



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma de Barcelona

**Biomarcadores diagnósticos y
de actividad en el Síndrome de
Sjögren Primario**

Jose Loureiro Amigo

Tesis Doctoral

Biomarcadores diagnósticos y de actividad en el Síndrome de Sjögren Primario

Autor: Jose Loureiro Amigo

Directora de la tesis: Roser Solans Laqué

Tutor de la tesis: Albert Selva O'Callaghan

Programa de Doctorado en Medicina

Departamento de Medicina.

Facultad de Medicina.

Universidad Autónoma de Barcelona

Año de depósito: 2022

A mi madre y a mis abuelos

Agradecimientos

En primer lugar me gustaría agradecer a Roser Solans la confianza que depositó en mí al ofrecerme participar en el proyecto que finalmente dio lugar a esta tesis. Esta tesis solo ha sido posible gracias al infatigable trabajo que has realizado durante muchos años en el hospital llevando a los pacientes con síndrome de Sjögren. Sin tu pasión, nunca habría llegado a interesarme por esta enfermedad que a mí siempre me había parecido el patito feo de las autoinmunes. Por eso, te doy las gracias por haber sido mi tutora en los últimos años de la residencia, por tus enseñanzas sobre las enfermedades autoinmunes, por tu paciencia para guiarme en este largo camino pero, sobre todo, te doy las gracias por imprimir en mí tu incansable espíritu crítico, que me acompañará ya para siempre en todos los proyectos que emprenda.

También quiero dar las gracias a Albert Selva por haber sido el tutor de esta tesis, pero más aún por su infatigable y contagiosa pasión por la Medicina y por las enfermedades autoinmunes, sin la cual seguramente esta tesis no habría existido.

Asimismo, esta tesis doctoral no habría sido posible sin la ayuda de muchos otros investigadores del Hospital Vall d'Hebrón. Me gustaría destacar el esfuerzo de Carlos García desde el departamento de Hematología, cuyo trabajo fue imprescindible para el análisis del inmunofenotipo linfocitario de los pacientes.

También quiero destacar el soporte del departamento de Inmunología, especialmente de Clara Franco y de Janire Perurena, que fueron infinitamente pacientes conmigo y me brindaron el soporte sin el cual no habría sabido ni por donde empezar el análisis de las citoquinas de los pacientes.

No puedo dejar de estar agradecido a los que fueron mis adjuntos y mis residentes mayores de Medicina Interna durante la residencia, ya que son las personas que me enseñaron a ser el médico que soy y a ser siempre metódico para no meter la pata. En especial gracias a Eva, a Javier y a Sheila porque siempre seréis mis MAUs. Y gracias a Marc, a David y a Montse y a Cris porque siempre seréis mis residentes mayores.

Una mención especial a mis coR por haber sido compañeros de fatigas, viajeros todoterrenos con los que recorrer medio mundo, amigos y una fuente de inspiración tanto en la Medicina como en la vida.

A Joaquim Martínez, a Yolanda Meije, a Cristina Cortés y a Luis Ceresuela por haber creído en mí y darme una oportunidad cuando las circunstancias eran adversas.

A Guillermo, por tu amistad inquebrantable, tu generosidad sin límites y tu apoyo durante todos estos años, ya a menudo has tenido más confianza que yo en que esta tesis doctoral llegaría a terminarse algún día.

A Violeta, una amiga que siempre tiene una sonrisa para animarte, pero también una fuente de inspiración por tu ilusión inagotable, tu enorme capacidad de trabajo y tu rigor científico.

A Elia, que aunque llegaste al final, has estado siempre ahí en los momentos importantes y has sabido tener la paciencia y la comprensión necesaria para aguantarme en el último, pero más difícil, tramo de esta tesis doctoral.

Pero, sobre todo, gracias a mi madre y a mis abuelos, sin cuyo sacrificio y apoyo incondicional no habría podido llegar hasta aquí.

Abreviaturas

ACR: *American College of Rheumatology* (Colegio Americano de Reumatología)

AECG: grupo de consenso americano-europeo

AINE: antiinflamatorio no esteroideo

ANA: anticuerpos antinucleares

APRIL: *A proliferation-inducing ligand* (ligando inductor de la proliferación A)

AR: artritis reumatoide

AUC: *area under the curve* (área bajo la curva)

β 2MG: β -2-microglobulina

BAFF: *B-cell activating factor* (factor activador de células B)

BGSm: biopsia de glándula salival menor

BUT: *break-up time* (tiempo de ruptura)

CD: *cluster of differentiation* (grupos de diferenciación)

CIDP: *chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy* (polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica)

CK: creatina quinasa

CMV: citomegalovirus

CVF: capacidad vital forzada

CXCL: *chemokine (C-X-C motif) ligand* (ligando de quimioquina (motivo C-X-C))

DE: desviación estándar

DLCO: capacidad de difusión de monóxido de carbono

EMG: electromiograma

ENG: electroneurograma

ES: esclerosis sistémica

ESSDAI: *EULAR Sjögren Syndrome Disease Activity Index* (Índice de actividad de la enfermedad en síndrome de Sjögren del EULAR)

EULAR: *European League Against Rheumatism* (Liga Europea contra el Reumatismo)

FR: factor reumatoide

Hb: hemoglobina

HLA: *human leukocyte antigen* (antígenos leucocitarios humanos)

HTLV-I: *Human T-Lymphotropic Virus 1* (virus linfotrópico T humano tipo 1)

ICAM-1: *intercellular adhesion molecule 1* (molécula de adhesión intercelular 1)
ICOS: *inducible T cell co-stimulator* (estimulador de células T inducible)
ICOSL: *inducible T cell co-stimulator ligand* (ligando del estimulador de células T inducible)
IFN: interferón
IgG: inmunoglobulina G
IGIV: inmunoglobulinas intravenosas
IgM: inmunoglobulina M
IL: interleuquina
kDa: kiloDalton
LDCBG: linfoma difuso de células B grandes
LES: lupus eritematoso sistémico
LH: linfoma Hodgkin
LNH: linfoma no-Hodgkin
LZM: linfoma de la zona marginal
MALT: *mucosa-associated lymphoid tissue* (tejido linfoide asociado a las mucosas)
MHC: *major histocompatibility complex* (complejo mayor de histocompatibilidad)
miRNA: micro-RNA (*ribonucleic acid*, ácido ribonucleico)
MMP: *matix metalloproteinasa* (metaloproteinasas de matriz)
mRNA: *messenger ribonucleic acid* (ácido ribonucleico mensajero)
NK: *natural killer* (asesina natural)
PD-L2: *programmed death ligand 2* (ligando de muerte programada 2)
RNA: *ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)
ROC: *Receiver Operating Characteristics*
SIDA: síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SIR: *standardized incidence ratio* (tasa de incidencia estandarizada)
SMR: *standardized mortality ratio* (tasa de mortalidad estandarizada)
SNC: sistema nervioso central
SNP: sistema nervioso periférico
SS: síndrome de Sjögren
SSp: síndrome de Sjögren primario
TCAR: tomografía computerizada de alta resolución

TFG: tasa de filtrado glomerular

T_{FH}: *T follicular helper* (T colaboradores foliculares)

T_H: *T helper* (T colaboradores)

TLR: *Toll-like receptors* (receptores Toll-like)

TNF: *tumor necrosis factor* (factor de necrosis tumoral)

VEB: virus de Epstein-Barr

VHB: virus de la hepatitis B

VHC: virus de la hepatitis C

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

VSG: velocidad de sedimentación globular

ÍNDICE

Resumen	1
Summary	3
1. Introducción	5
1.1. Síndrome de Sjögren	7
1.2. Utilidad de las poblaciones linfocitarias circulantes en el diagnóstico del SSp	36
1.3. Utilidad de las citoquinas y quimioquinas séricas como biomarcadores en el SSp	38
2. Hipótesis	41
3. Objetivos	45
4. Artículos que forman parte de la presente tesis doctoral	49
4.1. Artículo 1	51
4.2. Artículo 2	65
5. Resumen global de los resultados	77
6. Resumen global de la discusión	87
7. Conclusiones	103
8. Líneas de futuro.....	107
9. Bibliografía.....	111
10. Anexos.....	141
10.1. Anexo 1. Financiación	143

RESUMEN

El objetivo de esta tesis doctoral fue evaluar la utilidad de las subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica y de los niveles séricos de BAFF, IL-17, IL-18, IL-21, IL-22, CXCL13, TNF-R2 y PD-L2 como biomarcadores diagnósticos y de actividad en los pacientes con síndrome de Sjögren primario (SSp). Para alcanzar este objetivo se han llevado a cabo dos estudios observacionales en el Hospital Universitari Vall d'Hebron entre abril de 2014 y septiembre 2017. El diagnóstico de SSp se estableció de acuerdo con los criterios clasificatorios del año 2002 del AECG.

En el primer estudio se incluyeron 68 pacientes con SSp, 26 pacientes con síndrome seco no-Sjögren (síndrome seco no asociado a ninguna enfermedad autoinmune) y 23 voluntarios sanos, y se analizó la distribución de las poblaciones linfocitarias circulantes mediante citometría de flujo. Los pacientes con SSp presentaban una menor proporción de linfocitos B de memoria y una mayor proporción de linfocitos B *naïve* (B_{NA}) y linfocitos T activados en sangre periférica. La proporción de linfocitos B de memoria *non-switched* (B_{NSM}) resultó el mejor parámetro individual para diferenciar entre pacientes con SSp y pacientes con síndrome seco no-Sjögren, con una sensibilidad del 72% y una especificidad del 76,6% para un punto de corte $<7,3\%$ (AUC 0,795). El cociente B_{NA}/B_{NSM} mostró una sensibilidad del 76,6% y una especificidad del 72%, con un punto de corte >9 (AUC 0,789). No obstante, el mejor parámetro diagnóstico fue el cociente entre el porcentaje de linfocitos B_{NSM} y el de linfocitos T $CD4^+$ activados ($CD4_{ACT}$), que con un punto de corte $<4,1$ mostró una sensibilidad de 83,3% y una especificidad de 81,7% (AUC 0,840). Se evaluó también la capacidad de las subpoblaciones linfocitarias circulantes para discriminar entre SSp seronegativo (anti-Ro/SSA y anti-La/SSB negativos) y síndrome seco no-Sjögren. El cociente $B_{NA}/CD4_{ACT}$ mostró una sensibilidad del 75% y una especificidad del 66% con punto de corte $<4,4$ (AUC 0,742). No obstante, el mejor parámetro diagnóstico en el SSp seronegativo fue el recuento absoluto de linfocitos T $CD4^+$ *naïve*, que mostró una sensibilidad de 76,9% y una especificidad de 88,9% para un punto de corte <312 células/ μ L (AUC 0,821). La conclusión del estudio fue que el desequilibrio en la distribución de las subpoblaciones linfocitarias B y T que existe en los pacientes con SSp puede ser útil en el diagnóstico de la enfermedad.

En el segundo estudio se analizó si existía asociación entre las concentraciones séricas de BAFF, IL-17, IL-18, IL-21, IL-22, CXCL13, TNF-R2 y PD-L2 y diferentes parámetros de actividad de la enfermedad (puntuación ESSDAI, niveles séricos de β 2MG e IgG) o con la distribución de las subpoblaciones linfocitarias circulantes en pacientes con SSp, así como el rendimiento diagnóstico de estas citoquinas para discriminar entre pacientes con SSp y pacientes con síndrome seco no-Sjögren. Para ello se analizaron con un kit comercial de inmunoensayo estas citoquinas en el suero de 66 pacientes con SSp, 25 pacientes con síndrome seco no-Sjögren y 23 voluntarios sanos. Los pacientes con SSp, comparados con el grupo control (formado por los pacientes con síndrome seco no-Sjögren y los voluntarios sanos), mostraron niveles más elevados de BAFF (1982,6 vs. 1508,9 pg/mL; $p=0,0037$), CXCL13 (594,8 vs. 346,9 pg/mL; $p=0,0002$) e IL-21 (231,9 vs. 51,4 pg/mL; $p=0,0011$), así como niveles más bajos de PD-L2 (2113,9 vs. 2843,6 pg/mL; $p=0,0071$). Los pacientes con SSp con ESSDAI >0 presentaron concentraciones séricas más elevadas de CXCL13 (696,9 vs. 359,8 pg/mL; $p=0,0091$), IL-21 (311,1 vs. 49,8 pg/mL; $p=0,0461$), IL-22 (98,4 vs. 59,1 pg/mL; $p=0,0464$) y TNF-R2 (278,8 vs. 207,4 pg/mL; $p=0,0164$). Los niveles séricos de IgG se correlacionaron con los niveles de IL-21 ($r=0,553$; $p<0,0001$) e IL-22 ($r=0,511$; $p<0,0001$). La IL-21 mostró una correlación negativa con la proporción de linfocitos B de memoria ($r=-0,344$; $p=0,0062$) y una correlación positiva con la proporción de linfocitos B *naïve* ($r=0,379$; $p=0,0024$), mientras que el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ activados se correlacionó con las concentraciones séricas de IL-22 ($r=0,331$; $p=0,0110$) y TNF-R2 ($r=0,349$; $p=0,0072$). Para discriminar entre SSp y síndrome seco no-Sjögren, los niveles séricos de CXCL13 fueron el mejor parámetro individual (AUC 0,799) con una sensibilidad del 77,3% y una especificidad del 68% (punto de corte >240 pg/mL), aunque el cociente entre CXCL13 y PD-L2 mostró la mejor especificidad (84%) para el punto de corte $>0,1$, con una sensibilidad del 72,7% (AUC 0,788). No obstante, el mejor parámetro para discriminar entre pacientes con SSp y pacientes con síndrome seco-no Sjögren fue la combinación de los niveles séricos de CXCL13, BAFF y PD-L2 usando la fórmula $[\ln(\text{CXCL13})+\ln(\text{BAFF})]/\ln(\text{PD-L2})$, que con un punto de corte $>1,7$ mostró una sensibilidad de 77,2% y una especificidad de 86,4% (AUC 0,854).

SUMMARY

The objective of this doctoral Thesis was to evaluate the utility of lymphocyte subpopulations in peripheral blood and the serum levels of BAFF, IL-17, IL-18, IL-21, IL-22, CXCL13, TNF-R2 and PD-L2 as diagnostic and disease activity biomarkers in patients with primary Sjögren's syndrome (pSS). To achieve this objective, two observational studies were carried out at the Vall d'Hebron University Hospital between April 2014 and September 2017. The diagnosis of pSS was established according to the 2002 AECG classification criteria.

The first study included 68 patients with pSS, 26 patients with non-Sjögren *sicca* syndrome (*sicca* syndrome not associated with any autoimmune disease), and 23 healthy volunteers, and the distribution of circulating lymphocyte populations was analysed using flow cytometry. Patients with pSS showed a reduced proportion of memory B lymphocytes and an increased proportion of naïve B lymphocytes and activated T lymphocytes in peripheral blood. The percentage of non-switched memory B lymphocytes was the best individual parameter to differentiate between patients with pSS and patients with non-Sjögren *sicca* syndrome, yielding a sensitivity of 72% and a specificity of 76.6% using a cut-off point $<7.3\%$ (AUC 0.795). The ratio between the percentage of naïve B lymphocytes and non-switched memory B lymphocytes yielded a sensitivity of 76.6% and a specificity of 72% using a cut-off point >9 (AUC 0.789). However, the best diagnostic parameter was the ratio between the percentages of non-switched memory B lymphocytes and activated CD4⁺ T lymphocytes, which showed a sensitivity of 83.3% and a specificity of 81.7% using a cut-off point <4.1 (AUC 0.840). The accuracy of circulating lymphocyte subpopulations to discriminate between seronegative pSS (negative anti-Ro/SSA and anti-La/SSB) and non-Sjögren *sicca* syndrome was also evaluated. The ratio between the percentages of non-switched memory B lymphocytes and activated CD4⁺ T lymphocytes yielded a sensitivity of 75% and a specificity of 66% using a cut-off point <4.4 (AUC 0.742). However, the best diagnostic parameter in seronegative pSS was the absolute count of naïve CD4⁺ T lymphocytes, which showed a sensitivity of 76.9% and a specificity of 88.9% using a cut-off point <312 cells/ μ L (AUC 0.821). We concluded that the imbalance in the distribution of B and T lymphocyte subpopulations present in pSS may be a useful tool for diagnosis.

In the second study, we analysed the relationship between serum levels of BAFF, IL-17, IL-18, IL-21, IL-22, CXCL13, TNF-R2 and PD-L2 and different parameters related to disease activity (ESSDAI score, serum levels of β 2MG and IgG), as well as with the distribution of circulating lymphocyte subpopulations in patients with pSS. We also investigate the diagnostic performance of these serum cytokines to discriminate between patients with pSS and patients with non-Sjögren *sicca* syndrome. Serum levels of cytokines were analysed using a commercial immunoassay kit in 66 patients with pSS, 25 patients with non-Sjögren *sicca* syndrome and 23 healthy volunteers. Compared to control group (composed with patients with non-Sjögren *sicca* syndrome and healthy volunteers), patients with pSS exhibited higher levels of BAFF (1982.6 vs. 1508.9 pg/mL, $p=0.0037$), CXCL13 (594.8 vs. 346.9 pg/mL, $p=0.0002$) and IL-21 (231.9 vs. 51.4 pg/mL, $p=0.0011$), as well as lower levels of PD-L2 (2113.9 vs. 2843.6 pg/mL, $p=0.0071$). Patients with pSS with ESSDAI >0 showed higher serum concentrations of CXCL13 (696.9 vs. 359.8 pg/mL, $p=0.0091$), IL-21 (311.1 vs. 49.8 pg/mL, $p=0.0461$), IL-22 (98.4 vs. 59.1 pg/mL, $p=0.0464$) and TNF-R2 (278.8 vs. 207.4 pg/mL, $p=0.0164$). Serum IgG levels correlated with serum levels of IL-2 ($r=0.553$, $p<0.0001$) and IL-22 ($r=0.511$, $p<0.0001$). Moreover, serum levels of IL-21 showed negative correlation with memory B lymphocyte percentage ($r=-0.344$, $p=0.0062$) and positive correlation with naïve B lymphocyte percentages ($r=0.379$, $p=0.0024$), while the percentage of activated CD4⁺ T cells correlated with serum concentrations of IL-22 ($r=0.331$; $p=0.0110$) and TNF-R2 ($r=0.349$; $p=0.0072$). CXCL13 levels were the best individual biomarker to discriminate between pSS and non-Sjögren *sicca* syndrome patients (AUC 0.799), yielding a sensitivity of 77.3% and a specificity of 68% (cut-off point >240 pg/mL), although the ratio between CXCL13 and PD-L2 showed the best specificity (84%) using the cut-off point >0.1 , with a sensitivity of 72.7% (AUC 0.788). However, the best parameter to discriminate between pSS and non-Sjögren *sicca* syndrome, was the combination of CXCL13, BAFF and PD-L2 serum levels using the formula $[\ln(\text{CXCL13})+\ln(\text{BAFF})]/\ln(\text{PD-L2})$, which yielded a sensitivity of 77.2% and a specificity of 86.4% using a cut-off point >1.7 (AUC 0.854).

1. Introducción

1.1. Síndrome de Sjögren

El síndrome de Sjögren (SS) es una enfermedad autoinmune sistémica caracterizada por una inflamación crónica de las glándulas exocrinas, especialmente de las glándulas lagrimales y salivales, que se manifiesta habitualmente en forma de sequedad ocular y oral, pero que también puede provocar manifestaciones extraglandulares en múltiples órganos y se asocia con un elevado riesgo de desarrollo de linfoma.

1.1.1. Perspectiva histórica

La primera descripción del SS como una entidad nosológica propia se atribuye al oftalmólogo sueco Henrik Sjögren (1899-1986), que en 1933 presentó su tesis doctoral, en la que describía las características clínicas y anatomopatológicas de una serie de 19 mujeres que presentaban xeroftalmía (sequedad ocular) y xerostomía (sequedad oral) y 13 de ellas también artritis(1). Varias décadas antes, algunos autores habían descrito ya la existencia de pacientes con sequedad oral y ocular. En 1888, W. B. Hadden había presentado en la *Clinical Society of London* el caso de una mujer de 65 años que refería una xerostomía grave (que había mejorado tras tratamiento con pilocarpina) y ausencia de secreción lagrimal, aunque con una conjuntiva ocular de aspecto normal(2). En 1925, el dermatólogo francés Henri Gougerot describió tres pacientes que presentaban atrofia de glándulas salivares y sequedad de las mucosas oral, nasal, laríngea y vulvar, siendo el primero en proponer que la xerostomía y la xeroftalmía formaban parte de un “síndrome seco” más amplio, cuya causa podía ser una noxa común en las glándulas excretoras o una alteración en su inervación simpática(3). Sin embargo, Sjögren fue el primero en señalar que esta constelación de síntomas y signos constituía una auténtica enfermedad sistémica(1). Ya en 1930, Sjögren había introducido el término *keratoconjunctivitis sicca* para describir las manifestaciones oculares de una paciente que presentaba sequedad lagrimal, oral y cutánea y un “reumatismo crónico”(4). Posteriormente, Sjögren enfatizó en su tesis doctoral el hecho de que la queratoconjunctivitis seca que presentaban estas pacientes era debida a un déficit acuoso, lo que constituía una diferencia fundamental con la xeroftalmía producida

por la hipovitaminosis A, debida fundamentalmente a un déficit en la producción de mucina.

