 0.05$ ) (Figure 1A,B).

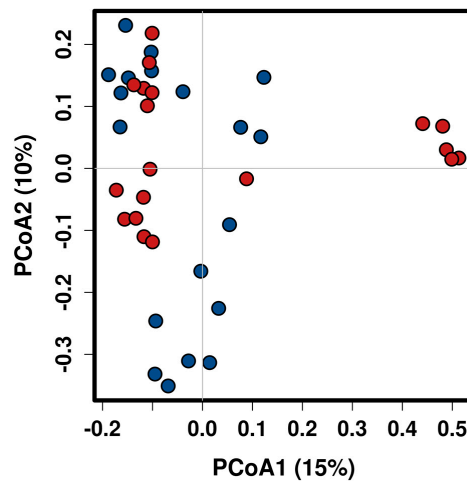


**Figure 1.** Comparison of alpha diversity in primary Sjögren's syndrome (pSS) patients and healthy controls (HC). (A) Shannon and Simpson's diversity indices; (B) Chao1 and ACE richness indices.

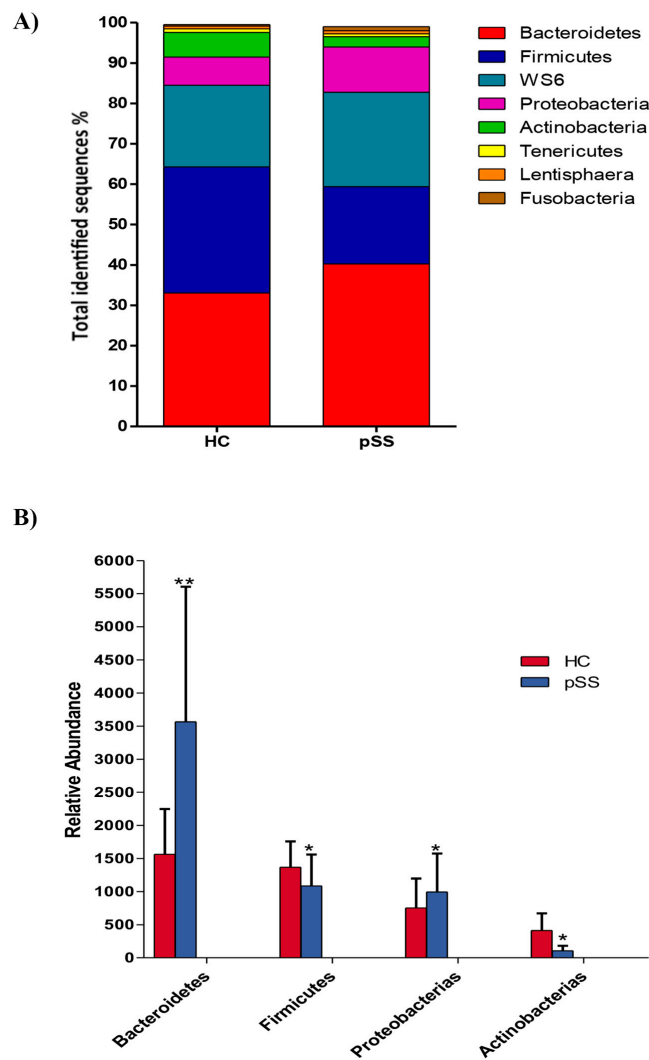
Beta diversity was evaluated by the Bray-Curtis Index metric at the genus level. Significant shifts in community membership and structure were observed between the study groups in the principal coordinates analysis (PCoA) plots ( $p = 0.007$ , ANOSIM). As shown in Figure 2 a significant separation in clustering pattern between pSS and healthy controls could be observed from PC1 and PC2 scores that accounted for 10% and 12.7% of the total variations.

### 2.3. Comparative Analysis of the Gut Microbial Composition of Patients with pSS and Healthy Controls

Compositional differences in gut microbiota at the level of phylum, family, genus and species were found between both study groups. A core microbiome consisting predominantly of Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, WS6 and Actinobacteria phyla was found in fecal samples from both groups, accounting for up to 90% of sequences on average. The remaining bacterial population belonged to the other phyla (Tenericutes, Fusobacterium and Lentisphaerae), which had a relative abundance lower than 1% in both groups. At this phylum level, we found a significant rise in Bacteroidetes (40.24% pSS vs. 33.05% HC,  $p < 0.001$ ,  $q$ -value  $< 0.001$ ) and Proteobacteria (11.22% pSS vs. 6.98% HC,  $p = 0.0020$ ,  $q$ -value = 0.017) in pSS patients compared to healthy controls. While Firmicutes (20.12% pSS vs. 31.22% HC,  $p = 0.0021$ ,  $q$ -value = 0.02) and Actinobacteria (2.54% pSS vs. 6.12% HC,  $p = 0.012$ ,  $q$ -value = 0.048) were significantly enriched in healthy controls compared to pSS patients (Figure 3).

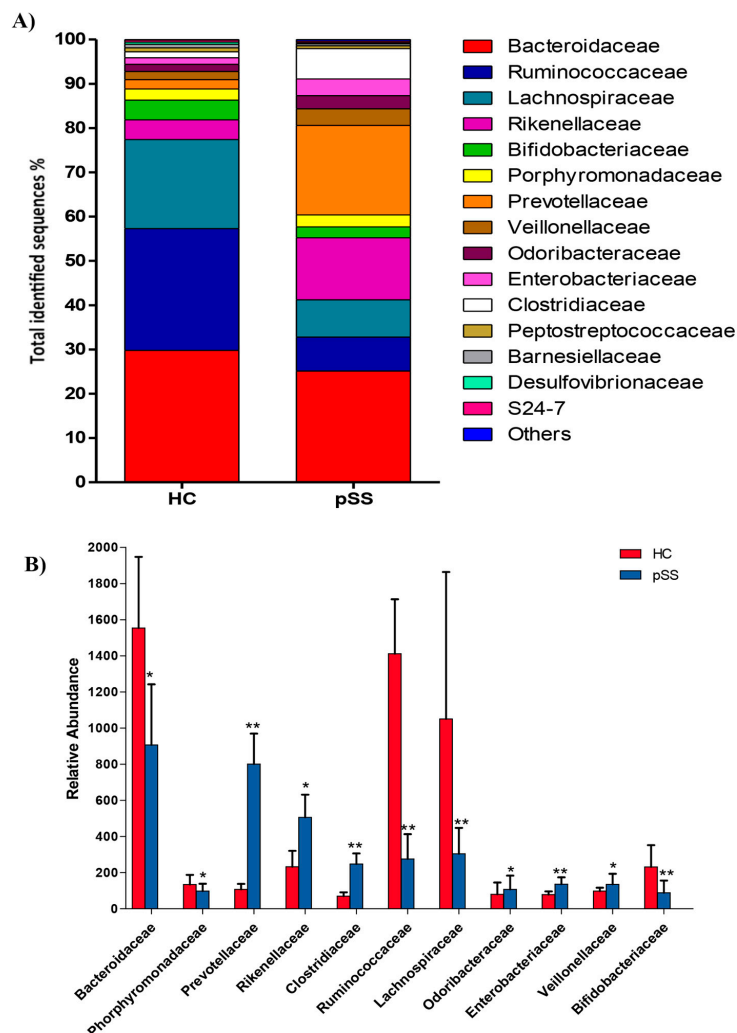


**Figure 2.** Principal Coordinates Analysis (PCoA) of bacterial communities from primary Sjögren’s syndrome (pSS) patients and healthy controls using Bray-Curtis similarity index at the genus level. Blue dot (pSS patients) and red dot (healthy controls).