Aunque hoy se reconoce la tesis doctoral de Sjögren como la descripción seminal de lo que actualmente conocemos como SS, el propio Sjögren no consideró que estuviera describiendo una enfermedad nueva, sino confirmando y ampliando el conocimiento sobre la queratitis filamentosa descrita en 1882 por el oftalmólogo alemán T. Leber (1840-1917) y posteriormente por otros autores(5). Curiosamente, el tribunal calificó la tesis de Sjögren con un 1,5 sobre 3, lo que no fue suficiente para que Sjögren pudiese acceder a un puesto docente(6). A pesar de ello, ya en 1936 Stephan von Grösz propuso denominar a la tríada formada por la queratoconjuntivitis seca, la xerostomía y la artritis como “síndrome de Sjögren”(7). Este epónimo se diseminó rápidamente entre la comunidad médica(8,9), especialmente tras publicarse en 1943 la traducción de la tesis de Sjögren del alemán al inglés por el oftalmólogo australiano J. B. Hamilton(10). Gracias al reconocimiento internacional, finalmente Sjögren fue nombrado en 1957 profesor en la Universidad de Gotemburgo y cuatro años más tarde profesor honorario por el gobierno sueco(6).

El concepto actual del SS como una enfermedad autoinmune se desarrolló a partir de la década de los 50 y durante los años 60 cuando diversos trabajos describen la existencia de hipergammaglobulinemia y autoanticuerpos en los pacientes con SS, lo que apoyaba la idea de una etiopatogenia autoinmune(11–14). Ya en 1975, Alspaugh identificó por primera vez los anticuerpos anti-SSA y anti-SSB en pacientes con SS, que hoy se consideran relativamente específicos del SS(15). Durante la década de 1970 se caracterizó la infiltración linfoide T y B que se observa en las glándulas salivales y alrededor del epitelio de otros órganos en los pacientes con SS(16) y en 1978 se señala por primera vez el riesgo de desarrollo de linfoma en los pacientes con SS(17). Con el avance del entendimiento de la patogenia del SS, en los años 80 y 90 se propuso cambiar la denominación de la enfermedad por “exocrinopatía autoinmune” o “epitelitis autoinmune”, pero finalmente se ha mantenido el epónimo de SS hasta la actualidad(16,18).

En 1980 se propone por primera vez una subdivisión formal del SS en primario y secundario(19). Así, el concepto de SS secundario comprendería aquellos pacientes que presentan sequedad ocular y oral asociados a otra enfermedad autoinmune

(especialmente artritis reumatoide (AR), esclerosis sistémica (ES) y lupus eritematoso sistémico (LES)), mientras que el SS primario (SSp) abarcaría a los pacientes que presentan un SS no asociado a otra enfermedad autoinmune(19). Esta clasificación se ha mantenido en los últimos 40 años, pero cada vez está más en entredicho y se ha propuesto abandonar el concepto de SS secundario en favor de un entendimiento de estos casos como un síndrome de solapamiento, tan habituales en las enfermedades del tejido conectivo, o incluso como lo que se ha venido en denominar “poliautoinmunidad”(20,21).

1.1.2. Epidemiología

El SSp es una de las enfermedades autoinmunes sistémicas más prevalentes. Afecta predominante a mujeres, con una relación mujeres/hombres de 9:1, y una edad media al diagnóstico de 53 años(22,23).

Los estudios epidemiológicos realizados en Europa, con metodología rigurosa (de base poblacional y con verificación de los casos mediante criterios clasificatorios) han mostrado una prevalencia de SSp que oscila entre 11,34 y 84,5 por 100.000 habitantes, y la combinación de estos resultados permite estimar una prevalencia de 38,95/100.000 habitantes o un caso por cada 2567 habitantes(24–27). Un metaanálisis de 2015 mostró una prevalencia de 60,82 por 100.000 habitantes (IC 95%: 43,69-77,95) y una tasa de incidencia de 6,92 casos por 100.000 personas-año (IC 95%: 4,98-8,86), pero hay que tener en cuenta que los estudios de prevalencia incluidos son muy heterogéneos y la metodología de muchos de ellos cuestionable(23).

Un estudio reciente realizado en Cataluña (MAS-CAT PADRIS) con datos del período 2012-2017 mostró una prevalencia de SSp de 260 por 100.000 habitantes. No obstante, este estudio identificó los casos mediante la codificación diagnóstica ICD-9-CM y no utilizó ningún tipo de criterios clasificatorios para verificar los diagnósticos de enfermedad autoinmune, por lo que las cifras sobreestiman la prevalencia real de estas enfermedades; aun así, el estudio es interesante porque permite comprobar que dentro de las enfermedades del tejido conectivo, el SSp es la más frecuente, por encima del LES, y dentro de las enfermedades autoinmunes

sistémicas es la tercera más frecuente después de la polimialgia reumática y la AR(28).

1.1.3. Etiopatogenia

En el modelo patogénico del SSp más aceptado en la actualidad se considera que hay una fase inicial en la que un factor ambiental, posiblemente un agente viral, en individuos con predisposición genética y bajo determinados factores epigenéticos y hormonales, es capaz de provocar una activación inmune del epitelio glandular salival mediada por la activación de receptores *Toll-like*(29,30). Esta activación provoca la sobreexpresión de moléculas de adhesión y la secreción de citoquinas y quimioquinas de la vía de los interferones tipo I, que promueven el reclutamiento y la activación de células del sistema inmune innato y de linfocitos autorreactivos. Los linfocitos T autorreactivos provocan daño tisular con liberación de autoantígenos y amplifican la respuesta inflamatoria, promoviendo la activación y la diferenciación de los linfocitos B y la producción de autoanticuerpos. Una vez iniciada, esta respuesta inflamatoria se autoperpetúa y se mantiene en el tiempo, lo que acaba provocando un daño tisular irreversible en las glándulas exocrinas con la consiguiente pérdida de función glandular(29).

1.1.3.1. Determinantes etiológicos

- *Factores ambientales*: los virus se han postulado como los agentes etiológicos más plausibles del SSp en base a la firma de IFN tipo I y la activación de los TLR-7 que se ha constatado en los pacientes con SSp(30–32). Sin embargo, a pesar de numerosos estudios, no se ha podido demostrar una relación causal entre el SSp y VEB, CMV, VHC, HTLV-I, retrovirus o *Coxsackie A*. Se ha propuesto que quizá el estímulo viral puede no ser único o que únicamente sería el desencadenante inicial del proceso, pero ya no sería detectable al diagnóstico de la enfermedad; también se ha propuesto que la sobreexpresión de secuencias retrovirales endógenas podría ser la causa de la activación de la vía del IFN tipo I (29).

- *Factores genéticos*: los estudios de asociación de genoma completo (GWAS) han permitido identificar diferentes genes asociados al SSp. Las asociaciones más fuertes se encuentran en los genes del complejo HLA de clase II, especialmente en los locus DQ y DR, reflejando la importancia que tiene en la patogenia del SSp la presentación de antígenos a los linfocitos T CD4⁺; los polimorfismos en los *loci HLA-DQB1, HLA-DQA1, HLA-DQA2, HLA-DRB1, HLA-DQA1* y *HLA-DPBI* se asocian al SSp con OR que oscilan entre 1,5 y 3,5. Otros genes implicados en la respuesta inmune tanto innata como adaptativa se han asociado también con el SSp, tales como *IRF5, STAT4, IL-12A* y *OAS1* (implicados en las vías de señalización del IFN tipo I y la sobreexpresión de genes inducidos por IFN); *TNFAIP3* y *TNIP1* (implicados en la señalización NF-κB en múltiples tipos de células); *BLK* (implicado en la activación y diferenciación de linfocitos B) o *CXCR5* (implicado en el tráfico linfocitario)(33).
- *Factores epigenéticos*: se ha observado una hipometilación de los genes inducidos por IFN en los linfocitos y sobre todo en las células del epitelio glandular salival y se ha postulado que esto favorecería la liberación de autoantígenos y la activación de los linfocitos B(34). Recientemente se ha descrito que la expresión de algunos miRNA está alterada en los pacientes con SSp, siendo el miR-146a/b el ejemplo mejor estudiado(33).
- *Factores hormonales*: el SSp afecta predominantemente a mujeres y generalmente entre la cuarta y la quinta década de la vida, lo que sugiere un papel importante de las hormonas sexuales(35). Los varones con síndrome de Klinefelter también tienen un riesgo 20 veces mayor de desarrollar SSp que los hombres sanos, hecho que también sugiere un papel del cromosoma X en la patogenia del SSp(36). Se sabe que los andrógenos suprimen la inflamación y mejoran la función glandular lagrimal en ratones hembra del modelo animal de SSp(37). La ooforectomía de ratones hembra sanas favorece la apoptosis del epitelio glandular salival y la liberación de α-fodrina, un autoantígeno implicado en el SSp; la transferencia de linfocitos T reactivos contra la α-fodrina a estos ratones provoca el desarrollo de una exocrinopatía autoinmune similar al SSp(38). También se ha descrito el desarrollo de infiltrados

linfocitarios en las glándulas salivales y lagrimales en ratones deficientes en aromatasa e incluso en pacientes en tratamiento con inhibidores de la aromatasa(39,40).

1.1.3.2. Inmunidad innata y epitelio glandular salival

Las células del epitelio glandular salival normal expresan de forma constitutiva una gran cantidad de moléculas inmunocompetentes que están implicadas en las respuestas inmunes innatas y adaptativas normales(41). Sin embargo, en los pacientes con SSp el epitelio glandular salival presenta una activación inmune intrínseca que se caracteriza por un incremento de la expresión de receptores *Toll-like* (TLR1, TLR2, TLR3 y TLR4), moléculas de adhesión (ICAM-1), MHC de clase I, moléculas coestimuladoras (CD80, CD86 o CD40), moléculas relacionadas con la apoptosis (Fas y Fas-ligando), citoquinas (BAFF, IL-1, IL-6, TNF α) y quimioquinas (CXCL9, CXCL10, CXCL12, CXCL13, CXCL19 y CXCL21)(42,43). Esta activación intrínseca también se ha asociado con la expresión *in situ* del protooncogén *c-myc* y con una redistribución aberrante de los autoantígenos Ro/SSA y La/SSB en las células del epitelio glandular salival de los pacientes con SSp(44).

El epitelio glandular salival es por tanto un elemento clave en la formación, regulación y mantenimiento de los infiltrados linfocitarios que se observan en las glándulas salivales de los pacientes con SSp. Se ha observado que es capaz de mediar la activación de los linfocitos T CD4⁺ *naïve* y promover su diferenciación en linfocitos T_{FH} funcionales mediante la expresión de IL-6 e ICOSL(45). Por otra parte, la sobreexpresión de BAFF sugiere que el epitelio glandular salival está involucrado en la diferenciación de las células B y la formación de centros germinales ectópicos(44). En estos procesos colaboran las células dendríticas, que secretan IL-12 promoviendo la polarización de los linfocitos T_H hacia T_H1, así como las células dendríticas plasmacitoides, que son estimuladas por inmunocomplejos circulantes para producir IFN α , que promueve la apoptosis del epitelio glandular salival, la secreción de BAFF y mantiene el bucle inflamatorio(43,44).

La presentación de los autoantígenos intracelulares Ro/SSA y La/SSB al sistema inmune se produce mediante dos mecanismos. El primero es la apoptosis de las células del epitelio glandular salival, que se encuentra aumentada en los pacientes

con SSp por diversos factores, incluyendo el ambiente proapoptótico generado por las señales inmunes de los linfocitos que infiltran este epitelio, por la estimulación del receptor TLR3 y por el déficit de estrógenos. El segundo mecanismo implicado es la secreción por las células del epitelio glandular salival de exosomas ricos en elementos del citoesqueleto epitelial tales como citoqueratinas, miRNA y los autoantígenos Ro/SSA, La/SSB y Sm; estos exosomas son capaces de mediar la transferencia de antígenos a las células presentadoras de antígeno(44).

La disfunción de las glándulas salivales característica del SSp se debe a la inflamación crónica del epitelio glandular salival, pero también se han implicado otros mecanismos tales como: la reducción en la liberación de neurotransmisores mediada por citoquinas, la respuesta inmune celular y humoral contra el receptor de acetilcolina muscarínico tipo 3, el efecto de TNF α sobre la distribución de la acuoporina 5 en las células de los acinos glandulares salivales, y la alteración de la producción y el tráfico de mucinas(44).

1.1.3.3. Inmunidad adaptativa e inflamación crónica

El infiltrado inflamatorio que se observa en las glándulas salivales de los pacientes con SSp se organiza en agregados que están compuestos mayoritariamente por linfocitos T distribuidos en la periferia de la lesión y linfocitos B que se localizan en el centro, o en centros germinales ectópicos; otras células como macrófagos, células dendríticas, células dendríticas plasmacitoides y células NK representan menos del 10% de composición de los infiltrados inflamatorios(46,47). En los pacientes con infiltrados leves y focales predominan los linfocitos T, mientras que en los pacientes con infiltrados graves y difusos los linfocitos B suponen hasta el 50% de la celularidad y parece que dicha composición no se modifica de forma sustancial con el tiempo(46,48).

Los linfocitos CD4⁺ (T_H) representan la mayoría de los linfocitos T que infiltran las glándulas salivales en los pacientes con SSp, especialmente en las lesiones leves y/o iniciales(46,47). El subtipo T_H1 es el más relevante y se ha descrito un aumento de las citoquinas T_H1 (IL-1 β , IL-6, TNF α e IFN γ) tanto a nivel de mRNA como a nivel proteico en las glándulas salivales de los pacientes con SSp(49,50). El IFN γ en particular promueve la activación del epitelio glandular

salival y su apoptosis(51). Un subtipo especializado de linfocitos T de memoria ($CD4^+CXCR5^+$), conocido como células T colaboradoras foliculares (T_{FH}) está especialmente implicado en la patogenia del SSp mediante la expresión de IL-21, y es clave en la formación de centros germinales, en la diferenciación de los linfocitos B y en la maduración de los anticuerpos de alta afinidad(51,52). Otro subtipo importante en la patogenia del SSp son los linfocitos T_{H17} , que tienen un rol fundamental en la fisiología normal de las mucosas. En el SSp, el ambiente inflamatorio generado por las citoquinas secretadas por las células dendríticas y por las células del epitelio glandular salival estimula la diferenciación y la activación de los linfocitos T_{H17} ; una vez activados promueven la inflamación glandular mediante la secreción de IL-17 e IL-22, que a su vez promueven la secreción de IL-6 y $TNF\alpha$ por el epitelio glandular salival, así como la producción de la metaloproteasa MMP-9, que contribuye a la destrucción glandular(53). Por otra parte, la IL-22 es clave en el reclutamiento de linfocitos B y la formación de centros germinales ectópicos(54).

Algunos elementos característicos del SSp como la presencia de autoanticuerpos, hipergammaglobulinemia, crioglobulinas y componente monoclonal, así como el riesgo aumentado de linfoma de células B, pone de manifiesto la importancia de los linfocitos B en la patogenia de la enfermedad(52). El hecho de que los infiltrados inflamatorios más evolucionados o graves que se observan en las glándulas salivales presenten un predominio de linfocitos B sugiere la existencia de una estimulación antigénica sostenida que conduce desde una activación policlonal inespecífica inicial hacia una expansión oligoclonal/monoclonal y finalmente a la transformación maligna de los linfocitos B(44). La acumulación de linfocitos B autorreactivos tanto *naïve* como de memoria en la sangre de los pacientes con SSp sugiere que hay una disfunción en los mecanismos de control de la tolerancia responsables de eliminar los clones autorreactivos, tanto a nivel periférico como a nivel pre-germinal(55). En las glándulas salivales de los pacientes con SSp se han descrito linfocitos B autorreactivos contra el factor reumatoide y contra Ro/SSA y La/SSB(44).

Los linfocitos B que se encuentran en los infiltrados de las glándulas exocrinas son mayoritariamente linfocitos B de memoria y presentan un fenotipo que recuerda a las células B transicionales tipo II y a las células B de la zona marginal; su

acumulación en los tejidos se acompaña de una reducción en sangre periférica(56,57). BAFF es la citoquina más importante en la maduración, proliferación y supervivencia de los linfocitos B; es producida por las células dendríticas, los monocitos y los macrófagos en condiciones fisiológicas, pero en los pacientes con SSp también por las células del epitelio glandular salival y los linfocitos T y B(52). Es reseñable que una proporción importante de las células B de los infiltrados glandulares son células plasmáticas diferenciadas secretoras de IgM e IgG(44,58); su supervivencia en el tejido glandular depende de la expresión de moléculas de adhesión, CXCL12, IL-6 y APRIL por las células del epitelio glandular salival(52).

Los centros germinales son estructuras especializadas que aparecen en los órganos linfoides secundarios, en las que las células B que responden frente a un antígeno sufren un proceso de hipermutación somática y los clones con mayor afinidad antigénica son seleccionados para que sufran un cambio de clase y se diferencien en células plasmáticas o linfocitos B de memoria(59). En el SSp, al igual que en otras patologías autoinmunes e inflamatorias, el infiltrado linfocitario glandular puede formar agregados y en el 25% de los pacientes se encuentran estructuras organizadas que remedan los centros germinales y que se denominan centros germinales ectópicos(60). La presencia de centros germinales ectópicos en la biopsia de glándula salival menor (BGS_m) en pacientes con SSp se ha asociado con mayores niveles de autoanticuerpos circulantes, presencia de manifestaciones sistémicas y riesgo de linfoma(61). La formación de los centros germinales ectópicos está mediada por los linfocitos T_{FH} y la IL-21 fundamentalmente, siendo un factor clave la expresión de CXCL13 por las células del epitelio glandular salival(52).

1.1.4. Manifestaciones clínicas

El SSp es una enfermedad heterogénea que además de producir sintomatología a nivel de las glándulas lagrimales y salivales, puede producir sintomatología general y afectar virtualmente a cualquier órgano.

1.1.4.1. Manifestaciones Glandulares

La afectación de las glándulas lagrimales provoca una disminución del flujo lagrimal y una alteración de la composición lagrimal, lo que acaba dañando la córnea y la conjuntiva, dando lugar a la queratoconjuntivitis seca(62). La xeroftalmia afecta a más del 95% de los pacientes y puede manifestarse como sensación de sequedad ocular, prurito, sensación de cuerpo extraño o fotosensibilidad; en la mitad de los casos estos síntomas pueden ser graves y comportan una disminución de la calidad de vida(22,63). En algunos pacientes la queratoconjuntivitis seca puede acabar produciendo pérdida de agudeza visual, úlceras y perforaciones corneales(64).

La afectación de las glándulas salivales provoca una disminución de la producción de saliva que da lugar a los síntomas de sequedad oral, presentes en el 95% de los pacientes(22,46). Además de la xerostomía, los pacientes pueden presentar caries y pérdidas dentales, disgeusia, aftas orales, glositis, periodontitis, queilitis angular, candidiasis orofaríngea, sialolitiasis, disfagia o dificultades con las intervenciones odontológicas(65). Una cuarta parte de los pacientes presentan hipertrofia parotídea y algunos pueden presentar episodios de sialoadenitis bacteriana (en el contexto de sialolitiasis) así como episodios de parotiditis inflamatoria(65,66).

Las glándulas exocrinas de otras superficies mucosas pueden verse también afectadas. Los pacientes con SSp pueden presentar sequedad nasal, laríngea y traqueal (xerotráquea), que puede producir disfonía y tos crónica, así como predisposición a las infecciones respiratorias(64,67). En las mujeres la sequedad vaginal es frecuente y puede producir prurito y dispareunia(68).

1.1.4.2. Manifestaciones Extraglandulares

Los síntomas generales inespecíficos son frecuentes en el SSp. La fatiga afecta hasta al 70% de los pacientes, asociada en muchas ocasiones a un mal descanso nocturno por los síntomas de sequedad o por diversos trastornos del sueño(69,70). El dolor crónico generalizado también es frecuente, en ocasiones con características similares a la fibromialgia, aunque la prevalencia es variable (entre 12-55%) según los estudios(71,72). Algunos pacientes pueden presentar febrícula de bajo grado, siendo poco frecuente la fiebre elevada(73).

Las manifestaciones extraglandulares que produce el SSp se han dividido clásicamente en base a su etiopatogenia en dos grupos: las derivadas de la infiltración linfoide del epitelio de un órgano y las mediadas por inmunocomplejos que se depositan en los pequeños vasos a nivel de piel, nervios o riñón(74). En la Tabla 1 se detallan las distintas manifestaciones extraglandulares del SSp y su prevalencia.

Tabla 1.1. Manifestaciones extraglandulares del Síndrome de Sjögren

	Prevalencia (%)	Referencias
<i>Manifestaciones generales</i>		
Fatiga	70	(69)
Dolor crónico difuso/fibromialgia	12-55	(71,72)
Febrícula	6-41	(73)
<i>Manifestaciones músculo-esqueléticas</i>		
Artralgias	48-61	(22,75)
Artritis	15-16	(22,76)
Miositis	1,3	(77)
<i>Manifestaciones cutáneas</i>		
Xerodermia	67	(78)
Vasculitis cutánea	10	(76)
Eritema anular	9	(76)
<i>Manifestaciones pulmonares</i>		
Bronquiolitis	24	(79)
Bronquiectasias	7-54	(79)
Neumopatía intersticial	20	(80)
<i>Neumonía intersticial no específica</i>	45 [#]	(79)
<i>Neumonía intersticial usual</i>	16 [#]	(79)
<i>Neumonía intersticial linfoidea</i>	16 [#]	(79)
<i>Neumonía organizada</i>	11 [#]	(79)
Pleuritis	1,6	(81)
Hipertensión arterial pulmonar	0,8	(81)
<i>Manifestaciones digestivas</i>		
Gastritis crónica	3	(81)
Cirrosis biliar primaria	2-4	(82,83)
Hepatitis autoinmune	1-2	(83,84)
<i>Manifestaciones reno-urológicas</i>		
Nefritis túbulo-intersticial	2,5-9	(76,85)

Glomerulonefritis	3-4	(76,85)
Cistitis intersticial	0,7	(81)
<i>Manifestaciones neurológicas</i>		
Neuropatía periférica	2-16	(86)
<i>Polineuropatía sensitiva pura</i>	1-9	(86,87)
<i>Polineuropatía sensitivo-motora</i>	2-6	(86,87)
<i>Neuropatía de fibra pequeña</i>	1	(81)
<i>Ganglionopatía sensitiva</i>	0,6-2	(87)
<i>Mononeuritis múltiple</i>	2,7	(88)
<i>Neuropatías craneales</i>	0,1-1,9	(87)
<i>Radiculoneuropatía desmielinizante</i>	0,2	(88)
Afectación del SNC	3,6-11	(87)
<i>Lesiones desmielinizantes</i>	0,6-1,1	(87)
<i>Neuritis óptica</i>	0,2-1,1	(87)
<i>Mielitis transversa</i>	0,8-2,8	(87)
<i>Vasculitis cerebral</i>	1,3-6,1	(87)
<i>Meningitis linfocitaria</i>	0,2-1	(87)
<i>Manifestaciones hematológicas</i>		
Adenopatías periféricas	8-13	(83,89)
Citopenias	28-31	(22,89)
<i>Anemia</i>	18-21	(22,89)
<i>Leucopenia</i>	14-16	(22,89)
<i>Linfopenia</i>	6,5-9	(22,89)
<i>Trombopenia</i>	4-13	(22,89)
Hipergammaglobulinemia	22-48	(75,89)
Gammapatía monoclonal	4-22	(89,90)
Crioglobulinas	8-10	(22,89)
C3 bajo	9-16	(83,89)
C4 bajo	4-18	(83,89)
<i>Manifestaciones cardiovasculares</i>		
Fenómeno de Raynaud	13-15	(81,91)
Pericarditis	0,7	(81)

SNC: sistema nervioso central

[†]Porcentaje de los distintos tipos de neumopatía intersticial asociada a síndrome de Sjögren

Las mujeres con SSp pueden presentar peores resultados obstétricos y complicaciones fetales características, como son el bloqueo aurículo-ventricular congénito y el lupus neonatal, ambos relacionados con la presencia de anticuerpos anti-Ro/SSA, si bien la incidencia de estas complicaciones no está bien establecida(92–94).

1.1.5. Diagnóstico y Valoración

El diagnóstico de SSp se establece en pacientes que presentan síntomas de sequedad oral y/o ocular, con evidencia objetiva de dicha sequedad e indicios de una base autoinmune para explicar esta disfunción glandular exocrina. Dado que no existe una prueba diagnóstica de SSp, el diagnóstico se establece en base a la presencia de criterios clínicos, de laboratorio e histológicos tras la exclusión de otras causas de sequedad ocular y/o oral.

1.1.5.1. Valoración objetiva de los síntomas secos

La disfunción de las glándulas salivales puede evaluarse mediante diversas exploraciones:

- *Sialometría*: consiste en cuantificar la producción de saliva durante 15 minutos, en situación basal o tras estimulación mecánica (masticar un chicle durante dos minutos) o química con secretagogos (pilocarpina o cítricos), aunque esta última es mucho menos utilizada. Se considera patológico un flujo salival no estimulado $< 0,1$ ml/min y con este umbral presenta una sensibilidad del 56% y una especificidad del 81%(95).
- *Gammagrafía salival con ^{99m}Tc* : es una prueba no invasiva, sencilla de realizar y reproducible que mide la captación, acumulación y excreción de pertecnetato (tecnecio 99 metaestable) en las parótidas y las glándulas submandibulares. Se interpreta cualitativamente con la clasificación de Shall (de grado I -normal- a grado IV -ausencia total de captación oral-) y un grado superior a II presenta una sensibilidad del 54-87% y una especificidad del 78-98%(96,97).
- *Ecografía de glándulas salivales*: la ecografía permite identificar alteraciones en la estructura de las glándulas salivales características del SSp (falta de homogeneidad glandular, áreas hipoeoicas/anecoicas, bandas hiperecoicas), y se han propuesto distintas clasificaciones que podrían ser útiles en el diagnóstico del SSp(98).

La disfunción de las glándulas lagrimales requiere una exploración oftalmológica que debe incluir:

- *Test de Schirmer*: consiste en colocar una tira de papel de filtro en el fórnix ocular y tras 5 minutos con los párpados cerrados, medir la humedad de la tira. La prueba se considera patológica si hay ≤ 5 mm de humedad y es la prueba más utilizada para detectar el ojo seco(99).
- *Tiempo de ruptura lagrimal (BUT)*: se evalúa la calidad de la lágrima midiendo el tiempo que tarda en romperse la película ocular que se forma tras colocar en la superficie del ojo una gota de fluoresceína. Un BUT inferior a 10 segundos se considera patológico(99).
- *Tinciones de la superficie ocular*: las tinciones con fluoresceína o con verde de lisamina se utilizan para evaluar el daño de la conjuntiva y la córnea. Los hallazgos se califican en función de diversos sistemas de puntuación estandarizados, siendo los más utilizadas la escala de van Bijsterveld y el Ocular Staining Score (OSS); puntuaciones ≥ 4 y ≥ 5 , respectivamente, son patológicas y sugestivas de SSp, siendo más específicas que el test de Schirmer o el BUT(100).

1.1.5.2. Laboratorio

Los ANA son positivos en alrededor del 80% de los pacientes con SSp, habitualmente con un patrón de inmunofluorescencia indirecta nuclear moteado fino(101,102). Este patrón se debe a la presencia de anticuerpos anti-Ro/SSA y/o anti-La/SSB, que son característicos del SSp; según el método de detección, los anticuerpos anti-Ro/SSA pueden ser positivos en el 50-70% de los pacientes y los anti-La/SSB en el 25-50%(75,103). Aunque pueden estar presentes en otras enfermedades autoinmunes (especialmente en LES, ES, AR, miopatía inflamatoria y enfermedad mixta del tejido conectivo), son relativamente específicos de SSp. Su presencia en un paciente con síntomas de sequedad apoya fuertemente el diagnóstico de SSp y pueden ser positivos hasta 20 años antes del diagnóstico(102,104). La partícula Ro/La es un complejo antigénico heterogéneo compuesto por tres proteínas (52kDa Ro, 60kDa Ro y La) y por cuatro cadenas de RNA citoplasmático pequeño. Así, es posible diferenciar dos anticuerpos anti-Ro/SSA: el anti-Ro60 y el anti-

Ro52(105). Los pacientes con SSp suelen ser Ro52+Ro60+, mientras que la combinación anti-Ro52 negativo y anti-Ro60 positivo es más frecuente en el LES y el anti-Ro52 positivo aislado se asocia a una variedad de enfermedades reumatológicas, especialmente miopatía inflamatoria y ES(94). Un 10% de los pacientes con anti-Ro/SSA positivo por técnicas de inmunoensayo pueden presentar ANA negativos por inmunofluorescencia debido a que la detección de ANA se realiza habitualmente sobre el sustrato HEp-2, cuya expresión del antígeno Ro/SSA es baja en el núcleo y puede incluso mostrar un patrón citoplasmático, especialmente en el caso del anti-Ro52(106).

Otros datos de laboratorio pueden sugerir también un trasfondo de autoinmunidad en pacientes con síndrome seco. El 50% de los pacientes con SSp presenta factor reumatoide positivo y hasta el 15% pueden presentar crioglobulinas o niveles bajos de C3 y C4(75,102). Otros parámetros sugestivos de activación de linfocitos B que aparecen en el SSp son la elevación de la VSG, el aumento de β -2-microglobulina (β 2MG), la hipergammaglobulinemia policlonal y el aumento de cadenas ligeras libres(107). Además, la existencia de citopenias también apoya la sospecha de SSp en un paciente con síntomas de sequedad, ya que un tercio de los pacientes presentan alguna citopenia al diagnóstico, especialmente anemia inflamatoria y/o linfopenia(89).

1.1.5.3. Biopsia de glándula salival menor

La BGS_m es una herramienta útil en pacientes con síndrome seco que no presentan evidencias claras de enfermedad autoinmune. Los pacientes con SSp presentan una infiltración linfocitaria de las glándulas salivales y el hallazgo histopatológico característico es una sialoadenitis linfocitaria focal, en la que se observan acúmulos de ≥ 50 linfocitos en las áreas periductales o perivasculares de los acinos glandulares(108). El número de estos acúmulos se cuantifica mediante el Focus-score, que corresponde al número promedio de focos linfocitarios por cada 4 mm² de glándula salival. Un Focus-score ≥ 1 tiene una sensibilidad entre 64-94% y una especificidad del 61-100% para el diagnóstico de SSp, con valores predictivos tanto positivo como negativo superiores al 80%(109).

1.1.5.4. Diagnóstico diferencial

El diagnóstico diferencial a considerar en pacientes con síntomas de sequedad ocular y/o oral y/o con infiltración de glándulas salivales incluye(110):

- Fármacos: son la causa más frecuente de sequedad de mucosas. Los fármacos más habitualmente implicados son: anticolinérgicos, simpaticomiméticos, benzodiacepinas, inhibidores de la recaptación de serotonina, antidepresivos tricíclicos, antipsicóticos, antihistamínicos, opioides, antagonistas alfa-1 y alfa-2, betabloqueantes y diuréticos(111). Los inhibidores de la aromataasa pueden producir también sequedad, artralgias y sintomatología sistémica que remeda el SSp.
- Síndrome seco relacionado con la edad: la secreción lagrimal y la producción salival disminuyen con la edad como consecuencia de la atrofia y la fibrosis glandular asociadas al envejecimiento normal(112,113).
- Enfermedad relacionada con IgG4 (IgG4-RD): la IgG4-RD puede producir infiltración linfoplasmocitaria de las glándulas lagrimales y/o salivales produciendo hipertrofia e induración glandular (históricamente conocido como síndrome de Mikulicz), que puede acompañarse de disfunción glandular y síntomas de sequedad(114–116). Las manifestaciones sistémicas, los niveles séricos de IgG4 y la histología permiten diferenciar entre SSp y IgG4-RD(116).
- Linfoma primario: el linfoma parotídeo, de otras glándulas salivales o de glándulas lagrimales suele presentarse como un engrosamiento glandular unilateral.
- Leucemia
- Enfermedad de injerto contra huésped
- Sarcoidosis
- Amiloidosis
- Irradiación de cabeza y cuello
- Sialoadenitis virales (VHC, VIH o HTLV-1)
- Granulomatosis con poliangeítis (granulomatosis de Wegener)
- Sialoadenitis crónicas idiopáticas
- Hiperlipoproteinemias

- Hemocromatosis
- Síndrome seco inducido por *checkpoint inhibitors*
- Diabetes mellitus
- Fibromialgia

1.1.5.5. *Síndrome seco no-Sjögren*

Existen pacientes que presentan un síndrome seco con sequedad ocular y/o oral persistente, y que pueden referir también fatiga crónica y/o dolor generalizado, pero que no presentan evidencia de autoinmunidad en las pruebas de laboratorio, tienen una BGSM negativa, y en los que se han descartado otros diagnósticos. Estos pacientes se han clasificado bajo diversas denominaciones, como “síndrome seco incompleto”, “síndrome seco no-Sjögren (*non-Sjögren sicca syndrome*)” e incluso se ha propuesto el acrónimo SAPS (*sicca, asthenia and polyalgia syndrome*)(117,118). Estos pacientes no van a presentar las complicaciones de los pacientes con SSp pero conllevan una carga de trabajo importante en las consultas ya que esta entidad genera una importante pérdida de calidad de vida que motiva la búsqueda de atención médica(119).

1.1.5.6. *Criterios clasificatorios*

Al igual que ocurre en otras enfermedades autoinmunes sistémicas, en ausencia de una prueba diagnóstica definitiva de SSp, se han propuesto diversos criterios clasificatorios con el fin de homogeneizar la inclusión de pacientes en los estudios clínicos. Estos criterios son, por definición, muy específicos pero con sensibilidad más limitada, especialmente en los pacientes con formas de presentación extraglandulares(120). Los primeros criterios internacionalmente aceptados fueron los criterios preliminares europeos de 1993(121), pero no fue hasta 2002 cuando se logró un consenso internacional y se publicaron los criterios del grupo de consenso americano-europeo (AECG), reflejados en la Tabla 2, y que han sido los más utilizados en las últimas dos décadas(122). Estos criterios presentan una sensibilidad del 89,5% y una especificidad del 95,2%(122).

Tabla 1.2. Criterios Clasificatorios de SS AECG 2002

<p>I. Síntomas oculares: respuesta positiva al menos a una de las siguientes preguntas:</p>
<ol style="list-style-type: none"> 1. ¿Ha tenido ojo seco de forma diaria, persistente y molesta durante más de 3 meses? 2. ¿Tiene sensación de arenilla recurrente en los ojos? 3. ¿Usa lágrimas artificiales más de 3 veces al día?
<p>II. Síntomas orales: respuesta positiva al menos a una de las siguientes preguntas:</p>
<ol style="list-style-type: none"> 1. ¿Ha tenido sensación diaria de boca seca durante más de 3 meses? 2. ¿Ha tenido las glándulas salivales hinchadas de forma recurrente o persistente en la edad adulta? 3. ¿Se ayuda con frecuencia bebiendo líquidos para tragar la comida seca?
<p>III. Signos oculares: evidencia objetiva de afectación ocular definida como un resultado positivo en al menos una de las siguientes dos pruebas:</p>
<ol style="list-style-type: none"> 1. Test de Schirmer, realizado sin anestesia (≤ 5 mm en 5 minutos) 2. Puntuación de Rosa de Bengala u otra puntuación de ojo seco (≥ 4 en el sistema de puntuación de van Bijsterveld)
<p>IV. Histopatología: sialoadenitis linfocítica focal en glándula salival menor (obtenida de mucosa de aspecto normal), evaluada por un patólogo experto, con un Focus-score ≥ 1, definido como el número de acúmulos linfocitarios (adyacentes a acinos mucosos de aspecto normal y conteniendo más de 50 linfocitos) por 4 mm^2 de tejido glandular.</p>
<p>V. Afectación de glándulas salivales: evidencia objetiva de afectación de glándulas salivales definitiva como un resultado positivo en al menos una de las siguientes pruebas diagnósticas:</p>
<ol style="list-style-type: none"> 1. Flujo salival no estimulado ($\leq 1,5$ ml en 15 min) 2. Sialografía parotídea mostrando la presencia de sialectasias difusas (patrón punteado, cavitario o destructivo), sin evidencia de obstrucción en los ductos mayores 3. Gammagrafía salival mostrando captación tardía, acumulación disminuida y/o excreción retardada del trazador

VI. Autoanticuerpos: presencia en suero de los siguientes autoanticuerpos:
1. Anticuerpos contra los antígenos Ro/SSA o La/SSB o ambos
Criterios de clasificación
<i>SS primario</i> En pacientes con ninguna enfermedad potencialmente asociada, el SS primario se define como sigue: <ul style="list-style-type: none"> a. La presencia de cualesquiera 4 de los 6 criterios, siempre que o bien el criterio IV (histopatología) o el VI (serología) sean positivos b. La presencia de cualesquiera 3 de los 4 criterios objetivos (esto es, los criterios III, IV, V, VI)
<i>SS secundario</i> En pacientes con una enfermedad potencialmente asociada (por ejemplo, otra conectivopatía bien definida), la presencia de los criterios I o II junto con 2 de los criterios III, IV y V se considera indicativa de SS secundario
<i>Criterios de exclusión</i> <ul style="list-style-type: none"> Irradiación de cabeza y cuello previa Hepatitis C SIDA Linfoma pre-existente Sarcoidosis Enfermedad de injerto contra huésped Uso de anticolinérgicos

En los últimos años, se ha criticado que los criterios AECG son muy estrictos y que incluyen pruebas invasivas como la sialografía, pruebas no disponibles en todos los ámbitos como la gammagrafía salival, o pruebas obsoletas como la tinción de Rosa de Bengala, muy molesta para el paciente y en desuso. Por ello, en 2016 se propusieron unos criterios desarrollados conjuntamente por el Colegio Americano de Reumatología (ACR) y la Liga Europea Contra el Reumatismo (EULAR), que se basan en una puntuación de 5 ítems (Tabla 3), con una sensibilidad del 96% y una especificidad del 95%(123).

Tabla 1.3. Criterios Clasificatorios de SS ACR/EULAR 2016

Ítem	Puntuación
Biopsia de glándula salival con sialoadenitis linfocítica focal y Focus-score ≥ 1 foco/4 mm ²	3
Anti-Ro/SSA positivo	3
<i>Ocular Staining Score</i> ≥ 5 (o puntuación van Bijsterveld ≥ 4) en al menos un ojo	1
Test de Schirmer ≤ 5 mm/5 minutos en al menos un ojo	1
Flujo salival no estimulado $\leq 0,1$ ml/min	1
Clasificación: se clasifica como SS primario cualquier individuo que cumple el criterio de inclusión, no cumple ninguno de los criterios de exclusión y presenta una puntuación ≥ 4 al sumar los puntajes de los 5 criterios	
Criterio de inclusión: cualquier paciente con al menos un síntoma de sequedad, definido como una respuesta positiva a al menos una de las siguientes preguntas: 1) ¿Ha tenido ojo seco de forma diaria, persistente y molesta durante más de 3 meses? 2) ¿Tiene sensación de arenilla recurrente en los ojos? 3) ¿Usa lágrimas artificiales más de 3 veces al día? 4) ¿Ha tenido sensación diaria de boca seca durante más de 3 meses? 5) ¿Se ayuda con frecuencia bebiendo líquidos para tragar la comida seca?, o en el que hay una sospecha de SS en base a algún ítem positivo en la escala ESSDAI	
Criterios de exclusión: 1) irradiación previa de cabeza y cuello, 2) hepatitis C activa, 3) SIDA, 4) sarcoidosis, 5) amiloidosis, 6) enfermedad de injerto contra huésped, 7) enfermedad relacionada con IgG4	

Hay que tener presente que puede haber pacientes que no cumplan los criterios AECG 2002 ni los ACR/EULAR 2016 por tener una BGSm negativa y unos anticuerpos anti-Ro/SSA y anti-La/SSB negativos, pero que presenten un síndrome seco y fuertes evidencias de autoinmunidad como por ejemplo ANA positivos, FR positivo, hipergammaglobulinemia, citopenias o manifestaciones extraglandulares típicas de SSp. La detección de estos pacientes es importante porque el diagnóstico de SSp tiene implicaciones en el pronóstico y en el tratamiento(124).

1.1.5.7. Evaluación de la actividad

Actualmente, el ESSDAI (*EULAR Sjögren Syndrome Disease Activity Index*) es la herramienta más utilizada en estudios clínicos para cuantificar de forma objetiva la actividad inflamatoria sistémica del SSp(125,126). En el ESSDAI las manifestaciones clínicas o biológicas se dividen en 12 dominios y dentro de cada dominio la actividad se clasifica como “sin actividad” (0 puntos), “actividad leve” (1 punto), “actividad moderada” (2 puntos) o “alta actividad” (3 puntos) de acuerdo con unas definiciones especificadas (Tabla 4). Para calcular la puntuación ESSDAI el puntaje de cada dominio se multiplica por el peso del dominio (de 1 a 6) y se suman las puntuaciones ponderadas de cada dominio. La suma máxima teórica es de 123 puntos y según la puntuación total se establecen 3 categorías: baja actividad (<5 puntos), actividad moderada (5-13 puntos) y alta actividad (≥ 14 puntos). La mejoría mínima clínicamente relevante se define como una mejoría de al menos 3 puntos.