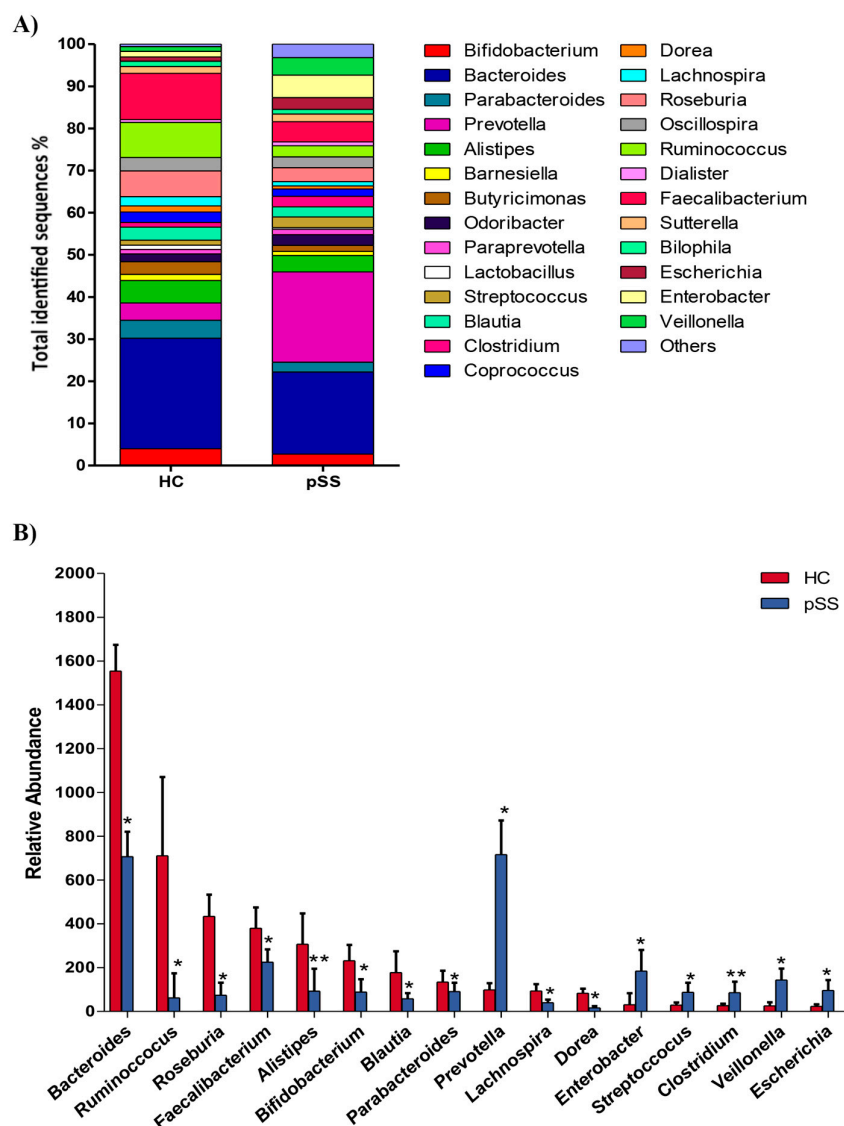
**Figure 3.** Composition of fecal microbiota at the phylum levels in primary Sjögren’s syndrome (pSS) patients and healthy controls (HC). (A) Data are shown as a percentage of the total identified sequences per group. (B) Differentially abundant phyla in the stool samples of pSS patients compared to HC \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ . The bars indicate mean  $\pm$  standard deviation (SD).

Of the 39 families identified, 10 showed significant differences in their abundance between pSS patients and healthy controls. In the Firmicutes families, two families were significantly more frequent in pSS patients compared with healthy controls such as Clostridiaceae (6.87% pSS vs. 1.34% HC,  $p < 0.001$ ,  $q$ -value  $< 0.001$ ) and Veillonellaceae (3.75% pSS vs. 1.86% HC,  $p = 0.0032$ ,  $q$ -value = 0.02). On the other hand, the frequency of Ruminococcaceae (7.65% pSS vs. 27.53% HC,  $p < 0.001$ ,  $q$ -value = 0.002) and Lachnospiraceae (8.44% pSS vs. 20.10% HC,  $p < 0.001$ ,  $q$ -value = 0.001) was significantly reduced in pSS compared with healthy controls. Within the Bacteroidetes, three different families were significantly higher in pSS patients when compared with healthy controls: Prevotellaceae (20.18% pSS vs. 2.05% HC,  $p < 0.001$ ,  $q$ -value  $< 0.001$ ), Rikenellaceae (14.03% pSS vs. 4.44% HC,  $p = 0.013$ ,  $q$ -value = 0.05) and Odoribacteraceae (2.96% pSS vs. 1.60% HC,  $p = 0.009$ ,  $q$ -value = 0.046). Bacteroidaceae (25.12% pSS vs. 29.79% HC,  $p = 0.011$ ,  $q$ -value = 0.046) and Porphyromonadaceae (2.72% pSS vs. 2.57% HC,  $p = 0.0021$ ,  $q$ -value = 0.017) were significantly lower in pSS patients than in healthy controls. In Actinobacteria, a significant decrease in Bifidobacteriaceae (2.45% pSS vs. 4.43% HC,  $p < 0.001$ ,  $q$ -value  $< 0.001$ ) was found in pSS patients compared with healthy controls. While in the Proteobacteria family, there was a significant increase in the abundance of Enterobacteriaceae (3.77% pSS vs. 1.50% HC,  $p < 0.001$ ,  $q$ -value = 0.001) in pSS patients (Figure 4).



**Figure 4.** Family-level microbial classification of bacteria from stool samples of primary Sjögren's syndrome (pSS) patients and healthy controls (HC). (A) Data are shown as a percentage of the total identified sequences per group. (B) Differentially abundant families in the stool samples of pSS patients compared to HC. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ . The bars indicate mean  $\pm$  standard deviation (SD).

A total of 15 genera exhibited significant compositional changes in pSS patients compared to healthy controls. In the pSS patients, we found a significant increase in the abundance of *Prevotella* (21.43% pSS vs. 4.14% HC,  $p = 0.0017$ ,  $q$ -value = 0.014), *Escherichia* (2.78% pSS vs. 1.05% HC  $p = 0.011$ ,  $q$ -value = 0.046), *Clostridium* (2.48% pSS vs. 1.11% HC,  $p < 0.001$ ,  $q$  value = 0.007), *Enterobacter* (5.34% pSS vs. 1.30% HC,  $p = 0.0034$ ,  $q$ -value = 0.02), *Veillonella* (4.16% pSS vs. 1.12% HC,  $p = 0.0043$ ,  $q$ -value = 0.022) and *Streptococcus* (2.54% pSS vs. 1.20% HC,  $p = 0.0043$ ,  $q$ -value = 0.022), accompanied by a significant decrease in the genera *Bacteroides* (19.47% pSS vs. 26.20% HC,  $p = 0.0017$ ,  $q$ -value = 0.014), *Alistipes* (3.89% pSS vs. 5.33% HC,  $p < 0.001$ ,  $q$ -value = 0.006), *Dorea* (0.69% pSS vs. 1.45% HC,  $p = 0.008$ ,  $q$ -value = 0.038), *Parabacteroides* (2.33% pSS vs. 4.25% HC,  $p = 0.012$ ,  $Q = 0.046$ ), *Blautia* (2.43% pSS vs. 3.08% HC,  $p = 0.0033$ ,  $q$ -value = 0.02), *Lachnospira* (1.05% pSS vs. 2.19% HC,  $p = 0.013$ ,  $q$ -value = 0.05), *Roseburia* (3.29% pSS vs. 6.10% HC,  $p = 0.013$ ,  $q$ -value = 0.05), *Faecalibacterium* (4.77% pSS vs. 10.97% HC,  $p = 0.0023$ ,  $q$ -value = 0.02), *Ruminococcus* (2.61% pSS vs. 8.34% HC,  $p = 0.0013$ ,  $p = 0.0013$ ,  $q$ -value = 0.012) and *Bifidobacterium* (2.72% pSS vs. 4.02% HC,  $p = 0.012$ ,  $q$ -value = 0.046) (Figure 5).



**Figure 5.** Relative abundance of bacterial genera in the microbiota of primary Sjögren's syndrome (pSS) patients and healthy controls (HC). (A) Data are shown as a percentage of the total identified sequences per group. (B) Differentially abundant genera in the stool samples of pSS and HC. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ . The bars indicate mean  $\pm$  standard deviation (SD).

At the species level, in the pSS group we observed, a significant increase in *Clostridium clostridioforme* (3.05% pSS vs. 2.33% HC,  $p = 0.0037$ ,  $q$ -value = 0.02), *Escherichia coli* (4.12% pSS vs. 1.45% HC,  $p = 0.0037$ ,  $q$ -value = 0.02) and *Prevotella copri* (6.78% pSS vs. 2.18% HC,  $p < 0.001$ ,  $q$ -value = 0.001) and a significant decrease in *Bacteroides fragilis* (7.47% pSS vs. 13.88% HC,  $p = 0.003$ ,  $q$ -value = 0.0096), *Parabacteroides distasonis* (2.16% pSS vs. 7.37% HC,  $p = 0.0032$ ,  $q$ -value = 0.027), *Dorea longicatena* (6.97% pSS vs. 4.77% HC,  $p = 0.0045$ ,  $q$ -value = 0.035), *Ruminococcus lactaris* (2.34% pSS vs. 5.23% HC,  $p = 0.005$ ,  $q$ -value = 0.047) and *Faecalibacterium prausnitzii* (1.47% pSS vs. 6.72% HC,  $p = 0.0019$ ,  $q$ -value = 0.02).