Tabla 1.4. ESSDAI: dominios y definiciones

Dominio [peso]	Actividad	Descripción
Constitucional [3] <i>Exclusión de fiebre de origen infeccioso y pérdida de peso voluntaria</i>	No = 0	Ausencia de los siguientes síntomas
	Baja = 1	Fiebre leve o intermitente (37,5-38,5°C), sudoración nocturna leve o intermitente y/o pérdida de peso involuntaria del 5-10% del peso corporal
	Moderada = 2	Fiebre > 38,5°, sudoración nocturna grave y/o pérdida involuntaria de peso >10% del peso corporal
Adenopatías [4] <i>Exclusión de infección</i>	No = 0	Ausencia de los siguientes síntomas
	Baja = 1	Adenopatías ≥ 1 cm en cualquier región nodal o ≥ 2 cm en la región inguinal
	Moderada = 2	Adenopatías ≥ 2 cm en cualquier región nodal o ≥ 3 cm en la región inguinal y/o esplenomegalia (palpable o por imagen)
	Alta = 3	Trastorno proliferativo maligno de células B actual
Glandular [2] <i>Exclusión de litiasis o infección</i>	No = 0	Ausencia de tumefacción glandular
	Baja = 1	Tumefacción glandular pequeña con parótida engrosada (≤ 3 cm) o tumefacción limitada submandibular o lagrimal
	Moderada = 2	Tumefacción glandular mayor con

		engrosamiento parotídeo (>3 cm) o tumefacción importante submandibular o lagrimal
Articular [2] <i>Exclusión de artrosis</i>	No = 0	Ausencia de afectación articular activa
	Baja = 1	Artralgias en manos, muñecas, tobillos y pies acompañadas de rigidez matutina (>30 min)
	Moderada = 2	Sinovitis en 1-5 (de 28) articulaciones
	Alta = 3	Sinovitis en ≥ 6 (de 28) articulaciones
Cutáneo [3] <i>Puntuar cero la afectación estable de larga duración relacionada con daño</i>	No = 0	Ausencia de afectación cutánea activa
	Baja = 1	Eritema multiforme
	Moderada = 2	Vasculitis cutánea limitada, incluyendo urticaria-vasculitis o púrpura difusa o úlceras relacionadas con vasculitis
Pulmonar [5] <i>Puntuar cero la afectación estable de larga duración relacionada con daño, o la afectación respiratoria no relacionada con la enfermedad (tabaquismo, etc)</i>	No = 0	Ausencia de afectación cutánea activa
	Baja = 1	Tos persistente o afectación bronquial sin anomalías radiológicas en la radiografía, <i>O</i> evidencia radiológica o por TCAR de enfermedad intersticial pulmonar sin disnea y con pruebas de función respiratoria normales
	Moderada = 2	Afectación pulmonar moderadamente activa, como enfermedad intersticial pulmonar demostrada por TCAR con disnea de esfuerzo (NYHA II) o pruebas de función respiratoria anormales restringidas a: DLCO 40-70% o CVF 60-80%
	Alta = 3	Afectación pulmonar de alta actividad, como enfermedad pulmonar intersticial demostrada por TCAR con disnea en reposo (NYHA III, IV) o con pruebas de función respiratoria con DLCO <40% o CVF <60%
Renal [5] <i>Puntuar cero la afectación estable de larga duración relacionada con daño y la afectación renal no relacionada con la enfermedad. Si se ha realizado biopsia, puntuar la actividad en</i>	No = 0	Ausencia de afectación renal activa con proteinuria <0,5 g/día, no hematuria, no leucocituria, no acidosis, o proteinuria de larga duración estable debida a daño
	Baja = 1	Evidencia de afectación renal leve, limitada a acidosis tubular sin fallo renal o afectación glomerular con proteinuria entre 0,5-1 g/día y sin hematuria ni fallo renal (TFG ≥ 60 ml/min)
	Moderada = 2	Afectación renal moderadamente activa,

<i>función de los hallazgos histológicos primero</i>		como acidosis tubular con fallo renal (TFG <60 ml/min) o afectación glomerular con proteinuria entre 1-1.5 g/día y sin hematuria ni fallo renal (TFG ≥60 ml/min), o evidencia histológica de glomerulonefritis extramembranosa o infiltrado intersticial linfoide importante
	Alta = 3	Afectación renal de alta actividad, como afectación glomerular con proteinuria >1,5 g/día o hematuria o fallo renal (TFG <60 ml/min), o evidencia histológica de glomerulonefritis proliferativa o afectación renal relacionada con crioglobulinemia
Muscular [6] <i>Exclusión de debilidad por corticoides</i>	No = 0	Ausencia de afectación muscular activa
	Baja = 1	Miositis activa leve demostrada por EMG anormal o biopsia, sin debilidad y con CK ≤ 2 veces el valor normal
	Moderada = 2	Miositis moderadamente activa confirmada por EMG anormal o biopsia, con debilidad (déficit máximo 4/5) o CK elevada (entre 2 y 4 veces el valor normal)
	Alta = 3	Miositis de alta actividad demostrada por EMG anormal o biopsia, con debilidad (déficit ≤ 3/5) o CK elevada (>4 veces el valor normal)
SNP [5] <i>Puntuar cero la afectación estable de larga duración relacionada con daño y la afectación SNP no relacionada con la enfermedad.</i>	No = 0	Ausencia de afectación SNP activa
	Baja = 1	Afectación de SNP activa leve, como polineuropatía axonal sensitiva pura demostrada por ENG o neuralgia del trigémino (V par)
	Moderada = 2	Afectación de SNP moderadamente activa demostrada por ENG, como neuropatía axonal sensitivo-motora con déficit motor máximo 4/5, neuropatía sensitiva pura con presencia de vasculitis crioglobulinémica, Ganglionopatía con síntomas limitados a ataxia leve-moderada, polineuropatía desmielinizante inflamatoria (CDIP) con deterioro funcional leve (déficit motor máximo 4/5 o ataxia leve) O afectación de nervios craneales de origen periférico (excepto neuralgia del trigémino)
	Alta = 3	Afectación del SNP de alta actividad demostrada por ENG, como neuropatía

		axonal sensitivo-motora con déficit motor $\leq 3/5$, afectación de nervios periféricos debida a vasculitis (mononeuritis múltiple, etc.), ataxia grave debida a ganglionopatía, polineuropatía desmielinizante inflamatoria (CIDP) con deterioro funcional grave: déficit motor $\leq 3/5$ o ataxia grave
SNC [5] <i>Puntuar cero la afectación estable de larga duración relacionada con daño y la afectación SNC no relacionada con la enfermedad.</i>	No = 0	Ausencia de afectación del SNC activa
	Baja = 1	Afectación del SNC moderadamente activa, como afectación de nervios craneales de origen central, neuritis óptica, o síndrome similar a esclerosis múltiple con síntomas limitados a deterioro sensitivo puro, o deterioro cognitivo confirmado
	Alta = 3	Afectación del SNC de alta actividad, como vasculitis cerebral con accidente cerebrovascular o ataque isquémico transitorio, convulsiones, mielitis transversa, meningitis linfocitaria, síndrome parecido a esclerosis múltiple con déficit motor
Hematológico [2] <i>Para anemia, neutropenia y trombopenia solo deben considerarse las citopenias autoinmunes</i> <i>Exclusión de déficits vitamínicos o de hierro y citopenias inducidas por fármacos</i>	No = 0	Ausencia de citopenias autoinmunes
	Baja = 1	Citopenia de origen autoinmune con neutropenia (1000-1500/mm ³) y/o anemia (Hb 10-12 g/dL) y/o trombocitopenia (100000-150000/mm ³) O linfopenia (500-1000/mm ³)
	Moderada = 2	Citopenia de origen autoinmune con neutropenia (500-1000/mm ³) y/o anemia (Hb 8-10 g/dL) y/o trombocitopenia (50000-100000/mm ³) O linfopenia (≤ 500 /mm ³)
	Alta = 3	Citopenia de origen autoinmune con neutropenia (<500 /mm ³) y/o anemia (Hb <8 g/dL) y/o trombocitopenia (<50000 /mm ³)
Biológico [1]	No = 0	Ausencia de cualquiera de los siguientes hallazgos biológicos
	Baja = 1	Componente monoclonal y/o hipocomplementemia (C4, C3 o CH50 bajos) y/o hipergammaglobulinemia o niveles de IgG altos entre 16 y 20 g/L.
	Moderada = 2	Presencia de crioglobulinemia y/o

		hipergammaglobulinemia o niveles de IgG altos >20 g/L, y/o hipogammaglobulinemia de reciente aparición o disminución reciente de los niveles de IgG (<5 g/L).
--	--	---

CIDP: polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica; CK: creatina quinasa; CVF: capacidad vital forzada; DLCO: capacidad de difusión de monóxido de carbono; EMG: electromiograma; ENG: electroneurograma; Hb: hemoglobina; IgG: inmunoglobulina G; SNC: sistema nervioso central; SNP: sistema nervioso periférico; TCAR: tomografía computerizada de alta resolución; TFG: tasa de filtrado glomerular

Se ha propuesto también utilizar una versión reducida del ESSDAI denominada ClinESSDAI que no incluye el dominio biológico, aunque no ha tenido tanta implantación como el ESSDAI(127).

Para la cuantificación de la sintomatología subjetiva de los pacientes con SSp se ha validado una herramienta denominada ESSPRI (*EULAR Sjögren Syndrome Patient Reported Index*), que se calcula como la media de 3 escalas visuales analógicas (de 0 a 10) que permiten al paciente autoevaluar la sequedad, el dolor y la fatiga(128). El ESSPRI se correlaciona bien con la escala PGA pero no con el ESSDAI(129).

1.1.6. Pronóstico

Clásicamente el SSp ha sido considerado como una enfermedad de carácter más leve que otras conectivopatías por la supuesta “benignidad” de sus síntomas. Sin embargo, los síntomas secos tienen un impacto negativo en el gusto, el olfato, la voz, la deglución y la función sexual, especialmente en mujeres(130). La sequedad oral puede suponer un gasto elevado en procedimientos odontológicos y afectar de forma importante a la calidad de vida(131). Además, los pacientes con SSp sufren un deterioro funcional y una disminución de su calidad de vida similar a la que se produce en la AR o el LES, que se deriva no solo de los síntomas de sequedad oral y/o ocular, sino también de la fatiga, el dolor generalizado, la ansiedad, la depresión, la somnolencia diurna y la actividad sistémica de la enfermedad(132–135). Los costes de productividad laboral que genera el SSp son cercanos a los que pueden producir el LES o la ES, siendo incluso una causa de jubilación precoz(136,137).

1.1.6.1. Actividad sistémica

Aproximadamente la mitad de los pacientes con SSp pueden presentar alguna manifestación extraglandular(75,138). Habitualmente se trata de manifestaciones leves o moderadas tales como artralgiar/artritis, fenómeno de Raynaud, citopenias o afectación pulmonar en forma de bronquiectasias(75). No obstante, el 15-25% de los pacientes puede presentar manifestaciones extraglandulares graves que requieren tratamiento inmunosupresor(75). Las más frecuentes son la afectación pulmonar intersticial, la neuropatía axonal, la hepatopatía autoinmune, las citopenias graves y la vasculitis cutánea. La afectación pulmonar intersticial en particular, a la que históricamente no se le había dado mucha importancia, tiene una prevalencia del 20% en pacientes con SSp y presenta una mortalidad entre el 11% y el 17% a los 5 años(139). Las manifestaciones extraglandulares pueden presentarse tanto al diagnóstico del SSp como durante la evolución de la enfermedad e incluso como forma de presentación del SSp en pacientes que no presentan síntomas secos(124).

Los factores de riesgo más importantes para presentar actividad sistémica en el SSp son el inicio precoz de la enfermedad, los anticuerpos anti-Ro/SSA positivos, la hipocomplementemia, la crioglobulinemia, el sexo masculino y un Focus-score elevado(101,130).

1.1.6.2. Linfoma y Cáncer

Los pacientes con SSp presentan un riesgo de desarrollar linfoma superior al de la población general y superior al de otras enfermedades autoinmunes como la AR o el LES(140). La tasa de incidencia estandarizada (SIR) de linfoma en pacientes con SSp se ha estimado entre 10,5 y 48,1 en estudios clínicos, y entre 1,9 y 9 en estudios poblacionales(140). El riesgo acumulado oscila entre el 3,4% en los primeros 5 años y el 9,8% a los 15 años(141). En ocasiones el linfoma puede ser la manifestación inicial que precede al diagnóstico del SSp(142). Aunque clásicamente se ha relacionado el SSp con el desarrollo de linfomas no Hodgkin (LNH), los pacientes con SSp también presentan mayor riesgo de desarrollar linfoma Hodgkin (LH), con SIR entre 5 y 19,4(143,144).

Más del 90% de los linfomas que aparecen en pacientes con SSp son linfomas de células B, siendo los tres subtipos más frecuentes el linfoma del tejido linfoide asociado a las mucosas (MALT), el linfoma difuso de células B grandes (LDCBG) y el linfoma de la zona marginal (LZM)(142,145,146). El linfoma MALT es el más frecuente en la mayoría de las series y se localiza habitualmente en las glándulas salivales, especialmente a nivel parotídeo; clínicamente se suele presentar como un crecimiento indolente de una glándula parotídea (que debe ser diferenciado de la hipertrofia parotídea), y aunque suele ser localizado hasta el 20% pueden presentar afectación en más de una localización extranodal(142,147). Otras localizaciones del linfoma MALT son los bronquios y pulmones, el estómago y la órbita(142,147).

Los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de linfoma se resumen en la Tabla 5.

Tabla 1.5. Principales factores de riesgo de desarrollo de linfoma

	OR/HR	Referencias
Sexo masculino	1,6-28,7	(144,148–152)
Hipertrofia parotídea	2,8-15,1	(141,149,153–160)
Esplenomegalia	4-19,9	(89,149)
Adenopatías	2,6-9,7	(89,153,154,159)
Vasculitis cutánea / púrpura	3,3-16,3	(141,154,157,159,161–163)
ESSDAI	1,1	(144,158)
Leucopenia	3,8-8,7	(141,149,164)
Linfopenia	2,1-16,5	(141,146,158)
Cociente CD4/CD8 \leq 0,8	10,9	(107,161,165)
C4 bajo	1,8-39,7	(89,107,163,164,166,141,149,154,156–159,161)
C3 bajo	1,7-36,7	(141,154,161,164)
Crioglobulinas	1,9-22,3	(89,146,149,158,159,163,164,167)
Hipergammaglobulinemia	2,5-4,1	(141,161,164)
Gammapatía monoclonal	1,3-5,7	(144,159,164,168)
Factor reumatoide	3-3,5	(158,159,164)
Centros germinales		(61)

Además del linfoma, otras neoplasias hematológicas, especialmente el mieloma múltiple, también parecen ser más frecuentes en los pacientes con SSp(144,169,170).

1.1.6.3. Mortalidad

La tasa de mortalidad estandarizada (SMR) de los pacientes con SSp se ha estimado en 4,66 (IC 95%: 3,85-5,60) en un estudio español(171); este aumento de mortalidad ha sido confirmado en un reciente metaanálisis(172). Las principales causas de muerte en el SSp son la enfermedad cardiovascular, las infecciones, la afectación sistémica de la enfermedad y las neoplasias hematológicas(171,172).

Los factores asociados a una mayor mortalidad en el SSp son el sexo masculino, la linfopenia, la presencia de anticuerpos anti-La, gammapatía monoclonal, crioglobulinas circulantes o hipocomplementemia, y un ESSDAI elevado. Los factores asociados a la muerte derivada de la actividad del SSp son la afectación extraglandular, la presencia de anemia, trombopenia o linfopenia, la existencia de gammapatía monoclonal, crioglobulinas circulantes o hipocomplementemia, así como un ESSDAI elevado(138).

1.1.7. Tratamiento

El tratamiento del SSp es esencialmente sintomático en lo que respecta a los síntomas de sequedad, ya que ningún tratamiento inmunosupresor o inmunomodulador ha demostrado un beneficio claro para mejorar el síndrome seco(173).

El tratamiento de la sequedad ocular se basa en el uso de lágrimas artificiales que contengan una base polimérica o un agente viscoso (metilcelulosa, hialuronato) y geles oculares durante la noche. En los pacientes con queratoconjuntivitis seca grave se pueden utilizar cursos cortos de AINE, corticoides o ciclosporina tópicos. En los casos más graves, se plantea el uso de gotas oculares de suero autólogo. Finalmente, como tratamientos de rescate se puede utilizar la oclusión lagrimal y los agonistas muscarínicos orales, aunque con escasa evidencia(173–177).

La sequedad oral se maneja fundamentalmente con medidas higiénicas (ingesta hídrica frecuente, no fumar, higiene oral exquisita, evitar fármacos que favorecen la sequedad como los anticolinérgicos), con estimulación salival mediante caramelos bajos en azúcar o chicles de xilitol, y con sustitutos de saliva. En los casos más

sintomáticos se pueden utilizar la pilocarpina o la cevimelina como estimulantes farmacológicos de la salivación(173).

El dolor y la fatiga carecen de tratamiento farmacológico, ya que ni la hidroxiclороquina ni el rituximab han demostrado un claro beneficio sobre estos síntomas inespecíficos(173,178,179).

Las manifestaciones extraglandulares específicas, en cambio, se tratan con glucocorticoides, inmunosupresores y terapias biológicas dirigidas contra los linfocitos B, si bien la evidencia es escasa en la mayor parte de los casos y derivada de la práctica clínica habitual en otras enfermedades autoinmunes como el LES, la AR o las vasculitis. Como norma general la intensidad y la duración del tratamiento se ajusta a la gravedad de la afectación orgánica, manejándose las manifestaciones extraglandulares leves con corticoides a dosis medias-bajas y/o hidroxiclороquina y las afectaciones más graves con corticoides a dosis altas o pulsos de corticoides e inmunosupresores. Los inmunosupresores más utilizados como ahorradores de corticoides son el metotrexato, la azatioprina y el micofenolato. Las afectaciones con riesgo vital (fibrosis pulmonar, afectación del SNC, glomerulonefritis) pueden requerir pulsos de corticoides e incluso ciclofosfamida intravenosa o inmunoglobulinas intravenosas. El rituximab constituye el tratamiento de elección en el caso de las manifestaciones derivadas de la crioglobulinemia y se ha utilizado también en otras afectaciones orgánicas como tratamiento de rescate. Otros fármacos biológicos dirigidos contra los linfocitos B se han ensayado en estudios pequeños con resultados favorables, especialmente el belimumab, pero todavía no se dispone de ensayos clínicos(173,178,180,181).

1.2. Utilidad de las poblaciones linfocitarias circulantes en el diagnóstico del SSp

La citometría de flujo es una herramienta muy útil para el análisis del fenotipo y la función de las distintas células del sistema inmune, ya que permite determinar múltiples parámetros en un número elevado de células individuales. Mediante esta técnica es posible caracterizar y diferenciar múltiples subpoblaciones linfocitarias tanto en tejido como en sangre periférica(182). El análisis de las células inmunes circulantes ha contribuido al entendimiento de la patogenia de distintas enfermedades autoinmunes al proporcionar una aproximación al estado de la circulación de las células inmunitarias entre los órganos linfoides y no linfoides y los sitios de inflamación. En los últimos años se ha explorado la utilidad práctica de la citometría de flujo en el diagnóstico y pronóstico de algunas enfermedades autoinmunes sistémicas (183,184).

En el SSp se ha descrito una disminución del número de linfocitos circulantes, principalmente a expensas de los linfocitos T CD4⁺. Esta disminución contrasta con la infiltración de las glándulas salivales por linfocitos T CD4⁺, lo que apoya la idea de que la linfopenia periférica es debida a la migración de los linfocitos hacia los tejidos inflamados(58,185–187). Por el contrario, en el SSp se encuentran incrementadas las subpoblaciones circulantes de células de IL-17, como los T_H17 y las células T doble negativas (CD4⁻CD8⁻), así como los linfocitos T_{FH}; estas alteraciones se asocian con la actividad de la enfermedad y la presencia de manifestaciones extraglandulares(188–192).

Sin embargo la alteración del inmunofenotipo linfocitario en sangre periférica más característica del SSp es el desequilibrio en las subpoblaciones de linfocitos B, que presentan una disminución absoluta y relativa de las células B de memoria y un aumento de las células B *naïve*. Esta alteración en las subpoblaciones circulantes de células B reflejara una alteración en los mecanismos de diferenciación y activación de las células B en los pacientes con SSp que conduce a la retención de las células B de memoria en los tejidos inflamados y su diferenciación a células plasmáticas(55,57,58,193–196). La disminución de los linfocitos B de memoria circulantes afecta a los linfocitos de memoria más maduros que han sufrido cambio de clase (CD27⁺IgD⁻), pero especialmente a los que no han presentado todavía el

cambio de clase (CD27⁺IgD⁺)(193). Esta peculiar distribución de las subpoblaciones de linfocitos B es características del SSp, mientras que los pacientes con LES presentan una disminución de los linfocitos B *naïve* y un incremento en los linfocitos B de memoria circulantes(197).

En los últimos años se ha propuesto utilizar esta alteración de las subpoblaciones circulantes de células B con finalidad diagnóstica y se ha evaluado la utilidad de los cocientes entre células B maduras e inmaduras en sangre periférica para identificar a los pacientes con SSp respecto a los pacientes con otras enfermedades autoinmunes o con síndrome seco no-Sjögren, obteniéndose sensibilidades entre 52-88% y especificidades entre 83-88% en tres estudios diferentes(198–200).

1.3. Utilidad de las citoquinas y quimioquinas séricas como biomarcadores en el SSp

Aunque se dispone de algunos biomarcadores clínicos (engrosamiento parotídeo, adenopatías, púrpura), de laboratorio (citopenias, crioglobulinas, hipocomplementemia) e histológicos (centros germinales) que son útiles como predictores de desarrollo de linfoma en los pacientes con SSp, éstos son insuficientes. Por ello, es necesario identificar nuevos biomarcadores que permitan mejorar el diagnóstico del SSp, categorizar adecuadamente a los pacientes (según su riesgo de desarrollar manifestaciones extraglandulares o su respuesta a diferentes terapias) y poner de manifiesto mecanismos patogénicos que puedan constituir nuevas dianas terapéuticas(201).

Los biomarcadores en sangre son de especial utilidad ya que la sangre periférica es fácil de obtener y de procesar y permite repetir las determinaciones a lo largo del tiempo. Los biomarcadores de laboratorio más utilizados son la presencia de hipocomplementemia, crioglobulinemia, componente monoclonal o linfopenia (especialmente la linfopenia CD4⁺), así como el factor reumatoide, la β 2MG o las cadenas ligeras libres; la mayoría de estos parámetros son marcadores subrogados de hiperactividad de las células B(107,142,158).

En la última década, la determinación de citoquinas y quimioquinas se ha hecho cada vez más asequible en la práctica clínica habitual y se ha estudiado su potencial utilidad como biomarcadores en el SSp. Se han descrito aumentos séricos de diversas citoquinas en los pacientes con SSp, pero en muchos estudios el número de pacientes incluido es pequeño (inferior a 30 e incluso a 20) y algunos resultados son inconsistentes(202–206). BAFF y CXCL13 son las citoquinas más estudiadas y se ha propuesto su posible utilidad como biomarcadores de actividad de la enfermedad y de riesgo de linfoma. Otras citoquinas también se han relacionado con alteraciones histológicas y con parámetros serológicos, aunque su utilidad en la práctica clínica real no se ha estudiado en profundidad. En 2016, Nishikawa *et al.* identificaron mediante un estudio proteómico de alto rendimiento 82 proteínas con expresión diferente en pacientes con SSp y controles, de las cuales identificaron 9 potenciales biomarcadores séricos; al validar estos biomarcadores mediante ELISA en una cohorte de validación de pacientes con SSp pudieron confirmar la utilidad

como biomarcadores de CXCL13, TNF-R2, CD48, BAFF y PD-L2, que se correlacionaron bien con el ESSDAI(207). En la Tabla 6 se resumen los hallazgos más importantes que se han publicado hasta la fecha en relación con la utilidad como biomarcadores de citoquinas y quimioquinas séricas en el SSp.

Tabla 1.6. Utilidad de citoquinas y quimioquinas séricas como biomarcadores en el SSp

	Función	Asociaciones
BAFF (208–212)	Maduración, proliferación y supervivencia de linfocitos B	Anti-Ro/SSA, anti-La/SSB, FR, IgG y ESSDAI. Predictor de linfoma
CXCL13 (166,213–215)	Reclutamiento de linfocitos B y formación y mantenimiento de centros germinales	Hipergammaglobulinemia, FR, β 2MG, BAFF, C4, ESSDAI Predictor de linfoma
IL-18 (216–218)	Proinflamatoria, promueve la diferenciación T_H17	IgG1, IgM, anti-Ro/SSA, anti-La/SSB, ESSDAI
IL-17 (190,219–221)	Induce la infiltración linfocitaria de las glándulas e induce daño tisular	FR, C3, Focus-score
IL-21 (45,222,223)	Activación de linfocitos B, diferenciación de células plasmáticas; estimula los linfocitos T_H17	IgG, anti-Ro/SSA, anti-La/SSB, ESSDAI
IL-22 (224)	Regulación de la homeostasis de mucosas y promueve la reparación epitelial. Promueve la expresión de CXCL13 y la formación de centros germinales	Hipergammaglobulinemia, anti-Ro/SSA y anti-La/SSB, FR, hiposalivación
IL-10 (225,226)	Inmunorreguladora. Promueve la proliferación y diferenciación de linfocitos B	IgG1, anti-Ro/SSA, anti-La/SSB
IL-6 (203,204,227)	Promueve la diferenciación de linfocitos T_{FH} y T_H17 . Promueve la diferenciación y supervivencia de las células plasmáticas.	VSG, neumopatía intersticial, afectación de SNP, Focus-score

IL-13 (206)	Proinflamatoria y profibrótica. Regula la diferenciación de linfocitos T _H .	Anti-Ro/SSA
TNFα (203,204,228)	Induce la función de células presentadoras de antígeno del epitelio glandular salival y su apoptosis	FR

2. Hipótesis

El estudio de las poblaciones linfocitarias en sangre periférica y la determinación de citoquinas y quimioquinas séricas tiene utilidad en el diagnóstico y pronóstico (como biomarcadores de actividad) en los pacientes afectados de SSp:

- La distribución de las diferentes poblaciones linfocitarias circulantes permite diferenciar a los pacientes con SSp de los pacientes con síndrome seco no-Sjögren.
- La cuantificación de las poblaciones linfocitarias circulantes es útil como biomarcador de actividad en el SSp.
- La caracterización de citoquinas y quimiocinas en suero permite identificar a los pacientes con SSp y diferenciarlos de los pacientes con síndrome seco no-Sjögren.
- Los niveles séricos de citoquinas y quimiocinas son útiles como biomarcadores de actividad en el SSp.

3. Objetivos

OBJETIVO PRINCIPAL

Evaluar la utilidad de las subpoblaciones linfocitarias circulantes y de los niveles séricos de BAFF, IL-17, IL-18, IL-21, IL-22, CXCL13, TNF-R2 y PD-L2 como biomarcadores diagnósticos y de actividad en los pacientes con SSp.

OBJETIVOS SECUNDARIOS

- 1) Estudiar la rentabilidad diagnóstica de las subpoblaciones linfocitarias circulantes para discriminar a los pacientes con SSp de los pacientes con síndrome seco no-Sjögren.
- 2) Analizar la utilidad diagnóstica de los niveles séricos de BAFF, IL-17, IL-18, IL-21, IL-22, CXCL13, TNF-R2 y PD-L2 para diferenciar a los pacientes con SSp de los pacientes con síndrome seco no-Sjögren.
- 3) Evaluar la asociación de los niveles séricos de BAFF, IL-17, IL-18, IL-21, IL-22, CXCL13, TNF-R2 y PD-L2 con las características clínicas e inmunológicas y la puntuación ESDDAI de los pacientes con SSp.
- 4) Examinar la relación entre las concentraciones séricas de BAFF, IL-17, IL-18, IL-21, IL-22, CXCL13, TNF-R2 y PD-L2 y las diferentes subpoblaciones linfocitarias circulantes en los pacientes con SSp.

4. Artículos que forman parte de la presente tesis doctoral

4.1. Artículo 1

Utility of lymphocyte phenotype profile to differentiate primary Sjögren's syndrome from sicca syndrome.

Loureiro-Amigo J, Palacio-García C, Martínez-Gallo M, Martínez-Valle F, Ramentol-Sintas M, Solans-Laqué R.

Rheumatology. 2021 Dec 1;60(12):5647–58.

DOI: [10.1093/rheumatology/keab170](https://doi.org/10.1093/rheumatology/keab170)

Original article

Utility of lymphocyte phenotype profile to differentiate primary Sjögren's syndrome from sicca syndrome

José Loureiro-Amigo^{1,2}, Carlos Palacio-García³, Mónica Martínez-Gallo⁴, Fernando Martínez-Valle^{1,2}, Marc Ramentol-Sintas¹ and Roser Soláns-Laqué^{1,2}

Abstract

Objective. To assess the potential diagnostic utility of advanced lymphocyte profiling to differentiate between primary Sjögren's Syndrome (pSS) and non-Sjögren Sicca syndrome.**Methods.** Distribution of peripheral lymphocyte subpopulations was analysed by flow cytometry in 68 patients with pSS, 26 patients with sicca syndrome and 23 healthy controls. The ability to discriminate between pSS and sicca syndrome was analysed using the area under the curve (AUC) of the receiver operating characteristic curve of the different lymphocyte subsets.**Results.** The ratio between naïve/memory B cell proportions showed an AUC of 0.742 to differentiate pSS and sicca syndrome, with a sensitivity of 76.6% and a specificity of 72% for a cut-off value of 3.4. The ratio of non-switched memory B cells to activated CD4⁺ T cells percentage ($B_{NSM}/CD4_{ACT}$) presented the highest AUC (0.840) with a sensitivity of 83.3% and specificity of 81.7% for a cut-off value <4.1. To differentiate seronegative pSS patients from sicca patients, the $B_{NSM}/CD4_{ACT}$ ratio exhibited an AUC of 0.742 (sensitivity 75%, specificity 66.7%, cut-off value <4.4), and the number of naïve CD4 T cells had an AUC of 0.821 (sensitivity 76.9%, specificity 88.9%, cut-off value <312/mm³).**Conclusion.** Patients with pSS show a profound imbalance in the distribution of circulating T and B lymphocyte subsets. The ratio $B_{NSM}/CD4_{ACT}$ is useful to discriminate between pSS and sicca syndrome.**Key words:** Sjögren's syndrome, keratoconjunctivitis sicca, lymphocyte subsets, flow cytometry, immunophenotyping

Rheumatology key messages

- Activated CD4 and CD8 T cells are increased in Sjögren's syndrome.
- Unswitched memory B to activated CD4 cells ratio discriminates pSS from sicca syndrome.
- Circulating lymphocyte profile is useful to differentiate seronegative pSS from sicca syndrome.

Introduction

Primary Sjögren's syndrome (pSS) is a systemic autoimmune disease characterized by chronic inflammation of exocrine glands, preferentially involving the salivary and lacrimal glands [1]. The disease predominantly affects middle aged women [2] and is characterized by eye and mouth dryness, chronic fatigue and generalized pain, which significantly reduce the quality of life of patients and their work productivity [3]. However, pSS is a heterogeneous autoimmune disease that can be expressed in many guises, and potentially any organ

¹Internal Medicine Department, Autoimmune Systemic Diseases Unit, Hospital Universitari Vall d'Hebron, ²Department of Medicine, Faculty of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), ³Hematology Department, Flow Cytometry Unit, Hospital Universitari Vall d'Hebron and ⁴Immunology Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Spain

Submitted 15 October 2020; accepted 7 February 2021

Correspondence to: Roser Soláns-Laqué, Internal Medicine Department, Autoimmune Systemic Diseases Unit, Hospital Vall d'Hebron, Passeig de la Vall d'Hebron, 119–129, 08035 Barcelona, Spain. E-mail: rsolanslaq@gmail.com

can be involved with some severe extraglandular manifestations leading to organ impairment and/or early death [4–6]. The most fearsome complication is the development of B cell lymphoma, for which primary SS (pSS) patients have a risk 15–20 times higher than the general population (lifetime risk, 5–10%) [7–9].

Pathogenesis of pSS is highly complex and not yet fully understood. Glandular and extraglandular manifestations share the development of per-epithelial B and T lymphocytic infiltrates as a common immunopathological mechanism, which leads to the destruction of the epithelial structures of the affected organs producing related symptoms [10]. Another immunopathogenic mechanism is B cell hyperactivity, as suggested by the presence of hypergammaglobulinaemia, cryoglobulinaemia and several specific autoantibodies such as anti-Ro/SSA and anti-La/SSB [11].

Diagnosis of pSS is based on a combination of clinical, immunological and histopathological criteria [12], and remains especially difficult in the early stages of the disease, since many patients may not meet the clinical or immunological diagnostic criteria and a minor salivary gland biopsy is not always feasible or diagnostic. It can be particularly tricky to differentiate pSS patients with negative anti-Ro antibodies (seronegative patients) from patients with non-Sjögren sicca syndrome or keratoconjunctivitis sicca, which is more prevalent than pSS in older adults. Patients with sicca syndrome present with sicca symptoms (eye and mouth dryness) due to lacrimal or salivary gland dysfunction attributed to any cause other than Sjögren's syndrome, such as ageing, medications, viral infections, irradiation or unknown causes. Distinction between the two entities is important since identifying those patients with an autoimmune basis for their sicca manifestations is the first step to deciding whether therapies directed against the immune system could be beneficial and avoiding such therapies and their attendant risks in patients with non-autoimmune sicca syndrome.

Therefore, there is a need to identify new diagnostic tools that support pSS diagnosis, especially in seronegative patients. In this sense, the study of lymphocytic subpopulations by flow cytometry could be useful. Examination of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) provides a snapshot of the state of the immune cells trafficking between lymphoid and non-lymphoid organs and sites of inflammation. Quantitative and qualitative modifications of immune cell subsets have been shown in autoimmune diseases such as systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and pSS [13]. Patients with pSS have been reported to exhibit lower absolute lymphocyte counts than healthy individuals, primarily due to a reduction of CD4⁺ T cells subsets [14–17]. Regarding B cells, a profound imbalance between the different subsets of B cells has been described in pSS, with a decrease in the frequencies and absolute counts of memory B cells, and an increase in those of naïve B cells [16, 18–23]. Moreover, it has been proposed that the ratios between immature and mature B

cells could be used for diagnostic purposes in pSS [24–26].

The aim of the present study was to analyse the diagnostic performance of lymphocyte phenotype profile to differentiate pSS from sicca syndrome.

Methods

Study population

Patients with pSS and sicca syndrome were consecutively recruited, between April 2014 and September 2017, from a cohort of patients followed up at the outpatient clinic of the Systemic Autoimmune Diseases Unit (Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona). All patients with pSS and none of the patients with sicca syndrome met the 2002 American-European Consensus Group criteria for pSS [27]. Healthy volunteers were recruited from the hospital staff in the same period. The Clinical Research Ethics Committee of Vall d'Hebron University Hospital approved this study and informed written consent was obtained from all subjects before study inclusion. Exclusion criteria included past or active lymphoma and ongoing infection.

Clinical and serological variables

Subjective xerostomia and xerophthalmia as well as duration of these symptoms from the onset of dryness symptoms were recorded as reported by patients. Objective xerostomia was evaluated by salivary gland scintigraphy at diagnosis in all cases. Salivary gland scintigraphy was repeated over the next 5 years from diagnosis in those patients with an initial I-II stage. Objective xerophthalmia was assessed by ophthalmological evaluation with Schirmer's test, tear breakup time and corneal staining (Rose Bengal score or SICCA Ocular Staining Score), at diagnosis and yearly or more frequently according to ocular findings. For this study the last available evaluation was recorded. Minor salivary gland biopsy was routinely performed in all patients with negative anti-Ro/SSA antibodies except if the patient denied permission. Disease activity in pSS patients was assessed using the EULAR Sjögren's syndrome disease activity index (ESSDAI) [28], the Clinical EULAR Sjögren's Syndrome Disease Activity Index (ClinESSDAI) [29] and the EULAR Sjögren's Syndrome Patient Reported Index (ESSPRI) [30]. ESSDAI at diagnosis and at the study inclusion were recorded. Present or past extra-glandular manifestations (EGM) including arthritis, vasculitis, peripheral nervous system involvement, renal disease and interstitial lung disease were registered. Treatment with hydroxychloroquine, glucocorticoids, immunosuppressive drugs or intravenous immunoglobulins (IVIg) over the past 6 months, and/or rituximab over the past 12 months was recorded.

All patients underwent routine serological evaluations at study inclusion. Rheumatoid factor (RF) was determined by nephelometry. Antinuclear antibodies (ANA) were determined by indirect immunofluorescence using

NOVA Lite (INOVA Diagnostics, San Diego, CA, USA). Antibodies against Ro60 and La were determined using QUANTA Flash (INOVA Diagnostics). Patients with pSS were divided into seropositive and seronegative groups according to their anti-Ro status.

Flow cytometry analysis

Peripheral blood samples were collected with K3-EDTA anti-coagulant at the time of study inclusion in all patients. Immunophenotypic analysis was performed using a standard stain/lysis procedure. Briefly, 100 µl of whole blood sample was stained for 15 min at room temperature in the dark with saturating amounts of monoclonal antibodies in a 4–8-colour panel (Supplementary Table 1, available at *Rheumatology* online). The antibody clones, fluorochromes and their source are specified in Supplementary Table 2, available at *Rheumatology* online. Afterwards, erythrocyte lysis was performed with 1 ml of VersaLyse Lysing Solution (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) for 10 min. After the lysis step, cells were washed in phosphate-buffered saline. Acquisition of flow data was performed immediately in a Navios flow-cytometer (Beckman-Coulter) and the analysis software was Kaluza (Beckman Coulter). Total leukocytes and lymphocytes were gated using a CD45⁺/SSC scattergram. Main lymphocyte populations were defined accordingly with the Human Immune Phenotyping Consortium [31]. Gating strategies are illustrated in Fig. 1. Absolute counts of lymphocyte subsets were calculated using the percentages obtained by flow cytometry and the leucocyte count obtained from a haemocytometer the same day (number of cells/µl).

Statistical analysis

Categorical variables are expressed as counts (percentage). Continuous variables are presented as the median and interquartile range except where otherwise specified. Categorical variables were compared using Fisher's exact test. Comparisons of continuous variables were performed using the Mann-Whitney *U*-test for comparisons between two groups and the Kruskal-Wallis test (with Sidak correction for multiple comparisons) for comparison between three groups. The 95% CIs of area under the curve (AUC) of receiver operating characteristic (ROC) curves were calculated using the binomial exact method. Optimal cut-off points based on the ROC curve were selected to estimate sensitivity and specificity. Sensitivity and specificity CIs were calculated using the Wilson method. All analyses were two-tailed and *P*-values <0.05 were considered statistically significant. Statistical analyses were performed using Stata 15.1 (Stata Corp., College Station, TX, USA).

Results

Patients

Sixty-eight patients with pSS, 26 patients with sicca syndrome and 23 healthy volunteers (controls) were enrolled

into the study. The main characteristics of patients with pSS, sicca syndrome and healthy volunteers are detailed in Table 1. Median age was similar in pSS and sicca syndrome patients (65.7 and 67.5 years, respectively, *P*=0.4761). Healthy volunteers were younger (median 46.1 years, *P*<0.0001). Duration of sicca symptoms was similar in pSS and sicca patients (12.4 vs 11.4 years, *P*=0.8880). A total of 30/68 (44%) patients with pSS presented EGM of the disease (Table 1). In contrast, only one patient with sicca syndrome presented EGM (arthritis and cutaneous vasculitis) that were treated with corticosteroids. This patient had positive ANA and RF at low titres in only one occasion, negative anti-citrullinated protein antibodies and negative extractable nuclear antigen antibodies (ENA) panel in repeated tests, and did not develop any other EGM over 10 years of follow-up.

Anti-Ro60 antibodies were present in 70.6% of pSS patients and in none of sicca patients. All seropositive pSS patients had anti-Ro60 antibodies and 63.6% of them also showed anti-La antibodies. No patient had isolated anti-La antibodies. Seropositive pSS patients were younger (59.1 vs 69.6 years, *P*=0.0071), presented higher ESSDAI scores than seronegative patients at baseline [median ESSDAI 2 (1–4) vs 0 (0–2), *P*=0.0018] and had higher IgG level (1457 vs 1067 mg/dl, *P*=0.0003). Characteristics of pSS patients according to presence of specific antibodies are detailed in Supplementary Table 3, available at *Rheumatology* online.