#### 2.4. Functional Differences in Gut Microbiota between pSS Patients and Healthy Individuals

Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis of the metagenomic data showed that genes for energy metabolism such as sulfur metabolism ( $q$ -value = 0.022), carbohydrate metabolism such as butanoate metabolism ( $q$ -value = 0.019), metabolism of other amino acids such as glutathione metabolism ( $q$ -value = 0.026), signal transduction mechanisms such as the phosphatidylinositol signaling system ( $q$ -value = 0.024) and xenobiotics biodegradation and metabolism pathways including benzoate degradation ( $q$ -value = 0.038) and xylene degradation ( $q$ -value = 0.04) were significantly depleted in pSS patients compared to healthy control subjects. Nevertheless, in pSS patients compared to healthy controls, there was a significant over-representation of genes in the amino acid metabolism pathways, such as for cysteine and methionine metabolism ( $q$ -value = 0.029), as well as in genes for membrane transport such as bacterial secretion systems ( $q$ -value = 0.045), metabolism of cofactors and vitamins such as lipoic acid metabolism ( $q$ -value = 0.035) and retinol metabolism ( $q$ -value = 0.027) and glycan biosynthesis and metabolism such as lipopolysaccharide biosynthesis ( $q$ -value = 0.018) and glycosaminoglycan degradation ( $q$ -value = 0.023) (Figure 6).

#### 2.5. Differences in the Serum Levels of Inflammatory Mediators and Zonulin and the Relative Expression of FOXP3 in pSS Patients Compared to Healthy Controls

Circulating zonulin levels were significantly higher in pSS patients than in healthy controls ( $82.26 \pm 12.65$  ng/mL pSS vs.  $35.89 \pm 8.94$  ng/mL HC,  $p < 0.001$ ). In addition, pSS patients had higher levels of the proinflammatory cytokines IL-6 ( $199.78 \pm 62.91$  pg/mL pSS vs.  $82.63 \pm 18.86$  pg/mL HC,  $p < 0.001$ ), IL-17 ( $5.77 \pm 1.79$  pg/mL pSS vs.  $1.96 \pm 0.61$  pg/mL HC,  $p < 0.001$ ), IL-12 ( $65.38 \pm 15.95$  pg/mL pSS vs.  $27.64 \pm 10.47$  pg/mL HC,  $p < 0.001$ ), TNF-alpha ( $341.72 \pm 52.75$  pg/mL pSS vs.  $147.48 \pm 22.15$  pg/mL HC,  $p < 0.001$ ) than healthy controls. Nevertheless, no significant differences were observed in serum levels of IFN-gamma between study groups ( $2.36 \pm 0.95$  pg/mL pSS vs.  $1.91 \pm 0.44$  pg/mL HC,  $p = 0.069$ ). With respect to the anti-inflammatory cytokine IL-10 ( $85.86 \pm 26.36$  pg/mL pSS vs.  $139.89 \pm 41.72$  pg/mL HC,  $p < 0.001$ ), a significant depletion was found in pSS patients with respect to healthy controls. Finally, relative mRNA expression of FOXP3 in PBMC was significantly lower in pSS patients when compared with healthy controls ( $0.31 \pm 0.11$  pSS vs.  $1.31 \pm 0.23$  HC,  $p < 0.001$ ).

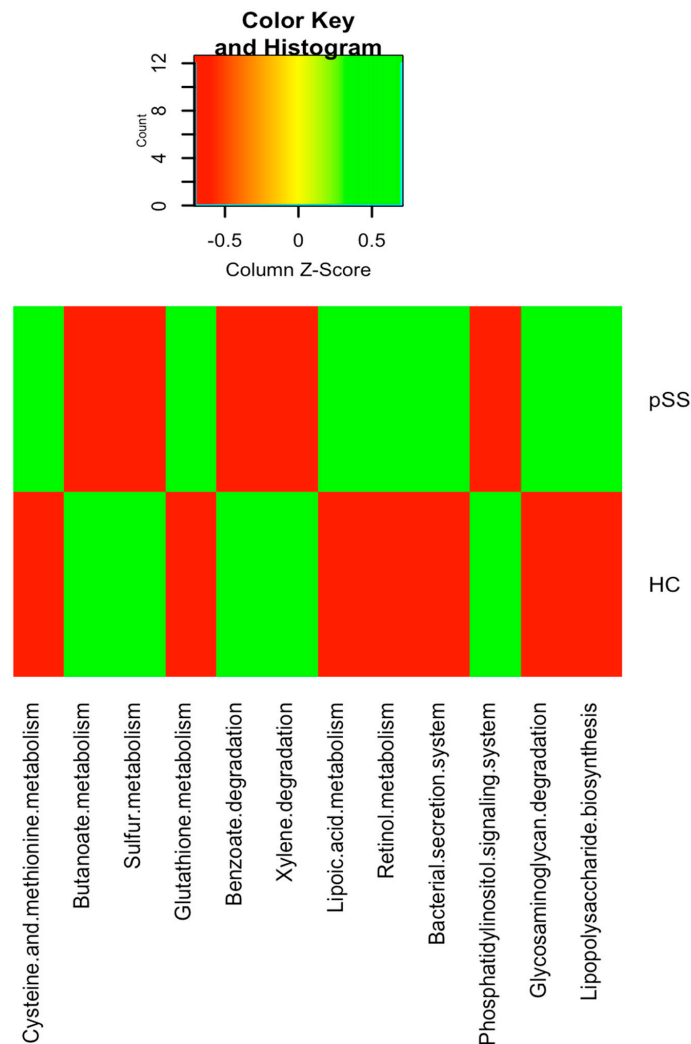
#### 2.6. Gut Microbiota was Significantly Associated with Serum Levels of Inflammatory Mediators and Zonulin and the Relative Expression of FOXP3 in pSS Patients

We performed pairwise correlation between the microbial taxonomic composition of both study groups at the different taxa levels with each cytokine and with serum zonulin levels and FOXP3 mRNA expression (Tables 2 and 3).

Linear regression analysis showed that serum zonulin levels had a significant positive association with the abundance of *Prevotella copri* ( $R^2 = 0.752$ ,  $B = 0.520$ ,  $p = 0.017$ ) and a significant negative association with the abundance of *Bifidobacterium* ( $R^2 = 0.752$ ,  $B = -1.041$ ,  $p < 0.001$ ) in the pSS patients. In the healthy controls, the zonulin level was negatively associated with *Ruminococcus* ( $R^2 = 0.752$ ,  $B = -0.411$ ,  $p = 0.005$ ) and *Bifidobacterium* ( $R^2 = 0.752$ ,  $B = -1.182$ ,  $p < 0.001$ ).

Similarly, in the pSS patients, the regression analysis showed a negative association between the levels of proinflammatory cytokines IL-17 and TNF-alpha and the abundance of *Bifidobacterium* ( $R^2 = 0.742$ ,  $B = -1.289$ ,  $p < 0.001$  and  $R^2 = 0.697$ ,  $B = -0.580$ ,  $p < 0.001$ , respectively) and *Ruminococcus*

( $R^2 = 0.742$ ,  $B = -0.815$ ,  $p < 0.001$ ) only for IL-17, while the levels of IL-12 were negatively associated with the abundance of *Lachnospira* ( $R^2 = 0.897$ ,  $B = -0.601$ ,  $p < 0.001$ ), *Roseburia* ( $R^2 = 0.897$ ,  $B = -0.641$ ,  $p < 0.001$ ) and *Bifidobacterium* ( $R^2 = 0.897$ ,  $B = -0.715$ ,  $p < 0.001$ ) and positively with the abundance of *Enterobacter* ( $R^2 = 0.897$ ,  $B = 0.562$ ,  $p < 0.001$ ). Concerning the levels of IL-6 in pSS, we found a negative association with *Blautia* ( $R^2 = 0.835$ ,  $B = -0.132$ ,  $p = 0.022$ ) and *Roseburia* ( $R^2 = 0.835$ ,  $B = -0.785$ ,  $p = 0.001$ ) and a positive association with *Escherichia coli* ( $R^2 = 0.835$ ,  $B = 0.678$ ,  $p < 0.001$ ). In the healthy controls, only a significant negative association was found between the levels of the proinflammatory cytokines IL-6 and TNF-alpha and the abundance of *Parabacteroides distasonis* ( $R^2 = 0.948$ ,  $B = 1.139$ ,  $p < 0.001$  and  $R^2 = 0.570$ ,  $B = 0.570$ ,  $p = 0.011$ , respectively)



**Figure 6.** Heatmap of bacterial gene functional predictions using the Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States (PICRUSt) algorithm from fecal samples from primary Sjögren’s syndrome (pSS) patients and healthy controls (HC).