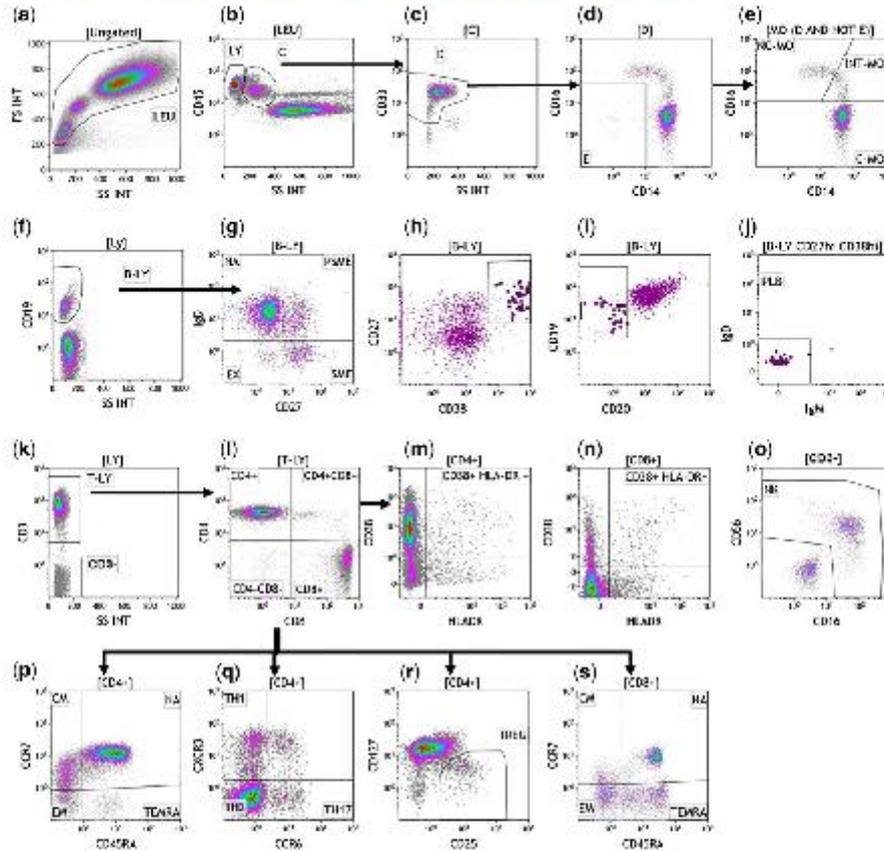
Minor salivary gland biopsy was performed in 43/68 (63.2%) patients with pSS and was diagnostic in 39 (90.7%) of them according to the 2002 AECG criteria (focus score ≥1) [27]. MSG biopsy was also performed in 18/26 (69.2%) patients with sicca syndrome (including all patients with EGM), and in any case showed histological features diagnostic of pSS. Eight patients with sicca syndrome refused to undergo a salivary gland biopsy, but none of them presented clinical symptoms other than generalized dryness, nor immunological features suggestive of Sjögren's syndrome (negative or low titre of ANA, negative RF, negative ENA panel) during the follow-up period.

Distribution of lymphocyte subsets is distinctive in patients with pSS

Detailed data of distribution of peripheral lymphocyte subsets in pSS, sicca syndrome and controls are shown in Table 2 and Supplementary Table 4, available at *Rheumatology* online.

The absolute count of leucocytes was lower in patients with pSS than in patients with sicca syndrome and controls, although no significant differences were reached (*P*=0.064 and *P*=0.065, respectively; *P*=0.017 for comparison between the three groups). Similarly, the absolute count of lymphocytes was lower in patients with pSS than in sicca patients and controls (*P*=0.068 and *P*=0.091, respectively; *P*=0.022 for global comparison between the three groups) although the proportion of lymphocytes was similar in the three

FIG. 1 Representative gating strategy used in the identification of lymphocyte populations



(A, B) Lymphocytes (LY) and monocytes are selected based on their side scatter (SS) properties and CD45 expression. (C, D) Monocyte gate (MO) is refined with CD33, CD14 and CD16 expression pattern. (E) Classical monocytes (C-MO), non-classical monocytes (NC-MO), intermediate monocytes (INT-MO). (F, G) B-lymphocytes (CD19⁺) (B-LY) (F) are plotted on a IgD vs CD27 plot for subpopulations analysis: SME (switched memory), NSME (non-switched memory), EX (exhausted) (G). (H-J) Plasmablasts (PLB) are defined as B-lymphocytes with high expression of CD27 and CD38, low to negative expression of CD20 and negative for IgD and IgM. (K, L) T CD4⁺ and T CD8⁺ lymphocytes are selected in a CD4 vs CD8 plot gated previously on CD3⁺ lymphocytes. (K, O) NK cells are selected as lymphocytes CD3⁻, CD56⁺ and/or CD16⁺. (M, N) We defined T cell activation as the co-expression of HLA-DR and CD38 on T-CD4 and T-CD8 lymphocytes. (P-S) T CD4 and CD8 subsets are analysed on plots: NA (naïve); CM (central memory); EM (effector memory); TEMRA (effector memory re-expressing CD45RA); TREG (T-regulator).

groups. However, the relative counts of lymphocyte subpopulations were different in patients with pSS, sicca patients and controls. So, the reduced absolute count of lymphocytes in patients with pSS was primarily due to a reduction of the absolute number of CD4⁺ T cells subpopulation (700 vs 953 cells/ μ l, $P=0.006$ compared with

sicca patients and 700 vs 986 cells/ μ l, $P=0.002$ compared with controls).

With regard to T cells, patients with pSS showed a significant reduced proportion of naïve CD4⁺ T cells ($P=0.007$) and a significant increase in the proportions of effector memory CD4⁺ T cells ($P=0.003$) and T helper 1 cells ($P=0.006$) compared with controls, although

TABLE 1 Characteristics of pSS patients, sicca syndrome patients and controls

	pSS	Sicca syndrome	Healthy volunteers
<i>n</i>	68	26	23
Female sex, <i>n</i> (%)	65 (95.6)	26 (100)	22 (95.7)
Age, median (IQR), years ^a	65.7 (47.8–72.4)	67.5 (58.2–72.4)	48.1 (41.1–53.5)
Smoking history, <i>n</i> (%)			
Never smoker	60 (88.2)	25 (96.2)	17 (73.9)
Current smoker	2 (2.9)	1 (3.8)	5 (21.7)
Former smoker	6 (8.8)	0	1 (4.3)
Duration of symptoms, median (IQR), years ^b	12.4 (8.2–16.6)	11.4 (8.4–17.3)	NA
Subjective xerostomia, <i>n</i> (%)	64 (94.1)	24 (92.3)	0
Subjective xerophthalmia, <i>n</i> (%)	67 (98.5)	24 (92.3)	0
Pathological salivary sialography, <i>n</i> (%)	68 (100)	22 (84.6)	NA
Objective xerophthalmia, <i>n</i> (%)	67 (98.5)	19 (73.1)	NA
Positive MSG biopsy, <i>n</i> (%)	39/43 (90.7)	0/18	NA
Anti-Ro60, <i>n</i> (%)	48 (70.6)	0	NA
Anti-La, <i>n</i> (%)	28 (41.2)	0	NA
ANA, <i>n</i> (%)	63 (92.6)	13 (50)	NA
Rheumatoid factor, <i>n</i> (%)	28 (41.2)	1 (3.8)	NA
IgG, median (IQR), mg/dl	1318 (105.1–1823)	981 (920–107.4)	NA
ESSDAI at inclusion, median (IQR)	2 (0–3.5)	NA	NA
Moderate or high score (≥ 5), <i>n</i> (%)	9 (13.2)	NA	NA
ESSDAI at baseline, median (IQR)	6 (4–11.5)	NA	NA
Moderate or high score (≥ 5), <i>n</i> (%)	47 (68.1)	NA	NA
ClinESSDAI at inclusion, median (IQR)	0 (0–2)	NA	NA
ClinESSDAI at baseline, median (IQR)	5.5 (3.5–11)	NA	NA
ESSPRI at inclusion, median (IQR)	6 (4–7.7)	NA	NA
Extraglandular manifestations, <i>n</i> (%)	30 (41.1)	1 (3.8)	0
Arthritis	12 (17.7)	1 (3.8)	
Cutaneous vasculitis	7 (10.3)	1 (3.8)	
PNS involvement	7 (10.3)	0	
Interstitial lung disease	6 (8.8)	0	
Renal involvement	4 (5.9)	0	
Current Treatment, <i>n</i> (%)	19 (27.9)	0	0
Hydroxychloroquine	11 (16.2)	0	
Corticosteroids	12 (17.6) ^c	0	
Immunosuppressive drugs	4 (5.9) ^d	0	
Rituximab	1 (1.5)	0	
IVIg	1 (1.5)	0	

^aAge was not different between pSS and sicca syndrome ($P=0.4761$). ^bDuration of symptoms was not different between pSS and sicca syndrome ($P=0.8800$). ^cMedian dose was 5 mg per day (range 2.5–12.5 mg per day) of prednisone or equivalent. ^dImmunosuppressive drugs were methotrexate in three patients and mycophenolate in another patient. ANA: anti-nuclear antibodies; ESSDAI: EULAR Sjögren's syndrome disease activity index; ClinESSDAI: Clinical EULAR Sjögren's Syndrome Disease Activity Index; ESSPRI: EULAR Sjögren's Syndrome Patient Reported Index; IgG: immunoglobulin G; IVIg: intravenous immunoglobulin; MSG: minor salivary gland biopsy; NA: not applicable; PNS: peripheral nervous system; pSS: primary Sjögren's syndrome.

no significant differences were reached when compared with sicca patients. Similarly, the proportion of naïve CD8⁺ T cells was reduced in pSS patients compared with controls ($P<0.001$) but not to sicca patients. However, the proportion of activated CD4⁺ and CD8⁺ T cells was significantly increased in pSS patients compared with both sicca patients ($P=0.001$) and healthy controls ($P=0.001$).

Regarding B cells, their proportion was slightly but not significantly increased in patients with pSS compared with sicca patients ($P=0.408$) and controls ($P=0.264$). However, the distribution of B cell subsets exhibited a

profound imbalance in patients with pSS, with a significant increase of naïve B cells compared with both sicca patients ($P=0.012$) and controls ($P=0.001$), and a significant decrease of memory B cells compared with both sicca patients ($P<0.001$) and controls ($P<0.001$), involving both non-switched and switched memory B cell subsets. The ratio of naïve B cells to memory B cells was higher in pSS than in sicca patients and controls, with significant differences between the three groups ($P<0.001$).

In seropositive patients the aforementioned alterations in lymphocyte subsets were more marked than in

TABLE 2 Comparison of peripheral lymphocyte subsets in pSS, sicca syndrome and controls

Cell types	pSS (n = 69)	Sicca syndrome (n = 26)	Healthy volunteers (n = 23)	P-value		
				pSS vs sicca	pSS vs HV	sicca vs HV
Leucocyte count	5510 (4200–7045)	6420 (5720–7420)	6580 (5630–8290)	0.064	0.065	0.998
Lymphocyte count	1640 (1210–2262)	2267 (1792–2488)	2086 (1663–2582)	0.068	0.091	1.000
Lymphocyte % ^a	29.7 (25.2–36.8)	31.1 (26.0–38.8)	32.6 (27.4–36.8)	0.908	0.918	1.000
T cells ^b	74.5 (65.3–79.6)	74.3 (69.1–77.2)	76.3 (71.0–79.7)	0.999	0.456	0.533
B cells ^b	8.8 (6.2–11.5)	7.5 (5.8–10.0)	6.6 (5.5–9.8)	0.408	0.264	0.992
NK cells ^b	12.3 (8.1–18.6)	15.8 (9.8–20.4)	12.5 (7.2–19.9)	0.492	0.999	0.739
T cell subsets (CD3 ⁺)						
CD4 ⁺ T cells ^b	43.5 (38.4–49.0)	49.1 (40.3–52.1)	51.5 (44.8–57.1)	0.185	<0.001	0.171
CD8 ⁺ T cells ^b	26.7 (18.7–34.7)	25.0 (20.5–28.1)	21.5 (17.3–26.2)	0.846	0.050	0.385
Double positive T cells ^b	0.9 (0.5–1.5)	1.1 (0.5–2.5)	0.9 (0.6–1.5)	0.534	0.944	0.937
Double negative T cells ^b	2.1 (1.0–3.1)	1.6 (1.3–2.7)	1.7 (1.3–2.5)	0.867	0.809	0.999
CD4 ⁺ T cell subsets						
Naïve CD4 ⁺ cells ^c	36.8 (22.5–47.3)	39.2 (33.5–53.0)	47.7 (44.1–55.9)	0.386	0.007	0.335
Central memory CD4 ⁺ cells ^c	29.4 (21.7–39.4)	37.2 (24.2–44.5)	31.7 (25.6–41.0)	0.304	0.734	0.953
Effector memory CD4 ⁺ cells ^c	22.3 (12.9–40.3)	17.3 (12.5–24.4)	12.4 (8.1–18.7)	0.126	0.003	0.491
TEMRA CD4 ⁺ cells ^c	3.4 (1.6–6.3)	3.3 (1.4–6.0)	2.8 (1.2–4.5)	0.898	0.561	0.939
Activated CD4 ⁺ cells ^c	2.5 (1.7–4.2)	1.5 (1.0–2.1)	1.3 (1.0–1.8)	0.001	<0.001	0.844
Regulatory T cells ^c	8.4 (6.7–10.1)	7.6 (6.3–8.1)	8.0 (6.6–10.1)	0.239	0.998	0.509
T _H 1 cells ^c	33.2 (24.6–39.4)	27.7 (23.1–33.8)	23.9 (21.2–28.7)	0.460	0.006	0.258
T _H 2 cells ^c	46.4 (39.9–54.9)	47.2 (37.2–56.9)	51.4 (48.4–59.6)	0.999	0.135	0.286
T _H 17 cells ^c	10.1 (6.9–12.4)	10.7 (8.2–12.6)	10.9 (6.9–13.1)	0.744	0.900	0.997
CD8 ⁺ T cell subsets						
Naïve CD8 ⁺ cells ^d	13.5 (5.9–26.6)	18.2 (11.1–27.0)	29.9 (22.5–39.5)	0.412	<0.001	0.032
Central memory CD8 ⁺ cells ^d	8.2 (4.7–12.5)	8.1 (5.3–11.3)	7.6 (3.6–13.2)	0.999	0.877	0.946
Effector memory CD8 ⁺ cells ^d	22.3 (14.7–33.4)	26.2 (14.3–32.9)	23.2 (12.0–30.6)	0.921	0.881	0.672
TEMRA CD8 ⁺ cells ^d	44.2 (25.2–63.4)	41.8 (29.6–57.4)	34.5 (24.2–47.6)	0.999	0.289	0.365
Activated CD8 ⁺ cells ^d	6.8 (4.5–13.9)	3.3 (2.3–5.0)	3.7 (2.3–5.1)	<0.001	0.001	0.989
B cell subsets (CD19 ⁺)						
Naïve B cells ^e	77.1 (67.2–84.3)	67.6 (53.5–76.1)	63.3 (54.9–71.3)	0.012	0.001	0.812
Memory B cells ^e	14.3 (10.1–22.7)	25.5 (16.6–37.1)	31.1 (20.0–35.7)	<0.001	<0.001	0.743
Non-switched memory B ^e	4.5 (3.2–6.7)	11.8 (8.3–15.8)	12.3 (8.2–16.3)	<0.001	<0.001	0.999
Switched memory B ^e	8.7 (5.1–12.4)	13.1 (7.5–16.6)	16.8 (10.6–19.5)	0.026	<0.001	0.363
Ratio naïve/memory	5.3 (3–8.4)	2.5 (1.4–4.6)	2.0 (1.6–3.6)	<0.001	<0.001	0.719
Exhausted B cells ^e	3.5 (2.4–6.0)	3.0 (2.3–4.3)	2.7 (1.9–3.3)	0.654	0.094	0.701
Plasmablasts ^e	1.2 (0.6–2.7)	0.9 (0.7–1.6)	1.6 (0.8–2.8)	0.546	0.484	0.112

Values are presented as median (interquartile range). Values in bold indicate statistical significance. ^aProportion of leucocytes. ^bProportion of lymphocytes. ^cProportion of CD3⁺CD4⁺ cells. ^dProportion of CD3⁺CD8⁺ cells. ^eProportion of CD3⁺CD19⁺ cells. HV: healthy volunteers; pSS: primary Sjögren's syndrome; TEMRA: terminally differentiated effector memory re-expressing CD45RA.

seronegative patients, with significantly lower lymphocyte absolute count and a more profound imbalance in the naïve/memory B ratio towards naïve B cells. Detailed data on distribution of peripheral lymphocyte subsets in seropositive and seronegative pSS patients is shown in Table 3.

Lymphocyte subpopulations allow differentiating between pSS and sicca syndrome

Diagnostic accuracy of the different lymphocyte subpopulations to discriminate between pSS and sicca syndrome is summarized in Table 4, which only shows those subsets or ratios that exhibited an AUC >0.70. Complete data are detailed in Supplementary Table 5, available at *Rheumatology* online.

TABLE 3 Distribution of peripheral lymphocyte subsets in pSS subgroups

Cell types	Seronegative (n = 20)	Seropositive (n = 48)	P-value				
			Ab ⁺ vs Ab ⁻	Ab ⁻ vs sicca	Ab ⁻ vs HV	Ab ⁺ vs sicca	Ab ⁺ vs HV
Leucocyte count	6655 (5825–8095)	5220 (4080–6590)	0.011	1.000	0.974	0.005	0.007
Lymphocyte count	2163 (1763–2566)	1494 (1066–1936)	0.003	0.993	0.997	0.003	0.006
Lymphocyte % ^a	30.6 (28.1–36.9)	29.1 (24.5–36.8)	0.306	1.000	0.999	0.782	0.793
T cells ^b	73.5 (66.1–77.7)	75.4 (65.3–79.7)	0.600	0.985	0.349	0.976	0.620
B cells ^b	8.5 (5.6–11.2)	8.8 (6.3–12.7)	0.423	0.944	0.866	0.265	0.180
NK cells ^b	13.5 (10.1–19.1)	11.2 (7.5–18.4)	0.319	0.884	0.992	0.419	0.987
T cell subsets (CD3 ⁺)							
CD4 ⁺ T cells ^b	42.4 (38.9–50.7)	43.6 (38.4–48.0)	0.936	0.519	0.011	0.187	0.001
CD8 ⁺ T cells ^b	27.5 (18.8–36.2)	26.3 (18.7–33.4)	0.604	0.818	0.095	0.923	0.091
Double positive T cells ^b	1.5 (0.5–2.5)	0.8 (0.4–1.3)	0.032	0.985	0.805	0.199	0.649
Double negative T cells ^b	1.4 (1.0–2.6)	2.5 (1.2–3.1)	0.134	0.868	0.893	0.464	0.420
CD4 ⁺ T cell subsets							
Naïve ^c	24.3 (20.3–34.3)	40.6 (28.5–49.3)	0.011	0.006	<0.001	0.972	0.085
Central memory ^c	36.2 (27.3–44.5)	27.1 (20.1–35.8)	0.032	0.989	0.818	0.072	0.286
Effector memory ^c	28.0 (15.2–42.2)	21.9 (11.9–39.0)	0.317	0.058	0.002	0.363	0.017
TEMRA ^c	3.6 (1.5–7.1)	3.4 (1.6–5.9)	0.660	0.808	0.549	0.962	0.698
Activated CD4 ⁺ T cells ^c	1.8 (1.6–4.4)	2.5 (1.8–4.0)	0.567	0.044	0.009	0.001	<0.001
Regulatory T cells ^c	7.2 (6.2–8.8)	8.6 (6.7–10.6)	0.062	0.998	0.557	0.057	0.800
T _H 1 cells ^c	37.6 (33.3–44.7)	31.0 (23.0–36.0)	0.011	0.023	<0.001	0.940	0.062
T _H 2 cells ^c	42.1 (27.4–48.2)	47.5 (42.1–61.5)	0.039	0.329	0.013	0.927	0.478
T _H 17 cells ^c	9.9 (6.7–12.2)	10.2 (7.1–12.4)	0.956	0.872	0.935	0.789	0.912
CD8 ⁺ T cell subsets							
Naïve ^d	17.3 (9.3–27.7)	17.6 (9.3–27.8)	0.014	0.002	<0.001	0.997	0.004
Central memory ^d	9.0 (5.1–17.1)	8.9 (5.1–16.0)	0.089	0.499	0.848	0.822	0.529
Effector memory ^d	21.3 (13.8–30.4)	21.4 (12.3–30.4)	0.132	0.852	0.296	0.618	0.999
TEMRA ^d	38.5 (22.5–63.4)	40.4 (22.3–63.4)	0.139	0.348	0.014	0.757	0.790
Activated CD8 ⁺ cells ^d	8.7 (5.2–14.0)	5.6 (4.3–17.4)	0.082	0.142	0.309	<0.001	<0.001
B cell subsets (CD19 ⁺)							
Naïve B cells ^e	67.2 (58.4–77.6)	80.4 (72.6–85.0)	0.004	0.992	0.606	<0.001	<0.001
Memory B cells ^e	22.0 (15.0–29.9)	12.4 (9.7–17.2)	0.003	0.480	0.104	<0.001	<0.001
Non-switched memory ^e	7.1 (4.3–14.8)	4.1 (3.2–5.8)	0.003	0.462	0.624	<0.001	<0.001
Switched memory ^e	11.6 (8.3–14.6)	7.2 (4.4–11.0)	0.016	0.768	0.074	0.006	<0.001
Ratio naïve/memory	2.9 (2.1–5.2)	6.5 (4.3–8.8)	0.003	0.678	0.161	<0.001	<0.001
Exhausted B cells ^e	4.6 (2.9–6.7)	3.3 (2.0–5.6)	0.063	0.126	0.013	0.977	0.377
Plasmablasts ^e	1.0 (0.7–1.8)	1.3 (0.6–2.8)	0.689	0.860	0.375	0.488	0.664

Values are presented as median (interquartile range). Values in bold indicate statistical significance. ^aProportion of leucocytes. ^bProportion of lymphocytes. ^cProportion of CD3⁺CD4⁺ cells. ^dProportion of CD3⁺CD8⁺ cells. ^eProportion of CD3⁺CD19⁺ cells. HV: healthy volunteers; PBMC: peripheral blood mononuclear cell; pSS: primary Sjögren's syndrome; TEMRA: terminally differentiated effector memory re-expressing CD45RA.

The best individual parameter to discriminate between pSS patients and sicca patients was the percentage of non-switched memory B cells, which yielded a sensitivity of 72% and a specificity of 76.6% for a cut-off of <7.3% (AUC of 0.795). The ratio of naïve B cells to non-switched memory B cells percentages (B_{NW}/B_{NSM}) had an AUC of 0.789 for differentiating pSS and sicca syndrome, with a sensitivity of 76.6% and a specificity of 72% for a cut-off of >9. However, the best diagnostic performance was shown by the ratio of non-switched memory B cells to activated CD4⁺ T cells ($B_{NSM}/CD4_{ACT}$) percentages, with an AUC of 0.840 (95% CI: 0.750, 0.915), a sensitivity of 83.3% and a specificity of 81.7% using a cut-off of <4.1. Patients with pSS and

$B_{NSM}/CD4_{ACT}$ ratio <4.1 had lower counts of lymphocytes (median 1529 vs 1855, $P=0.1387$), higher values of IgG (median 1636 vs 1082 mg/dl, $P=0.0034$) and higher prevalence of anti-Ro60 antibodies (81.6% vs 45.5%, $P=0.0209$). The highest sensitivity was shown by the ratio between the absolute counts of switched memory B cells to activated CD8⁺ T cells ($B_{SM}/CD8_{ACT}$), which had a sensitivity of 87.5% and a specificity of 65% (AUC 0.754) with a cut-off of <0.5. In contrast, the highest specificity was shown by the ratio between the absolute counts of non-switched memory B cells to activated CD8⁺ T cells ($B_{NSM}/CD8_{ACT}$), which had a sensitivity of 70.8% and a specificity of 88.3% with a cut-off of <0.7 (AUC 0.803).

TABLE 4 Diagnostic accuracy of lymphocyte subsets to discriminate pSS from sicca syndrome

	Cut-off point	AUC (95% CI)	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)
Relative counts* (%)				
CD4 _{ACT}	>2.3	0.741 (0.631, 0.828)	58.3 (45.7, 69.9)	87.5 (89.0, 96.7)
CD8 _{ACT}	>3.9	0.777 (0.670, 0.858)	86.7 (75.8, 93.1)	66.7 (46.7, 82.0)
B _{MEM}	<22	0.755 (0.650, 0.838)	72.0 (52.4, 85.7)	73.4 (61.5, 82.7)
B _{NSM}	<7.3	0.796 (0.699, 0.876)	72.0 (52.4, 85.7)	76.6 (64.9, 85.3)
Absolute counts (cells/μl)				
CD4	<778	0.705 (0.599, 0.792)	76.9 (57.9, 89.0)	60.3 (48.4, 71.1)
CD4 _{NA}	<312	0.719 (0.618, 0.811)	76.9 (57.9, 89.0)	67.2 (55.0, 77.4)
B _{MEM}	<22	0.724 (0.614, 0.809)	80.0 (60.9, 91.1)	64.1 (51.8, 74.7)
B _{NSM}	<8	0.772 (0.674, 0.857)	84.0 (65.3, 93.6)	68.8 (56.6, 78.8)
Ratios of relative counts*				
B _{NA} /B _{MEM}	>3.4	0.742 (0.638, 0.829)	70.3 (58.2, 80.1)	72.0 (52.4, 85.7)
B _{NA} /B _{NSM}	>9.0	0.789 (0.687, 0.866)	76.6 (64.9, 85.3)	72.0 (52.4, 85.7)
B _{MEM} /CD4 _{ACT}	<10.4	0.812 (0.709, 0.887)	79.2 (59.5, 90.8)	75.0 (62.8, 84.2)
B _{NSM} /CD4 _{ACT}	<4.1	0.840 (0.750, 0.915)	83.3 (64.1, 93.3)	81.7 (70.1, 89.4)
B _{SM} /CD4 _{ACT}	<5.1	0.762 (0.657, 0.848)	75.0 (55.1, 88.0)	66.7 (54.1, 77.3)
B _{NA} /CD8 _{ACT}	<14.5	0.742 (0.631, 0.828)	79.2 (59.5, 90.8)	68.3 (55.8, 78.7)
B _{MEM} /CD8 _{ACT}	<7.7	0.783 (0.683, 0.868)	66.7 (46.7, 82.0)	88.3 (77.8, 94.2)
B _{NSM} /CD8 _{ACT}	<1.8	0.819 (0.723, 0.896)	79.2 (59.5, 90.8)	76.7 (64.6, 85.6)
B _{SM} /CD8 _{ACT}	<4.1	0.749 (0.644, 0.838)	58.3 (38.8, 75.5)	66.7 (54.1, 77.3)
B _{NA} /(CD4 _{ACT} + CD8 _{ACT})	<10.9	0.747 (0.644, 0.838)	75.0 (55.1, 88.0)	76.7 (64.6, 85.6)
B _{MEM} /(CD4 _{ACT} + CD8 _{ACT})	<4.3	0.808 (0.709, 0.887)	70.8 (50.8, 85.1)	83.3 (72.0, 90.7)
B _{NSM} /(CD4 _{ACT} + CD8 _{ACT})	<1.4	0.828 (0.736, 0.906)	75.0 (55.1, 88.0)	81.7 (70.1, 89.4)
B _{SM} /(CD4 _{ACT} + CD8 _{ACT})	<1.3	0.762 (0.657, 0.848)	75.0 (55.1, 88.0)	66.7 (54.1, 77.3)
Ratios of absolute counts				
B _{NA} /B _{MEM}	>3.4	0.742 (0.638, 0.829)	70.3 (58.2, 80.1)	72.0 (52.4, 85.7)
B _{NA} /B _{NSM}	>9.0	0.789 (0.687, 0.866)	76.6 (64.9, 85.3)	72.0 (52.4, 85.7)
B _{MEM} /CD4 _{ACT}	<2.1	0.784 (0.683, 0.868)	70.8 (50.8, 85.1)	73.3 (61.0, 82.9)
B _{NSM} /CD4 _{ACT}	<0.9	0.815 (0.709, 0.887)	75.0 (55.1, 88.0)	85.0 (73.9, 91.9)
B _{SM} /CD4 _{ACT}	<0.8	0.733 (0.631, 0.828)	83.3 (64.1, 93.3)	61.7 (49.0, 72.9)
B _{MEM} /CD8 _{ACT}	<2.0	0.779 (0.670, 0.858)	70.8 (50.8, 85.1)	81.7 (70.1, 89.4)
B _{NSM} /CD8 _{ACT}	<0.7	0.803 (0.696, 0.877)	70.8 (50.8, 85.1)	88.3 (77.8, 94.2)
B _{SM} /CD8 _{ACT}	<0.5	0.754 (0.644, 0.838)	87.5 (69.0, 95.7)	65.0 (52.4, 75.8)
B _{MEM} /(CD4 _{ACT} + CD8 _{ACT})	<0.8	0.799 (0.696, 0.877)	75.0 (55.1, 88.0)	78.3 (66.4, 86.9)
B _{NSM} /(CD4 _{ACT} + CD8 _{ACT})	<0.3	0.828 (0.736, 0.906)	83.3 (64.1, 93.3)	76.7 (64.6, 85.6)
B _{SM} /(CD4 _{ACT} + CD8 _{ACT})	<0.3	0.761 (0.657, 0.848)	83.3 (64.1, 93.3)	65.0 (52.4, 75.8)

Values in bold indicate the best values in each subcategory. *Relative count of activated T cells is calculated as the proportion of CD3⁺CD4⁺ cells or CD3⁺CD8⁺ cells; relative counts of B cell subsets are calculated as the proportion of CD3⁺CD19⁺ cells. AUC: area under the curve; CD4: CD4⁺ T cells; CD4_{NA}: naïve CD4⁺ T cells; CD4_{ACT}: activated T CD4⁺ cells; CD8_{ACT}: activated T CD8⁺ cells; B_{NA}: naïve B cells; B_{MEM}: memory B cells; B_{NSM}: non-switched memory B cells; B_{SM}: switched memory B cells; pSS: primary Sjögren's syndrome.

We also evaluated the accuracy of lymphocyte profile to discriminate between seronegative pSS and sicca syndrome. Data are summarized in Table 5, which only shows those items that exhibited an AUC >0.70 (complete data are available in Supplementary Table 6, available at *Rheumatology* online). The ratio of B_{NSM}/CD4_{ACT} percentages exhibited a sensitivity of 75% and a specificity of 66.7% (cut-off <4.4) with an AUC of 0.742. The highest sensitivity was exhibited by the percentage of naïve CD8⁺ T cells, which had a sensitivity of 92.3% and a specificity of 72.2% (cut-off <8.7) with an AUC of 0.808. In contrast, the highest specificity was shown by the absolute count of naïve CD4⁺ T cells, which had a sensitivity of 76.9% and a specificity of 88.9% with a cut-off of <312 and yielded the best AUC (0.821).

Treatment did not influence the alterations of lymphocyte profile in pSS

To evaluate the possible influence of immunomodulatory or immunosuppressive treatments on the distribution of lymphocyte subpopulations, we analysed the lymphocyte profile in patients with primary Sjögren's syndrome according to their treatment status at the study entry (Supplementary Table 7, available at *Rheumatology* online). We found that patients who were under treatment (n = 19) had a non-significant higher leucocyte absolute count (P = 0.055) than patients not receiving treatment (n = 49), as well as a significantly higher lymphocyte absolute count (P = 0.028). This increase of lymphocyte count was mainly due to a significant increase in the

Downloaded from https://academic.oup.com/rheumatology/advance-article-abstract/doi/10.1093/rheumatology/kyz011/5564776/648924 by guest on 06 December 2021

TABLE 5 Diagnostic accuracy of lymphocyte subsets to discriminate seronegative pSS from sicca syndrome

	Cut-off point	AUC (95% CI)	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)
Relative counts^a, %				
CD4 _{NA}	<32.1	0.780 (0.622, 0.885)	84.6 (66.5, 93.8)	72.2 (49.1, 87.5)
CD8 _{NA}	<8.7	0.808 (0.673, 0.918)	92.3 (75.9, 97.9)	72.2 (49.1, 87.5)
CD4 _{ACT}	>1.6	0.724 (0.551, 0.850)	80.0 (54.8, 93.0)	54.2 (35.1, 72.1)
Absolute counts, cells/μl				
CD4 _{NA}	<312	0.821 (0.673, 0.918)	78.9 (57.9, 89.0)	88.9 (67.2, 96.9)
CD8 _{NA}	<82	0.788 (0.647, 0.902)	78.9 (57.9, 89.0)	83.3 (60.8, 94.2)
CD8 _{ACT}	>23	0.756 (0.579, 0.870)	80.0 (54.8, 93.0)	70.8 (50.8, 85.1)
Ratios of relative counts^a				
B _{NA} /CD4 _{ACT}	<33.1	0.739 (0.579, 0.870)	75.0 (55.1, 88.0)	68.7 (41.7, 84.8)
B _{MEM} /CD4 _{ACT}	<18.3	0.725 (0.551, 0.850)	54.2 (35.1, 72.1)	80.0 (54.8, 93.0)
B _{NSM} /CD4 _{ACT}	<4.4	0.742 (0.579, 0.870)	75.0 (55.1, 88.0)	66.7 (41.7, 84.8)
B _{NSM} /CD8 _{ACT}	<2.7	0.714 (0.551, 0.850)	70.8 (50.8, 85.1)	68.7 (41.7, 84.8)
B _{NA} /(CD4 _{ACT} + CD8 _{ACT})	<9.7	0.711 (0.551, 0.850)	79.2 (59.5, 90.8)	73.3 (48.0, 89.1)
B _{MEM} /(CD4 _{ACT} + CD8 _{ACT})	<5.0	0.725 (0.551, 0.850)	62.5 (42.7, 78.8)	80.0 (54.8, 93.0)
B _{NSM} /(CD4 _{ACT} + CD8 _{ACT})	<2.2	0.733 (0.579, 0.870)	62.5 (42.7, 78.8)	80.0 (54.8, 93.0)
Ratios of absolute counts				
B _{MEM} /CD4 _{ACT}	<2.4	0.706 (0.551, 0.850)	66.7 (46.7, 82.0)	73.3 (48.0, 89.1)
B _{NSM} /CD4 _{ACT}	<0.9	0.736 (0.579, 0.870)	75.0 (55.1, 88.0)	73.3 (48.0, 89.1)
B _{MEM} /CD8 _{ACT}	<1.4	0.711 (0.551, 0.850)	75.0 (55.1, 88.0)	66.7 (41.7, 84.8)
B _{NSM} /CD8 _{ACT}	<0.7	0.744 (0.579, 0.870)	70.8 (50.8, 85.1)	80.0 (54.8, 93.0)
B _{MEM} /(CD4 _{ACT} + CD8 _{ACT})	<0.7	0.747 (0.579, 0.870)	83.3 (64.1, 93.3)	66.7 (41.7, 84.8)
B _{NSM} /(CD4 _{ACT} + CD8 _{ACT})	<0.2	0.766 (0.579, 0.870)	91.7 (74.2, 97.7)	60.0 (35.7, 80.2)
B _{SM} /(CD4 _{ACT} + CD8 _{ACT})	<0.5	0.717 (0.551, 0.850)	66.7 (46.7, 82.0)	80.0 (54.8, 93.0)

Values in bold indicate the best values. ^aRelative count of activated T cells is calculated as the proportion of CD8⁺CD4⁺ cells or CD3⁺CD8⁺ cells; relative counts of B cell subsets are calculated as the proportion of CD3⁺CD19⁺ cells. AUC: area under the curve; CD4: CD4⁺ T cells; CD4_{NA}: naive CD4⁺ T cells; CD4_{ACT}: activated T CD4⁺ cells; CD8_{ACT}: activated T CD8⁺ cells; B_{NA}: naive B cells; B_{MEM}: memory B cells; B_{NSM}: non-switched memory B cells; B_{SM}: switched memory B cells; pSS: primary Sjögren's syndrome.

absolute counts of CD4⁺ T cells (924 vs 654, $P=0.023$), although CD4⁺ T cell proportion did not differ between both groups of patients ($P=0.277$). We did not find other relevant statistically significant differences in the distribution of lymphocyte subsets between both groups.

Furthermore, we repeated the comparison between primary Sjögren's syndrome, sicca syndrome and healthy volunteers after excluding from the Sjögren's group patients who were receiving treatment at study entry, and the results were very similar (Supplementary Tables 8 and 9, available at Rheumatology online). The most relevant difference was that non-treated pSS patients presented a significant lower absolute count of leucocytes than sicca patients ($P=0.010$) and controls ($P=0.011$), as well as a significant reduced absolute count of lymphocytes ($P=0.007$ and $P=0.017$, respectively). We did not find other statistically significant differences between the three groups when we only included Sjögren's patients who were not receiving treatment at the study inclusion.

Discussion

In the present study we observed profound disturbances in the distribution of circulating lymphocyte

subpopulations in pSS patients compared with sicca patients and healthy controls that involved different subsets of CD4⁺ T cells and B cells. These alterations were useful to differentiate pSS patients from sicca syndrome patients.

Interestingly, patients with pSS had lower absolute counts of leucocytes and lymphocytes than sicca patients and controls, although the proportion of lymphocytes was similar in all groups. As expected, we found important imbalances between the different subpopulations of circulating lymphocytes in patients with pSS. Thus, patients with pSS showed a reduced absolute number of T lymphocytes that was mainly due to a decrease of CD4⁺ T cells and a diminished CD4/CD8 ratio. Similar findings have been previously reported in patients with pSS [14–17, 32–35] and had been related to an enhanced apoptosis of circulating CD4⁺ T cells [32, 35, 36], as well as to an increased migration of circulating CD4⁺ T cells to exocrine glands [16]. However, in our study we found that the decrease of CD4⁺ T cells in patients with pSS was primarily due to a reduction of naive and central memory CD4⁺ subsets. In contrast to data previously reported [16], we found that the proportion of effector memory CD4⁺ T cells was significantly higher in pSS patients, which may reflect an increased trafficking to inflammation sites in

pSS [22, 37]. Regarding the polarized T helper lymphocyte subsets, we found a slight increase of the T_H1 subset in pSS patients, reflecting a predominant T_H1 response in pSS pathogenesis [10, 38, 39]. In contrast to previous studies [40, 41], we did not find differences in the proportion of T_H17 cells between pSS, sicca patients and controls. This is probably due to the use of different experimental approaches in the identification of T_H17 cells. Finally, regarding the T cell subsets we found a remarkable increase of activated $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells in pSS patients, as described by Mingueneau et al. [16]. Our findings suggest an enhancement of the differentiation of naive T cells with a sustained activation in pSS as previously proposed by Goules et al. [10].

Of note, the main disturbances that we observed in circulating lymphocytes from patients with pSS involved B cell subpopulations. Accordingly to the literature, we found an increased proportion of naive B cells and a reduced proportion of memory B cells, involving both non-switched and switched subsets of memory B cells [14, 16, 18–20, 22]. Moreover, the absolute number of naive B cells did not differ between groups, suggesting that the reduction in the memory B cell subset is due to an actual reduction in the number of circulating memory B cells, while the increase in naive B cell merely reflects the decrease in memory B cell count, as suggested by Roberts et al. [18]. The decrease of memory B cells in pSS has been proposed to be due to an increased migration of these cells to the inflamed salivary glands [42], or to an abnormal differentiation of B cells into plasma cells and the shedding of CD27 from the surface of memory B cells [43].

Given these imbalances in circulating B lymphocyte subsets, some authors have explored the accuracy of the blood B cell subsets profile for diagnostic purposes [24–26]. In our study we explored the potential utility of the complete lymphocyte profile to discriminate between pSS and sicca syndrome patients. Related to B cells, we found that the best diagnostic parameter for differentiating the two diseases was the ratio between the percentage of naive B cells and non-switched memory B cells, which showed a slightly poorer diagnostic accuracy than the analogous ratio $(Bm2+Bm2^y)/(eBm5+Bm5)$ previously described [24, 25]. However, the ratio of $B_{NEM}/CD4_{ACT}$ percentages not only exhibited better diagnostic accuracy for pSS diagnosis than the ratios between B cell subpopulations, but also allowed us to discriminate between seronegative pSS and sicca syndrome. Our results suggest that lymphocyte profiling by flow cytometry could be of diagnostic utility in patients with suspected pSS in whom anti-Ro and anti-La antibodies are negative, and a minor salivary gland biopsy is non-diagnostic or not feasible. The usefulness of T and B cells subpopulations ratios was suggested by Mingueneau et al. [16], but to our knowledge, this is the

first study that extensively analyses the diagnostic accuracy of T/B lymphocyte ratios for differentiating between pSS and sicca syndrome.

The present study has some limitations. First, the number of patients included is small and our results should be validated in other cohorts that include a higher number of subjects. However, our cohort comprised a well-defined group of pSS patients with a long prospective follow-up, and a group of patients with long-standing sicca syndrome prospectively followed-up, who did not fulfilled the pSS classification criteria over time, ruling out the possibility that these patients had a pSS in the early stage of the disease. Second, the inclusion of patients under immunomodulatory or immunosuppressive treatments could have influenced the blood lymphocyte profile. However, our results suggest that although active treatment can increase the absolute number of circulating lymphocytes, it does not significantly affect the relative lymphocyte counts since the lymphocyte profiling was similar in medicated and not medicated pSS patients. For this reason, we decided to include treated patients in our study in order to avoid the potential bias of excluding medicated patients, who are those with the most severe disease. Finally, most patients with pSS had a long-standing disease and PBMC distribution could be different in early and advanced stages of the disease, as recently described in systemic lupus erythematosus [44].

The main strengths of our study are the use of a standardized and internationally accepted flow cytometry immunophenotyping [31], allowing a reliable and reproducible identification of the different lymphocyte subsets, and the long prospective follow-up of all patients with pSS and sicca syndrome in a university hospital with expertise in pSS, which allows a clear differentiation between the two groups of patients.

In summary, patients with pSS showed a profound imbalance in the distribution of circulating T and B-lymphocytes subsets, characterized by a decrease in $CD4^+$ T cells and memory B cells, and an increase in activated T cells and naive B cells. Moreover, the ratio of percentages of non-switched memory B cells to activated $CD4^+$ T cells exhibited a good accuracy to discriminate between pSS and sicca syndrome, even in the case of seronegative pSS patients. We believe that our findings support the potential usefulness of lymphocyte profiling in the diagnosis of pSS, especially in doubtful cases that do not meet the current criteria for classification of pSS but may have the disease and benefit from early treatment.