Conversely, in both the pSS and healthy controls, the anti-inflammatory cytokine IL-10 revealed a strong positive association with the abundance of *Faecalibacterium prausnitzii* ( $R^2 = 0.325$ ,  $B = 0.570$ ,  $p = 0.011$ ;  $R^2 = 0.494$ ,  $B = 1.337$ ,  $p < 0.001$ , respectively) and *Ruminococcus* ( $R^2 = 0.325$ ,  $B = 0.259$ ,  $p = 0.029$ ;  $R^2 = 0.494$ ,  $B = 0.259$ ,  $p = 0.029$ , respectively). Finally, FOXP3 mRNA expression was positively associated with the abundance of *Bacteroides fragilis* in both the pSS patients ( $R^2 = 0.547$ ,  $B = 0.548$ ,  $p = 0.029$ ) and healthy controls ( $R^2 = 0.547$ ,  $B = 0.670$ ,  $p = 0.016$ ).

**Table 2.** Correlations between gut microbiota composition and serum levels of IL-6, IL-12 and IL-17 in the primary Sjögren's syndrome (pSS) and healthy control groups.

	pSS	Healthy Controls	pSS	Healthy Controls	pSS	Healthy Controls
	IL-6		IL-12		IL-17	
<i>Butyrciromonas</i>	-0.598 ( $p = 0.030$ )					
<i>Roseburia</i>	-0.718 ( $p = 0.010$ )		-0.767 ( $p = 0.020$ )		-0.511 ( $p = 0.045$ )	-0.675 ( $p = 0.047$ )
<i>Ruminococcus</i>	-0.527 ( $p = 0.020$ )	-0.533 ( $p = 0.029$ )			-0.631 ( $p = 0.025$ )	
<i>Blautia</i>	-0.635 ( $p = 0.007$ )					
<i>Enterobacter</i>			0.873 ( $p = 0.008$ )		0.549 ( $p = 0.039$ )	
<i>Streptococcus</i>			0.466 ( $p = 0.044$ )			
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>		-0.587 ( $p = 0.028$ )	-0.508 ( $p = 0.027$ )	-0.550 ( $p = 0.025$ )		
<i>Escherichia coli</i>	0.723 ( $p = 0.009$ )					
<i>Bifidobacterium</i>		-0.573 ( $p = 0.030$ )	-0.508 ( $p = 0.018$ )	-0.507 ( $p = 0.027$ )	-0.789 ( $p = 0.002$ )	-0.459 ( $p = 0.041$ )
<i>Bacteroides fragilis</i>					-0.473 ( $p = 0.041$ )	
<i>Parabacteroides distasonis</i>		-0.767 ( $p = 0.004$ )				
<i>Lachnospira</i>			-0.514 ( $p = 0.014$ )			
<i>Prevotella</i>	0.465 ( $p = 0.045$ )					
<i>Clostridium</i>	0.462 ( $p = 0.046$ )				0.412 ( $p = 0.043$ )	

**Table 3.** Correlations between gut microbiota composition and serum levels of TNF-alpha, IL-10, zonulin and FOXP3 mRNA expression in the study groups.

	pSS	Healthy Controls	pSS	Healthy Controls	pSS	Healthy Controls	pSS	Healthy Controls
	TNF-Alpha		IL-10		Zonulin		FOXP3 mRNA Expression	
<i>Ruminococcus</i>		-0.496 ( $p = 0.031$ )	0.563 ( $p = 0.035$ )	0.494 ( $p = 0.032$ )	-0.496 ( $p = 0.031$ )	-0.665 ( $p = 0.005$ )		0.573 ( $p = 0.034$ )
<i>Butyrciromonas</i>	-0.560 ( $p = 0.033$ )		0.525 ( $p = 0.021$ )			-0.542 ( $p = 0.027$ )	0.598 ( $p = 0.043$ )	
<i>Blautia</i>			0.516 ( $p = 0.024$ )	0.576 ( $p = 0.005$ )				
<i>Roseburia</i>					-0.458 ( $p = 0.048$ )			0.501 ( $p = 0.042$ )
<i>Prevotella copri</i>					0.645 ( $p = 0.003$ )			
<i>Clostridium</i>	0.550 ( $p = 0.025$ )		-0.651 ( $p = 0.033$ )					
<i>Bifidobacterium</i>	-0.580 ( $p = 0.009$ )				-0.631 ( $p = 0.010$ )	-0.584 ( $p = 0.017$ )		
<i>Bacteroides fragilis</i>	-0.567 ( $p = 0.041$ )						0.631 ( $p = 0.002$ )	0.563 ( $p = 0.009$ )
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>			0.651 ( $p = 0.010$ )	0.597 ( $p = 0.025$ )		-0.502 ( $p = 0.029$ )		
<i>Parabacteroides distasonis</i>		-0.559 ( $p = 0.009$ )				-0.700 ( $p = 0.035$ )		



### 3. Discussion

This study has demonstrated that the pSS patients had gut dysbiosis associated with increased serum levels of proinflammatory cytokines including IL-6, IL-12, IL-17 and TNF-alpha (systemic inflammation) and zonulin (intestinal permeability) that resulted in increased systemic microbial exposure. The pSS patients included were from the same geographical area and had a similar BMI, sex, age and ethnic background as the healthy controls to avoid the influence of these confounding factors on the gut microbiota analysis.

Microbiota diversity is essential to maintaining ecosystem stability and efficiency. Regarding alpha diversity, patients exhibited decreased gut microbiota diversity and richness compared with controls. Van der Meulen et al. also found significantly lower richness in gut microbiota composition but not in diversity in pSS patients compared to healthy controls [18]. Reduced diversity may favor emergence of pathogenic bacteria that disrupt the intestinal barrier and stimulate production of inflammatory mediators by mucosal epithelial cells in the intestinal lamina propria and mesenteric lymph nodes [7]. Moreover, individuals with low gut microbiota richness have higher inflammatory markers in blood [19]. These data could suggest a link between the lower bacterial diversity and richness and the higher systemic inflammation and intestinal permeability found in our pSS patients. In addition, the Bray-Curtis PCoA plot for beta diversity showed that the pSS patients were grouped into a tight cluster compared to the healthy controls, indicating significant disease-mediated microbial changes.

We found large significant differences in predominant phyla, family, genera and species taxa in pSS patients compared to healthy controls. At the genera level, gut dysbiosis showed an increase in the abundance of the mucin-degrading and enteric pathogens *Prevotella*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Escherichia*, and *Streptococcus* and a depletion in the relative abundance of *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Faecalibacterium*, *Roseburia*, *Ruminococcus*, *Dorea*, *Alistipes*, *Blautia* and *Bifidobacterium*. Our findings have demonstrated both similarities and differences compared to prior data in Sjögren's patients. de Paiva et al. showed that fecal samples from Sjögren's patients had a reduction in the genus *Bacteroides*, *Parabacteroides* and *Faecalibacterium* and an augmentation of *Escherichia* and *Streptococcus* genera compared to controls. Nevertheless, unlike our study these authors described a significant decrease in the abundance of *Prevotella* in the gut of Sjögren's patients [7].

Conversely, but similar to our data, in a very recent study, Mendez et al. reported a decrease in the relative abundance of *Faecalibacterium* and *Bacteroides* and an increase in the relative abundance of *Prevotella* in Sjögren's patients [17]. *Prevotella* is a crucial genus in the onset of other chronic inflammatory disorders such as rheumatoid arthritis [20]. Sher et al. identified a strong association between *Prevotella copri* and new-onset untreated rheumatoid arthritis and the higher abundance of *Prevotella* was associated with a reduction in several beneficial microbes, including *Bacteroides* [21].

*Bacteroides* spp. and the Clostridia clusters XIVa and IV (butyrate-producing bacteria) have been shown to be necessary for maintaining the balance between anti-inflammatory regulatory Treg cells and proinflammatory Th17 cells, which protect the mucosa from pathogenic microorganism colonization [22]. The reduction found in our study in both butyrate-producing bacteria and *Bacteroides* may affect the balance between Th17 and Treg cells in pSS patients, contributing to autoimmunity.

In another recent study, Moon et al. demonstrated that SS patients compared to healthy controls had increased Bacteroidetes levels and a decreased Firmicutes/Bacteroidetes ratio, while Actinobacteria (*Bifidobacterium*) and Clostridia (*Blautia*, *Dorea* and *Agathobacter*) were significantly decreased [23]. The depletion in the abundance of *Bifidobacterium* in pSS patients shown in our study and by other authors is also described in other chronic inflammatory states including rheumatoid arthritis and Crohn's disease [9,24]. Moreover, Mandl et al. indicated that SS patients with severe dysbiosis and decreased levels of *Bifidobacterium* and *Alistipes* could have higher disease activity, lower levels of complement component and higher levels of fecal calprotectin [8]. The possible causes of these differences in gut microbiota composition between studies could be differences in dietary habits or in the severity of Sjögren's syndrome, medications, age or sex bias. Several studies have described age- and sex-related changes in human gut microbiota composition [25–27].



On the other hand, this gut microbiota dysbiosis also affects the imbalance of T helper 1 and Th17 cells, the polarization of Tregs, the increased permeability of intestinal epithelial cells and the production of short-chain fatty acids [9]. In the pSS patients, we found a significant positive association between the abundance of *Prevotella copri* and serum levels of zonulin. Zonulin is a protein, synthesized in intestinal and liver cells, that reversibly modulates the permeability of the intestinal epithelial barrier by disassembling intercellular tight junctions [28,29]. Wright et al. found that *Prevotella* contains enzymes that are important in mucin degradation, which may disrupt the colonic mucus barrier and increase intestinal permeability [30], allowing the diffusion of pathogens, toxins, and antigens from the luminal environment into the mucosal tissues and circulatory system [31], resulting in the immune activation and tissue inflammation important in the onset or progression of several intestinal and chronic autoimmune diseases [32]. Conversely, a recent study in immunocompetent mice has suggested that alteration of the gut microbiome by *Prevotella* spp. colonization decreases levels of short chain fatty acids, especially acetate, enhancing intestinal inflammation but after chemical damage to the intestinal barrier [33]. Accordingly, the significant increase in *Prevotella* abundance found in our study could be associated with the immune dysregulation and the increased intestinal inflammation in the pSS patients.

In this study, pSS patients had significantly higher levels of the proinflammatory cytokines IL-17, IL-12, IL-6 and TNF-alpha along with a significant decrease in the anti-inflammatory cytokine IL-10 and FOXP3 mRNA expression compared with healthy controls. Moreover, the significant correlations found between gut microbiota and host serum levels of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines and FOXP3 mRNA expression indicate that the significant depletion of *Roseburia*, *Blautia*, *Lachnospira*, *Ruminococcus*, *Bifidobacterium*, *Faecalibacterium prausnitzii* and *Bacteroides fragilis* able to exert anti-inflammatory effects (through cytokine production) and improve gut barrier function (through butyrate production) [34,35], together with the significant increase in *Enterobacter* and *Escherichia coli* (potential enteric pathogens with proinflammatory capacity) could increase intestinal permeability and low-grade inflammation in pSS patients. Butyrate (a gut microbiota-derived metabolite) is a crucial metabolite providing energy for colonic epithelial cells to maintain intestinal barrier functions. Moreover, butyrate acts as an anti-inflammatory molecule, capable of inhibiting NF- $\kappa$ B activation in the host immune cells by binding to G protein-coupled receptors (GPR43 and GPR41), thereby blocking inflammatory responses and suppressing TNF-alpha and IL-6 release [36]. Butyrate also leads to modulation of IL-17 expression [37] and promotes Treg cell differentiation, which can ultimately suppress proinflammatory responses [38]. Fernando et al. revealed that butyrate down-regulates expression of pathologic levels of IL-17 [39].

Similarly, Säemann et al. demonstrated that butyrate is able to strongly inhibit the production of proinflammatory cytokines IL-12 and TNF-alpha by monocytes, whereas the anti-inflammatory cytokine IL-10 is significantly increased after bacterial stimulation [40]. Finally, the activation of Tregs by butyrate not only inhibits effector T cells but also produces the anti-inflammatory cytokine IL-10 [41]. The immunomodulatory molecule polysaccharide A derived from the human commensal *Bacteroides fragilis* mediates the conversion of CD4+ T cells into FOXP3+ Treg cells that produce IL-10 during commensal colonization, stimulating immunological development within mammalian hosts [42]. These data may indicate the possible association between butyrate-related immune dysregulation and alterations in gut barrier function in pSS.

Our study also explored the functionality of the gut microbiota. Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States (PICRUSt) analysis showed that bacterial metabolic pathways were also different between pSS patients and healthy controls. The gut microbiome of pSS patients showed a depletion in genes involved in metabolic functions such as butanoate metabolism and glutathione metabolism as well as an over-representation of genes necessary for lipoic acid metabolism, retinol metabolism, lipopolysaccharide biosynthesis and glycosaminoglycan degradation. The depletion in genes involved in butanoate metabolism in the pSS patients could be due to the significantly lower abundance of the families Ruminococcaceae (in particular *Faecalibacterium*

*prausnitzii*) and Lachnospiraceae (especially *Roseburia* spp.), the main butyrate producing-bacteria belonging to the phylum Firmicutes, despite the significantly higher abundance in these patients of other potential butyrate producers such as Clostridiaceae, Veillonellaceae and Prevotellaceae. Clostridiaceae, Prevotellaceae and Veillonellaceae comprise mainly bacteria that produce acetate, succinate and propionate, although some microorganisms of these families could promote butyrate production via acetate or succinate interconversion [43,44]. The decrease in genes related to butyrate synthesis due to the decrease in beneficial butyrate-producing bacteria may predispose to increased intestinal permeability associated with autoimmune conditions [45]. In systemic lupus erythematosus patients, depletion of glutathione has been associated with various immune abnormalities including deregulation of apoptosis and abnormal cytokine and chemokine production [46]. Microbial pathogens implement basic lipoylation strategies, which can affect their pathogenesis and virulence [47]. Moreover, lipoic acid metabolism has been thoroughly characterized in the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*, which is significantly increased in pSS patients with respect to controls in our study. Indeed, glycosaminoglycans help to form a protective barrier of intestinal mucin, and the breakdown of glycosaminoglycans have been reported to be associated with an inflammatory response in inflammatory bowel disease [48]. Retinoic acid (a product of retinol metabolism) mediates cellular regulation in autoimmune diseases through suppression of inflammatory T helper 1/Th17 responses by decreasing IFN-gamma and IL-17 [49]. All these data suggest that the gut microbiota of the pSS patients was enriched in genes from pathways associated with bacterial pathogenesis and potentially related to chronic inflammation compared to healthy controls.

Findings from this study should be interpreted bearing in mind our study limitations which include the small population and the gender bias of the disease. In addition, our results should be confirmed by studies in larger populations with both female and male patients that mirror the general pSS patient population.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Study Subjects

A total of 19 pSS patients between the ages of 18 and 75 years were recruited at the Ophthalmology Service at Arruzafa Hospital. All recruited pSS patients met the American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism (ACR-EULAR) classification criteria [50] and were subjected to a complete ocular, oral, and rheumatologic evaluation. The exclusion criteria were: pregnancy, use of local or systemic antibiotics or probiotics 3 months prior to enrollment in the study, the presence of secondary Sjögren's syndrome or other autoimmune disease, and concurrent inflammatory bowel disease.

Additionally, 19 age-, sex- and BMI-matched healthy controls were enrolled in the study. The exclusion criteria for the healthy controls were: diagnosis of gut disease and use of antibiotics or probiotics within the past 3 months before sampling.

All pSS patients and healthy controls included in the study followed the Mediterranean diet (rich in olive oil, nuts, fruits, vegetables, legumes, whole grains and fish, with a low intake of meat and dairy products). Adherence to the Mediterranean diet was assessed via a validated food frequency questionnaire, composed of 14 questions regarding the main food groups consumed as part of the Mediterranean diet [51].

The study protocol (2182-N-20) was approved by the Medical Ethics Committee of Arruzafa Hospital (1 July 2019) and conducted in accordance with the Declaration of Helsinki for experiments involving human subjects. All participants enrolled were verbally informed of the characteristics of the study and written informed consent was obtained.

#### 4.2. Laboratory Measurements

Peripheral venous blood samples were obtained from the study subjects after 12 h of fasting. Serum was centrifuged and frozen at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  until analysis. Levels of fasting glucose, total cholesterol, triglycerides, HDL-cholesterol and LDL-cholesterol were analyzed by enzymatic methods (Randox Laboratories Ltd., Crumlin, UK) using a Dimension autoanalyzer (Dade Behring Inc., Deerfield, IL, USA). The autoantibodies anti-Ro/SSA and anti-La/SSB were quantified using a multiplex immunobead assay (Quanta Plex SLE Profile 8; Inova Diagnostics) in a Luminex 100 instrument applying the cut-off values recommended by the manufacturer. Antinuclear autoantibodies (ANA) were measured by indirect immunofluorescence technique employing HEp2 cells (Biorad, Marnes la Coquette, France). The rheumatoid factor and complement component 3 (C3) and complement component 4 (C4) were analyzed by a nephelometry technique (BNII nephelometer; Dade Behring, Marburg, Germany).

#### 4.3. DNA Extraction and Gut Microbiota Sequencing

DNA was extracted from 200 mg of stool samples using the QIAamp DNA stool Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol. DNA concentration was measured and the purity was verified with a Nanodrop spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA). The Ion 16S Metagenomics Kit (Thermo-Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) was used to amplify the 16S rRNA gene region from stool DNA using two primer pools (V2-4-8 and V3-6, 7-9) covering hypervariable regions of the 16S rRNA region in bacteria. The Ion Plus Fragment Library Kit (ThermoFisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA) was used to ligate barcoded adapters to the generated amplicons and create the barcoded libraries. Template preparation of the created amplicon libraries was done on the automated Ion Chef System using the Ion 520TM/530TM Kit-Chef (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. Sequencing was carried out on an Ion 520 chip employing the Ion S5 platform (ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

#### 4.4. Bioinformatics Analysis

Quantitative Insights into Microbial Ecology (QIIME2, version 2019.4) software [52] was used to analyze sequence quality and for diversity and taxonomic analysis as previously described [53]. Alpha (Shannon and Chao1) and beta (Bray-Curtis dissimilarity) diversity metrics were estimated with the Kruskal—Wallis test and the permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) with 999 permutations respectively. Taxonomic analysis was done by clustering with VSEARCH and the reference base Greengenes version 13\_8 at 97% of identity.

Metagenome function was predicted by Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States (PICRUSt) analysis by picking OTUs against the Greengenes database [54]. Statistical analyses were performed in R 3.6.0 using the R package "pheatmap" for data analysis and plotting. P-values were corrected for multiple comparisons using the Benjamini–Hochberg method. A corrected  $p < 0.05$  was considered to be statistically significant.

#### 4.5. Intestinal Permeability Analysis

The analysis of serum zonulin was performed using a Zonulin ELISA kit (Immundiagnostik AG, Bernsheim, Germany; intra and inter-assay variation was between 3–10% with a detection limit of 0.22 ng/mL) according to the manufacturer's protocol. Standards and study samples were tested in duplicate.

#### 4.6. Measurement of Serum Cytokine Levels

Concentrations of IL-6, IL-12, IL-17, TNF-alpha and IFN-gamma were quantified by ELISA assay kits (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) in serum samples according to the manufacturer's instructions. Detection limits were: 7.8–500 pg/mL for IL-6, 1.56–100 pg/mL for IL-12, 0.23–15 pg/mL

for IL-17, 15.6–1000 pg/mL for TNF-alpha and 1.6–100 pg/mL for IFN-gamma. IL-10 cytokine was measured by Novex® ELISA Kits (Life Technology, ES, Carlsbad, CA, USA), performed according to the manufacturer's instructions. The assay range was 7.8–500 pg/mL for IL-10.

#### 4.7. Real-Time Quantitative PCR for Treg Cells

The total RNA from peripheral blood mononuclear cells was extracted using a QIAamp RNA Blood Mini Kit following the manufacturer's protocol. The concentration of RNA was measured with a spectrophotometer (Nanodrop N-100, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) and cDNA was synthesized using the Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) and random hexamers. Real time PCR was performed using a specific pre-validated and commercially available TaqMan® primer/probe set for the FOXP3 gene (RefSeq NM\_001114377.1) in an ABI 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The 18S rRNA (4319413E) gene was used as the endogenous reference in each reaction. The relative FOXP3 gene expression levels were calculated using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method [55]. All tests were done in duplicate.

#### 4.8. Statistical Analysis

The Kruskal–Wallis rank-sum test was used to compare differential abundances of taxa between the pSS patients and healthy individuals, and the false discovery rate (FDR) using the Benjamini–Hochberg method was applied to correct the significant *p*-values (*q*-value < 0.05).

Anthropometric and clinical characteristics were analyzed with SPSS Statistics V.20.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). Continuous variables were compared between groups using the Mann–Whitney U test, while categorical variables were compared by Fisher's exact test. The relationship between gut microbiota and study variables was analyzed using Spearman correlation models. A linear regression analysis was performed to identify individual bacteria as independent predictors for levels of inflammatory mediators, serum zonulin and expression of FOXP3 in the study groups. The results were presented as mean ± standard deviation (SD) for quantitative variables and as frequencies and percentages for qualitative variables. Statistical significance was established at *p* < 0.05.

## 5. Conclusions

Our data suggest that the gut microbiota in individuals with pSS differs at the taxonomic and functional levels in comparison with healthy controls. pSS was associated with significantly lower microbiota diversity and richness, a significantly higher relative abundance of opportunistic pathogens with proinflammatory activity (such as *Prevotella*, *Streptococcus*, *Enterobacter* and *Escherichia coli*) and a lower relative abundance of beneficial or commensal butyrate-producing bacteria (such as *Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia*, *Blautia*, *Lachnospira*, *Ruminococcus*, *Bacteroides fragilis* and *Bifidobacterium*). Moreover, pSS patients had significantly higher levels of proinflammatory cytokines (IL-6, IL-12, IL-17 and TNF-alpha) and serum zonulin, and significantly lower levels of IL-10 and FOXP3 mRNA expression (implicated in the development and function of Treg cells) than healthy controls. The PICRUSt analysis found a depletion in genes involved in metabolic functions such as butanoate metabolism and glutathione metabolism as well as an over-representation of genes involved in lipoic acid metabolism, retinol metabolism, lipopolysaccharide biosynthesis and glycosaminoglycan degradation, genes from pathways associated with bacterial pathogenesis and potentially related to chronic inflammation. This data provides novel and precise diagnostic biomarkers based on gut microbiota as well as new foundations for the design of new microbe-based therapies for Sjögren's syndrome.

**Author Contributions:** Conceptualization, M.I.Q.-O., L.S.-A. and A.C.-O.; methodology, A.L.-I., A.M.d.P., I.P.-A., A.V.C., M.R.C.d.M., I.L.-G.; Investigation, A.C.-O., A.L.-I., A.M.d.P., I.P.-A., A.V.C., M.R.C.d.M., I.L.-G., L.S.-A. and M.I.Q.-O.; validation, A.L.-I., A.M.d.P., I.P.-A., A.V.C., M.R.C.d.M. and I.L.-G.; writing—original draft preparation, M.I.Q.-O., L.S.-A. and A.C.-O.; writing—review and editing, all authors; funding acquisition, M.I.Q.-O.; supervision, M.I.Q.-O. and L.S.-A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** Maria Isabel Queipo-Ortuño was supported by the “Miguel Servet Type II” program (CP18/00003, ISCIII, Spain; co-funded by the Fondo Europeo de Desarrollo Regional-FEDER), and by the “Nicolas Monardes” research program of the Consejería de Salud (C-0030-2018), Junta de Andalucía, Spain. Lidia Sanchez-Alcoholado was recipient of a predoctoral grant (PE-0106-2019) from the Consejería de Salud y Familia (co-funded by the Fondo Europeo de Desarrollo Regional-FEDER, Andalucía, Spain). Aurora Laborda-Illanes was recipient of a predoctoral grant PFIS-ISCIII (FI19-00112) co-funded by the Fondo Europeo de Desarrollo Regional-FEDER, Madrid, Spain.

**Acknowledgments:** We thank María Repice for help with the English language.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## Abbreviations

ACR EULAR	American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism
ANA	Antinuclear antibody
BMI	Body mass index
C3/C4	Complement C3/C4
CRP	c-reactive protein
ENA	Extractable nuclear antigen
FDR	False discovery rate
FoxP3	Transcription factor Forkhead box protein P3
HDL	High density lipoprotein
IFN	gamma Interferon-gamma
IL	Interleukin
KEGG	Kyoto encyclopedia of genes and genomes
La/SSB	Anti La/Sjögren’s syndrome
LDL	Low density lipoprotein
OTU	Operational taxonomic unit
PCoA	Principal Coordinates Analysis
PICRUSt	Phylogenetic investigation of communities of unobserved states
pSS	Primary Sjögren’s syndrome
QIIME	Quantitative Insights Into Microbial Ecology
Ro/SSA	Anti-Ro/Sjögren’s syndrome autoantibody A
SD	standard deviation
TNF	alpha Tumor necrosis factor-alpha
Tregs	Regulatory T cells

## References

1. Mariette, X.; Criswell, L.A. Primary Sjögren’s Syndrome. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *378*, 931–939. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Carsons, S. A review and update of Sjögren’s syndrome: Manifestations, diagnosis, and treatment. *Am. J. Manag. Care* **2001**, *7*, S433–S443. [[PubMed](#)]
3. Kuo, C.; Grainge, M.J.; Valdes, A.M.; See, L.; Luo, S.; Yu, K.; Zhang, W.; Doherty, M. Familial Risk of Sjögren’s Syndrome and Co-aggregation of Autoimmune Diseases in Affected Families: A Nationwide Population Study. *Arthr. Rheumatol.* **2015**, *67*, 1904–1912. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Breban, M.; Beaufrère, M.; Glatigny, S. The microbiome in spondyloarthritis. *Best Pr. Res. Clin. Rheumatol.* **2019**, *33*, 101495. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Scher, J.U.; Littman, D.R.; Abramson, S.B. Review: Microbiome in Inflammatory Arthritis and Human Rheumatic Diseases. *Arthr. Rheumatol.* **2016**, *68*, 35–45. [[CrossRef](#)]



6. Hevia, A.; Milani, C.; López, P.; Cuervo, A.; Arboleya, S.; Duranti, S.; Turrone, F.; González, S.; Suárez, A.; Gueimonde, M.; et al. Intestinal Dysbiosis Associated with Systemic Lupus Erythematosus. *mBio* **2014**, *5*, e01548-14. [[CrossRef](#)]
7. De Paiva, C.S.; Jones, D.B.; Stern, M.E.; Bian, F.; Moore, Q.L.; Corbiere, S.; Streckfus, C.F.; Hutchinson, D.S.; Ajami, N.J.; Petrosino, J.F.; et al. Altered Mucosal Microbiome Diversity and Disease Severity in Sjögren Syndrome. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 23561. [[CrossRef](#)]
8. Mandl, T.; Marsal, J.; Olsson, P.; Ohlsson, B.; Andréasson, K. Severe intestinal dysbiosis is prevalent in primary Sjögren's syndrome and is associated with systemic disease activity. *Arthr. Res.* **2017**, *19*, 237. [[CrossRef](#)]
9. Zhong, D.; Wu, C.; Zeng, X.; Wang, Q. The role of gut microbiota in the pathogenesis of rheumatic diseases. *Clin. Rheumatol.* **2017**, *37*, 25–34. [[CrossRef](#)]
10. Kim, J.; Lahl, K.; Hori, S.; Loddenkemper, C.; Chaudhry, A.; DeRoos, P.; Rudensky, A.; Sparwasser, T. Cutting Edge: Depletion of Foxp3+ Cells Leads to Induction of Autoimmunity by Specific Ablation of Regulatory T Cells in Genetically Targeted Mice. *J. Immunol.* **2009**, *183*, 7631–7634. [[CrossRef](#)]
11. Honda, K.; Littman, D.R. The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease. *Nat. Cell Biol.* **2016**, *535*, 75–84. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Forbes, J.D.; Van Domselaar, G.; Bernstein, C.N. The Gut Microbiota in Immune-Mediated Inflammatory Diseases. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1081. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Koskenpato, K.; Ainola, M.; Przybyla, B.; Kouri, V.-P.; Virkki, L.; Koskenpato, J.; Ristimäki, A.; Kontinen, Y. Diminished salivary epidermal growth factor secretion: A link between Sjögren's syndrome and autoimmune gastritis? *Scand. J. Rheumatol.* **2016**, *45*, 118–121. [[CrossRef](#)]
14. Ebert, E.C. Gastrointestinal and Hepatic Manifestations of Sjogren Syndrome. *J. Clin. Gastroenterol.* **2012**, *46*, 25–30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Qi, J.; Li, D.; Shi, G.; Zhang, X.; Pan, Y.; Dou, H.; Wang, T.; Yao, G.; Hou, Y. Interleukin-12 exacerbates Sjögren's syndrome through induction of myeloid-derived suppressor cells. *Mol. Med. Rep.* **2019**, *20*, 1131–1138. [[CrossRef](#)]
16. Ferreira, C.M.; Vieira, A.T.; Vinolo, M.A.R.; Oliveira, F.A.; Curi, R.; Martins, F.D.S. The Central Role of the Gut Microbiota in Chronic Inflammatory Diseases. *J. Immunol. Res.* **2014**, *2014*, 1–12. [[CrossRef](#)]
17. Mendez, R.; Watane, A.; Farhangi, M.; Cavuoto, K.M.; Leith, T.; Budree, S.; Galor, A.; Banerjee, S. Gut microbial dysbiosis in individuals with Sjögren's syndrome. *Microb. Cell Fact.* **2020**, *19*, 1–13. [[CrossRef](#)]
18. Van Der Meulen, T.A.; Harmsen, H.J.; Vila, A.V.; Kurilshikov, A.; Liefers, S.C.; Zhernakova, A.; Fu, J.; Wijmenga, C.; Weersma, R.K.; De Leeuw, K.; et al. Shared gut, but distinct oral microbiota composition in primary Sjögren's syndrome and systemic lupus erythematosus. *J. Autoimmun.* **2019**, *97*, 77–87. [[CrossRef](#)]
19. Le Chatelier, E.; Nielsen, T.; Qin, J.; Prifti, E.; Hildebrand, F.; Falony, G.; Almeida, M.; Arumugam, M.; Batto, J.-M.; Kennedy, S.; et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nat. Cell Biol.* **2013**, *500*, 541–546. [[CrossRef](#)]
20. Pianta, A.; Arvikar, S.; Strle, K.; Drouin, E.E.; Wang, Q.; Costello, C.E.; Steere, A.C. Evidence of the Immune Relevance of *Prevotella copri*, a Gut Microbe, in Patients With Rheumatoid Arthritis. *Arthr. Rheumatol.* **2017**, *69*, 964–975. [[CrossRef](#)]
21. Scher, J.U.; Sczesnak, A.; Longman, R.S.; Segata, N.; Ubeda, C.; Bielski, C.; Rostron, T.; Cerundolo, V.; Pamer, E.G.; Abramson, S.B.; et al. Expansion of intestinal *Prevotella copri* correlates with enhanced susceptibility to arthritis. *eLife* **2013**, *2*, e01202. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Eomenetti, S.; Pizarro, T.T. The Treg/Th17 Axis: A Dynamic Balance Regulated by the Gut Microbiome. *Front. Immunol.* **2015**, *6*, 639. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Moon, J.; Choi, S.H.; Yoon, C.H.; Kim, M.K. Gut dysbiosis is prevailing in Sjögren's syndrome and is related to dry eye severity. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0229029. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Favier, C.; Neut, C.; Mizon, C.; Cortot, A.; Colombel, J.F.; Mizon, J. Fecal beta-D-galactosidase production and Bifidobacteria are decreased in Crohn's disease. *Dig. Dis Sci.* **1997**, *42*, 817–822. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Radjabzadeh, D.; Boer, C.G.; Beth, S.A.; Van Der Wal, P.; Jong, J.C.K.-D.; Jansen, M.A.E.; Konstantinov, S.R.; Peppelenbosch, M.P.; Hays, J.P.; Jaddoe, V.W.; et al. Diversity, compositional and functional differences between gut microbiota of children and adults. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1–13. [[CrossRef](#)]

26. Takagi, T.; Naito, Y.; Inoue, R.; Kashiwagi, S.; Uchiyama, K.; Mizushima, K.; Tsuchiya, S.; Dohi, O.; Yoshida, N.; Kamada, K.; et al. Differences in gut microbiota associated with age, sex, and stool consistency in healthy Japanese subjects. *J. Gastroenterol.* **2019**, *54*, 53–63. [[CrossRef](#)]
27. De La Cuesta-Zuluaga, J.; Kelley, S.T.; Chen, Y.; Escobar, J.S.; Mueller, N.T.; Ley, R.E.; McDonald, D.; Huang, S.; Swafford, A.D.; Knight, R.; et al. Age- and Sex-Dependent Patterns of Gut Microbial Diversity in Human Adults. *mSystems* **2019**, *4*, e00261-19. [[CrossRef](#)]
28. Fasano, A. Zonulin and Its Regulation of Intestinal Barrier Function: The Biological Door to Inflammation, Autoimmunity, and Cancer. *Physiol. Rev.* **2011**, *91*, 151–175. [[CrossRef](#)]
29. Sturgeon, C.; Fasano, A. Zonulin, a regulator of epithelial and endothelial barrier functions, and its involvement in chronic inflammatory diseases. *Tissue Barriers* **2016**, *4*, e1251384. [[CrossRef](#)]
30. Wright, D.P.; Rosendale, D.; Robertson, A.M. Prevotella enzymes involved in mucin oligosaccharide degradation and evidence for a small operon of genes expressed during growth on mucin. *FEMS Microbiol. Lett.* **2000**, *190*, 73–79. [[CrossRef](#)]
31. Su, T.; Liu, R.; Lee, A.; Long, Y.; Du, L.; Lai, S.; Chen, X.; Wang, L.; Si, J.; Owyang, C.; et al. Altered Intestinal Microbiota with Increased Abundance of Prevotella Is Associated with High Risk of Diarrhea-Predominant Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterol. Res. Pr.* **2018**, *2018*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Turner, J.R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **2009**, *9*, 799–809. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Iljazovic, A.; Roy, U.; Gálvez, E.J.C.; Lesker, T.R.; Zhao, B.; Gronow, A.; Amend, L.; Will, S.E.; Hofmann, J.D.; Pils, M.C.; et al. Perturbation of the gut microbiome by Prevotella spp. enhances host susceptibility to mucosal inflammation. *Mucosal Immunol.* **2020**, 1–12. [[CrossRef](#)]
34. Sokol, H.; Pigneur, B.; Watterlot, L.; Lakhdari, O.; Bermúdez-Humarán, L.G.; Gratadoux, J.-J.; Blugeon, S.; Bridonneau, C.; Furet, J.-P.; Corthier, G.; et al. Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 16731–16736. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. 35. Tamanai-Shacoori, Z.; Smida, I.; Bousarghin, L.; Loreal, O.; Meuric, V.; Fong, S.B.; Bonnaure-Mallet, M.; Jolivet-Gougeon, A. Roseburia spp.: A marker of health? *Future Microbiol.* **2017**, *12*, 157–170. [[CrossRef](#)]
36. Lewis, K.; Lutgendorff, F.; Phan, V.; Söderholm, J.D.; Sherman, P.M.; McKay, D.M. Enhanced translocation of bacteria across metabolically stressed epithelia is reduced by butyrate. *Inflamm. Bowel Dis.* **2010**, *16*, 1138–1148. [[CrossRef](#)]
37. Masui, R.; Sasaki, M.; Funaki, Y.; Ogasawara, N.; Mizuno, M.; Iida, A.; Izawa, S.; Kondo, Y.; Ito, Y.; Tamura, Y.; et al. G Protein-Coupled Receptor 43 Moderates Gut Inflammation Through Cytokine Regulation from Mononuclear Cells. *Inflamm. Bowel Dis.* **2013**, *19*, 2848–2856. [[CrossRef](#)]
38. Singh, N.; Gurav, A.; Sivaprakasam, S.; Brady, E.; Padia, R.; Shi, H.; Thangaraju, M.; Prasad, P.D.; Manicassamy, S.; Munn, D.H.; et al. Activation of Gpr109a, Receptor for Niacin and the Commensal Metabolite Butyrate, Suppresses Colonic Inflammation and Carcinogenesis. *Immunity* **2014**, *40*, 128–139. [[CrossRef](#)]
39. Fernando, M.R.; Saxena, A.; Reyes, J.L.; McKay, D.M. Butyrate enhances antibacterial effects while suppressing other features of alternative activation in IL-4-induced macrophages. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* **2016**, *310*, G822–G831. [[CrossRef](#)]
40. Saemann, M.D.; Böhmig, G.A.; Österreicher, C.H.; Burtscher, H.; Parolini, O.; Diakos, C.; Stöckl, J.; Hörl, W.H.; Zlabinger, G.J. Anti-inflammatory effects of sodium butyrate on human monocytes: Potent inhibition of IL-12 and up-regulation of IL-10 production. *FASEB J.* **2000**, *14*, 2380–2382. [[CrossRef](#)]
41. Chen, J.; Vitetta, L. The Role of Butyrate in Attenuating Pathobiont-Induced Hyperinflammation. *Immune Netw.* **2020**, *20*, e15. [[CrossRef](#)]
42. Round, J.L.; Mazmanian, S.K. Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 12204–12209. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Louis, P.; Flint, H.J. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environ. Microbiol.* **2017**, *19*, 29–41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Esquivel-Elizondo, S.; Ilhan, Z.E.; Garcia-Peña, E.I.; Krajmalnik-Brown, R. Insights into Butyrate Production in a Controlled Fermentation System via Gene Predictions. *mSystems* **2017**, *2*, e00051-17. [[CrossRef](#)]
45. De Oliveira, G.L.V.; Leite, A.Z.; Higuchi, B.S.; Gonzaga, M.I.; Mariano, V.S. Intestinal dysbiosis and probiotic applications in autoimmune diseases. *Immunology* **2017**, *152*, 1–12. [[CrossRef](#)]

46. Shah, D.; Sah, S.; Nath, S.K. Interaction between glutathione and apoptosis in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun. Rev.* **2013**, *12*, 741–751. [[CrossRef](#)]
47. Spalding, M.D.; Prigge, S.T. Lipoic Acid Metabolism in Microbial Pathogens. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2010**, *74*, 200–228. [[CrossRef](#)]
48. Winslet, M.C.; Poxon, V.; Allan, A.; Keighley, M.R.B. Mucosal glucosamine synthetase activity in inflammatory bowel disease. *Dig. Dis. Sci.* **1994**, *39*, 540–544. [[CrossRef](#)]
49. Abdelhamid, L.; Luo, X.M. Retinoic Acid, Leaky Gut, and Autoimmune Diseases. *Nutrients* **2018**, *10*, 1016. [[CrossRef](#)]
50. Shiboski, C.H.; Shiboski, S.C.; Seror, R.; Criswell, L.A.; Labetoulle, M.; Lietman, T.M.; Rasmussen, A.; Scofield, H.; Vitali, C.; Bowman, S.J.; et al. 2016 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism Classification Criteria for Primary Sjögren’s Syndrome: A Consensus and Data-Driven Methodology Involving Three International Patient Cohorts. *Arthr. Rheumatol.* **2017**, *69*, 35–45. [[CrossRef](#)]
51. Martínez-González, M.-A.; García-Arellano, A.; Toledo, E.; Salas-Salvadó, J.; Buil-Cosiales, P.; Corella, D.; Covas, M.I.; Schröder, H.; Arós, F.; Gómez-Gracia, E.; et al. A 14-Item Mediterranean Diet Assessment Tool and Obesity Indexes among High-Risk Subjects: The PREDIMED Trial. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e43134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Bolyen, E.; Rideout, J.R.; Dillon, M.R.; Bokulich, N.A.; Abnet, C.C.; Al-Ghalith, G.A.; Alexander, H.; Alm, E.J.; Arumugam, M.; Asnicar, F.; et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat. Biotechnol.* **2019**, *37*, 852–857. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Sánchez-Alcoholado, L.; Ordóñez, R.; Otero, A.; Plaza-Andrade, I.; Laborda-Illanes, A.; Medina, J.A.; Ramos-Molina, B.; Gómez-Millán, J.; Queipo-Ortuño, M.I. Gut Microbiota-Mediated Inflammation and Gut Permeability in Patients with Obesity and Colorectal Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 6782. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Bhute, S.; Pande, P.; Shetty, S.A.; Shelar, R.; Mane, S.; Kumbhare, S.V.; Gawali, A.; Makhani, H.; Navandar, M.; Dhotre, D.; et al. Molecular Characterization and Meta-Analysis of Gut Microbial Communities Illustrate Enrichment of Prevotella and Megasphaera in Indian Subjects. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 660. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)). *Methods* **2001**, *25*, 402–408. [[CrossRef](#)]

**Publisher’s Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).