Funding: This work was supported by a grant from the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) and the Federación Española de Enfermedades Raras (FEDER), (FIS PI13/0065).

Disclosure statement: The authors have no conflicts of interest to declare.

Data availability statement

The raw data that support the findings of this study are available from the corresponding author, R Solans-Laqué, upon reasonable request.

Supplementary data

Supplementary data are available at *Rheumatology* online.

References

- 1 Fox RL. Sjögren's syndrome. *Lancet* 2005;366:321–31.
- 2 Qin B, Wang J, Yang Z *et al*. Epidemiology of primary Sjögren's syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Ann Rheum Dis* 2015;74:1983–9.
- 3 Meijer JM, Meiners PM, Huddleston Slater JJR *et al*. Health-related quality of life, employment and disability in patients with Sjögren's syndrome. *Rheumatology (Oxford)* 2009;48:1077–82.
- 4 Brito-Zerón P, Kostov B, Solans R *et al*. 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.
- 5 Skopouli FN, Dafni U, Ioannidis JP, Moutsopoulos HM. Clinical evolution, and morbidity and mortality of primary Sjögren's syndrome. *Semin Arthritis Rheum* 2000;29: 296–304.
- 6 Ramos-Casals M, Brito-Zerón P, Solans R *et al*. SS Study Group. Systemic involvement in primary Sjögren's syndrome evaluated by the EULAR-SS disease activity index: analysis of 921 Spanish patients (GEAS-SS registry). *Rheumatology (Oxford)* 2014;53:321–31.
- 7 Zintzaras E, Voulgaris M, Moutsopoulos HM. The risk of lymphoma development in autoimmune diseases: a meta-analysis. *Arch Intern Med* 2005;165:2337–44.
- 8 Nocturne G, Mariette X. Sjögren Syndrome-associated lymphomas: an update on pathogenesis and management. *Br J Haematol* 2015;168:317–27.
- 9 Solans-Laqué R, López-Hernández A, Angel Bosch-Gil J *et al*. Risk, predictors, and clinical characteristics of lymphoma development in primary Sjögren's syndrome. *Semin Arthritis Rheum* 2011;41:415–23.
- 10 Goules AV, Kapsogeorgou EK, Tzioufas AG. Insight into pathogenesis of Sjögren's syndrome: dissection on autoimmune infiltrates and epithelial cells. *Clin Immunol* 2017;182:30–40.
- 11 Nocturne G, Mariette X. B cells in the pathogenesis of primary Sjögren syndrome. *Nat Rev Rheumatol* 2018;14: 133–45.
- 12 Shiboski CH, Shiboski SC, Seror R *et al*. International Sjögren's Syndrome Criteria Working Group. 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. *Arthritis Rheumatol* 2017;69:35–45.
- 13 van der Kroef M, van den Hoogen LL, Mertens JS *et al*. Cytometry by time-of-flight identifies distinct signatures in patients with systemic sclerosis, systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome. *Eur J Immunol* 2020;50:119–29.
- 14 Sudzius G, Mieliauskaite D, Siaurys A *et al*. Distribution of peripheral lymphocyte populations in primary Sjögren's syndrome patients. *J Immunol Res* 2015;2015: 854706.
- 15 Mandl T, Brødberg A, Jacobsson LTH, Manthorpe R, Henriksson G. CD4+ T-lymphocytopenia—a frequent finding in anti-SSA antibody seropositive patients with primary Sjögren's syndrome. *J Rheumatol* 2004;31: 726–8.
- 16 Mingueneau M, Boudroud S, Haskett S *et al*. Cytometry by time-of-flight immunophenotyping identifies a blood Sjögren's signature correlating with disease activity and glandular inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2016;137: 1809–21.e12.
- 17 Davies R, Hammarfors D, Bergum B *et al*. Patients with primary Sjögren's syndrome have alterations in absolute quantities of specific peripheral leucocyte populations. *Scand J Immunol* 2017;86:491–502.
- 18 Roberts MEPP, Kaminski D, Jenks SA *et al*. Primary Sjögren's syndrome is characterized by distinct phenotypic and transcriptional profiles of IgD+ unswitched memory B cells. *Arthritis Rheumatol* 2014;66: 2558–69.
- 19 Hansen A, Odendahl M, Reiter K *et al*. Diminished peripheral blood memory B cells and accumulation of memory B cells in the salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2002;46: 2180–71.
- 20 Bohnhorst JO, Bjorgan MB, Thoen JE, Natvig JB, Thompson KM. Bm1-Bm5 classification of peripheral blood B cells reveals circulating germinal center founder cells in healthy individuals and disturbance in the B cell subpopulations in patients with primary Sjögren's syndrome. *J Immunol* 2001;167:3610–8.
- 21 Hansen A, Gosemann M, Pruss A *et al*. Abnormalities in peripheral B cell memory of patients with primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2004;50: 1897–908.
- 22 Szabó K, Papp G, Szántó A, Tarr T, Zeher M. A comprehensive investigation on the distribution of circulating follicular T helper cells and B cell subsets in primary Sjögren's syndrome and systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 2016;183:76–89.
- 23 Corsiero E, Sutcliffe N, Pitzalis C, Bombardieri M, Reddy J. Accumulation of self-reactive naive and memory B cell reveals sequential defects in B cell tolerance checkpoints in Sjögren's syndrome. *PLoS One* 2014;9:e114575.
- 24 Cornec D, Saraux A, Pers J-O *et al*. Diagnostic accuracy of blood B-cell subset profiling and autoimmunity markers in Sjögren's syndrome. *Arthritis Res Ther* 2014; 16:R15.

- 25 Binard A, Le Pottier L, Devauchelle-Pensec V et al. Is the blood B-cell subset profile diagnostic for Sjogren syndrome? *Ann Rheum Dis* 2009;68:1447-52.
- 26 Barcelos F, Martins C, Papola A et al. Association between memory B-cells and clinical and immunological features of primary Sjogren's syndrome and Sicca patients. *Rheumatol Int* 2018;38:1063-73.
- 27 Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HA et al. Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis* 2002;61:554-8.
- 28 Seror R, Ravaud P, Bowman SJ et al. EULAR Sjogren's syndrome disease activity index: development of a consensus systemic disease activity index for primary Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2010;69:1103-9.
- 29 Seror R, Meines P, Baron G et al. Development of the ClinESSDA: a clinical score without biological domain. A tool for biological studies. *Ann Rheum Dis* 2016;75:1945-50.
- 30 Seror R, Ravaud P, Mariette X et al. EULAR Sjogren's Syndrome Patient Reported Index (ESSPRI): development of a consensus patient index for primary Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2011;70:968-72.
- 31 Maeccker HT, McCoy JP, Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nat Rev Immunol* 2012;12:191-200.
- 32 Ichikawa Y, Arimori K, Yoshida M et al. Abnormal expression of apoptosis-related antigens, Fas and bcl-2, on circulating T-lymphocyte subsets in primary Sjogren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 1995;13:307-13.
- 33 Kirtava Z, Blomberg J, Bredberg A et al. CD4⁺ T-lymphocytopenia without HIV infection: increased prevalence among patients with primary Sjogren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 1995;13:609-16.
- 34 Ferraccioli GF, Tonutti E, Casatta L et al. CD4 cytopenia and occasional expansion of CD4⁺CD8⁺ lymphocytes in Sjogren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 1996;14:125-30.
- 35 Zeher M, Szodoray P, Gyimesi E, Szondi Z. Correlation of increased susceptibility to apoptosis of CD4⁺ T cells with lymphocyte activation and activity of disease in patients with primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1999;42:1673-81.
- 36 Manganelli P, Fiotta P. Apoptosis and Sjogren syndrome. *Semin Arthritis Rheum* 2003;33:49-65.
- 37 Christodoulou MI, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM. Characteristics of the minor salivary gland infiltrates in Sjogren's syndrome. *J Autoimmun* 2010;34:400-7.
- 38 Tzioufas AG, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM. Pathogenesis of Sjogren's syndrome: what we know and what we should learn. *J Autoimmun* 2012;39:4-8.
- 39 Singh N, Cohen PL. The T cell in Sjogren's syndrome: force majeure, not spectateur. *J Autoimmun* 2012;39:229-33.
- 40 Alunno A, Carubbi F, Bistoni O et al. T regulatory and T helper 17 cells in primary Sjogren's syndrome: facts and perspectives. *Mediators Inflamm* 2015;2015:243723.
- 41 Li L, He J, Zhu L et al. The clinical relevance of IL-17-producing CD4⁺CD161⁺ cell and its subpopulations in primary Sjogren's syndrome. *J Immunol Res* 2015;2015:307453.
- 42 Hansen A, Reiter K, Ziprian T et al. Dysregulation of chemokine receptor expression and function by B cells of patients with primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2005;52:2109-19.
- 43 Bohrnhoest J, Bjergan MB, Thoen JE, Jonsson R et al. Abnormal B cell differentiation in primary Sjogren's syndrome results in a depressed percentage of circulating memory B cells and elevated levels of soluble CD27 that correlate with serum IgG concentration. *Clin Immunol* 2002;103:79-88.
- 44 Zhu L, Yin Z, Ju B et al. Altered frequencies of memory B cells in new-onset systemic lupus erythematosus patients. *Clin Rheumatol* 2018;37:205-12.

4.2. Artículo 2

Serum CXCL13, BAFF, IL-21 and IL-22 levels are related to disease activity and lymphocyte profile in primary Sjögren's Syndrome.

Loureiro-Amigo J, Franco-Jarava C, Perurena-Prieto J, Palacio C, Martínez-Valle F, Solans-Laqué R.

Clinical and Experimental Rheumatology. Nov-Dec 2021;39 Suppl 133(6):131-139.

Serum CXCL13, BAFF, IL-21 and IL-22 levels are related to disease activity and lymphocyte profile in primary Sjögren's syndrome

J. Loureiro-Amigo^{1,2}, C. Franco-Jarava³, J. Perurena-Prieto³,
C. Palacio⁴, F. Martínez-Valle^{1,2}, R. Soláns-Laqué^{1,2}

¹Autoimmune Systemic Diseases Unit, Internal Medicine Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona;

²Department of Medicine, Faculty of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona;

³Immunology Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona;

⁴Flow Cytometry Unit, Haematology Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain.

Jose Loureiro-Amigo, MD

Clara Franco-Jarava, PhD

Janire Perurena-Prieto, MD

Carlos Palacio, MD

Fernando Martínez-Valle, PhD

Roser Soláns-Laqué, PhD

Please address correspondence to:

Roser Soláns-Laqué,

Autoimmune Systemic Diseases Unit,

Internal Medicine Department,

Hospital Vall d'Hebron,

Passeig de la Vall d'Hebron 119-129,

08035 Barcelona, Spain.

E-mail: rsolanslaq@gmail.com

Received on October 1, 2021; accepted

in revised form on November 23, 2021.

Clin Exp Rheumatol 2021; 39 (Suppl. 133):

S131-S139.

© Copyright CLINICAL AND
EXPERIMENTAL RHEUMATOLOGY 2021.

Key words: Sjögren's syndrome,
cytokines, PD-L2, CXCL13, IL-22

Funding: this work was supported
by a grant from the Instituto de Salud
Carlos III (ISCIII) and the Federación
Española de Enfermedades Raras
(FEDER), (FIS P113/0065).

Competing interests: none declared.

ABSTRACT

Objective. To investigate the utility of serum BAFF, IL-17, IL-18, IL-21, IL-22, CXCL13, TNF-R2 and PD-L2 as biomarkers of disease activity in primary Sjögren's syndrome (pSS), their relationship with lymphocyte subpopulations and their accuracy to discriminate pSS from Sicca syndrome.

Methods. We conducted an observational study on 66 pSS patients and 48 controls (25 with Sicca syndrome and 23 healthy volunteers). Serum levels of BAFF, IL-17 A/F, IL-18, IL-21, IL-22, CXCL13, TNF-R2 and PD-L2 were measured using a multiplex immunoassay. Lymphocyte subpopulations were analysed by flow cytometry. Disease activity of pSS was assessed with ESSDAI at study inclusion.

Results. Patients with pSS presented higher serum CXCL13 (364.7 vs. 205.2 pg/mL), IL-21 (43.2 vs. 0 pg/mL) and BAFF (1646 vs. 1369 pg/mL), and lower PD-L2 levels (1950.8 vs. 2792.3 pg/mL) than controls. ESSDAI was associated with BAFF, IL-18 and IL-22. Patients with ESSDAI >0 exhibited higher CXCL13, IL-21, IL-22 and TNF-R2 concentrations. IL-21 levels correlated with lower memory B-cell and higher naïve B-cell percentages and IL-22 levels correlated with increased circulating activated CD4⁺ T-cells. The combination of serum CXCL13, BAFF and PDL2 levels using the formula $[\ln(\text{CXCL13}) + \ln(\text{BAFF})] / \ln(\text{PD-L2})$ exhibit an AUC of 0.854 (95% CI: 0.750-0.919) to discriminate between pSS and Sicca syndrome (sensitivity 77.2% and specificity 86.4% using a cut-off of 1.7).

Conclusion. CXCL13, BAFF, IL-21, and IL-22 are potential biomarkers of pSS activity and IL-21 and IL-22 are associated with disturbances of lymphocyte subpopulations in pSS. The combination of serum CXCL13, BAFF, and PD-L2 levels allows discrimination between pSS and Sicca syndrome.

phocyte subpopulations in pSS. The combination of serum CXCL13, BAFF, and PD-L2 levels allows discrimination between pSS and Sicca syndrome.

Introduction

Primary Sjögren's syndrome (pSS) is a systemic autoimmune disease that mainly affects middle-aged women, with a frequency in general population ranging from 0.01 to 0.72% (1, 2). The disease is a prototypical autoimmune disorder characterised by lymphocytic infiltration of salivary and lacrimal glands leading to xerostomia and keratoconjunctivitis sicca (1). Most patients present with oral and/or ocular dryness, although a wide number of systemic or extraglandular manifestations (EGM) may appear and may be the first clinical manifestation of the disease (3). Potentially, any organ can be involved, with some severe EGM leading to organ impairment and/or early death (3). Additionally, pSS patients are at increased risk of developing B-cell non-Hodgkin's lymphomas (4, 5), and it has been suggested that such lymphomas arise from autoreactive B cells (6). Pathophysiology of pSS is not yet fully understood. The disease typically targets the exocrine glands that are infiltrated by B and T lymphocytes, with periepithelial infiltrates and focal sialadenitis leading to destruction of the epithelial structures, tissue fibrosis and glandular dysfunction (7). Although polyclonal B cells activation, with hypergammaglobulinemia and a wide variety of circulating autoantibodies, is the most distinctive laboratory finding in pSS, T cells also play a role in pSS pathogenesis (8, 9).

Identification of biomarkers that allow the recognition of patients who are at risk of developing severe disease mani-

festations or lymphoma remains an unmet need in pSS (10). These patients could benefit from a closer monitoring and earlier use of intensive therapies. Furthermore, identification of biomarkers could be useful to help elucidate the complex pathogenesis of pSS.

Classically, β -2-microglobulin (β 2MG) has been used as a surrogate biomarker of B cell hyperactivity in pSS due to its wide availability in most clinical laboratories (11-13). However, over the last decade, measurement of serum cytokines and chemokines has become more affordable, and several serum cytokines have been investigated in pSS, especially those related to B cells. Indeed, B-cell activating factor (BAFF), a cytokine of the tumour necrosis factor family (TNF) (14), has been identified as a biomarker that correlates with the European League Against Rheumatism (EULAR) Sjögren's Syndrome Disease Activity Index (ESSDAI) score, which is the most commonly used primary outcome measure in pSS clinical trials (15, 16). BAFF has a crucial role in B cell maturation, plasma cell survival, antibody response promotion and immunoglobulin-class switch (17). Serum levels of β 2MG and BAFF have both been associated with disease activity and lymphoma development in patients with pSS (15, 18, 19). Likewise, Interleukin (IL) 21 levels have also been found increased in pSS patients, but its utility as a biomarker has not yet been established (20, 21). Other cytokines such as IL-4, IL-6, IL-12, IL-17, IL-18, IL-22, interferon gamma ($\text{IFN}\gamma$) and TNF alpha ($\text{TNF-}\alpha$) have also been assessed in pSS (22, 23). Recently, Nishikawa *et al.* have identified five proteins (CXCL13, TNF-R2, CD48, BAFF and PD-L2) that correlated with the ESSDAI score (24). Furthermore, a link between CXCL13, disease activity, and lymphoma development, has been proposed by Nocturne *et al.* (25).

The aim of the present study was to investigate the accuracy of serum BAFF, IL-17, IL-18, IL-21, IL-22, CXCL13, TNF-R2, and PD-L2 levels, as potential biomarkers of disease activity in pSS, as well as their utility to discriminate pSS patients from patients with non-Sjögren Sicca syndrome.

Methods

Design and study population

A cross-sectional study was performed between April 2014 and September 2017. Patients with pSS were consecutively recruited from the outpatient's clinic of the Systemic Autoimmune Diseases Unit of Vall d'Hebron University Hospital (Barcelona, Spain). Control group was composed of patients with non-Sjögren Sicca syndrome (n=25) from the same clinic, and healthy volunteers (HV) (n=23) recruited from the hospital staff in the same period. All patients with pSS and none of the patients with Sicca syndrome met the 2002 American-European Consensus Group criteria for pSS (26). Exclusion criteria included past or active lymphoma and ongoing infection. Clinical Research Ethics Committee of Vall d'Hebron University Hospital approved this study (PR(AG)35/2014) and informed written consent was obtained from all subjects before study inclusion.

Clinical and serological assessment

We collected clinical data including duration of the disease, subjective xerostomia and xerophthalmia, objective xerostomia and xerophthalmia, and presence of EGM such as arthritis, cutaneous vasculitis, peripheral nervous system (PNS) involvement, renal disease, and interstitial lung disease (ILD), according to the ESSDAI definitions (27). Objective xerophthalmia was assessed by ophthalmological evaluation with Schirmer's test, Tear Breakup time and corneal staining (SICCA Ocular Staining Score), at diagnosis and subsequently according to ocular findings. The last available routine evaluation was recorded. Objective xerostomia was evaluated by salivary gland scintigraphy at diagnosis in all cases. Salivary gland scintigraphy was repeated over the next 5 years from diagnosis in those patients with an initial I-II stage. Minor salivary gland (MSG) biopsy was routinely performed at diagnosis in all patients who gave informed consent.

Biological variables including presence of hypergammaglobulinemia, anti-Ro and anti-La antibodies, anti-nuclear antibodies (ANA) or rheumatoid

factor (RF), erythrocyte sedimentation rate (ESR), immunoglobulin G (IgG) levels, C3 and C4 levels, cryoglobulins, and serum β 2MG were assessed at study entry. Treatment with hydroxychloroquine, steroids, immunosuppressive drugs, or intravenous immunoglobulins (IVIG) over the last 6 months, and/or rituximab over the last 12 months was also recorded. Disease activity in pSS patients was routinely assessed using the ESSDAI score, and both baseline ESSDAI (at diagnosis) and at study inclusion were collected (27). ESSPRI was also collected in patients with pSS(28).

Serum cytokines

Serum samples were obtained from all subjects and stored at -80°C until analysis.

IL-17 A/F, IL-18, IL-21, IL-22, CXCL13 (C-X-C motif chemokine 13), TNF-R2 (TNF receptor 2) and PD-L2 (Programmed Death Receptor 1 Ligand 2) were determined using a personalized ProcartaPlex Multiplex Immunoassay (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) following the manufacturer's instructions. Briefly, after thawing and spinning serum samples, 25 μl of serum was incubated with shaking and at room temperature with the following materials and times: antibody beads for 2 hours, detection antibody for 30 minutes and Streptavidin-Phycoerythrin for 30 minutes. Data were acquired on a LuminexTM MAGPIXTM Instrument System (DiaSorin, Saluggia, Italy) and analysed with ProcartaPlex Analyst 1.0 software (Affymetrix, ThermoFisher, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA).

BAFF concentrations were measured by ELISA using the commercially available Quantikine kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), following manufacturer's instructions.

All cytokines are expressed in pg/mL . Lower limits of quantitation for each cytokine are shown in Supplementary Table S1.

Lymphocyte subpopulations

Peripheral blood samples were collected with K3-EDTA anticoagulant at the time of study inclusion in all patients. Immu-

Table I. Characteristics of patients and controls.

	Sjögren's syndrome n=66	Sicca syndrome n=25	Healthy volunteers n=23	p-value
Age (years)	64.3 [48.1-70.7]	67.4 [63.6-72.0]	46.1 [41.1-53.5]	0.0001
Female sex	63 (95.5%)	25 (100%)	22 (95.7%)	0.6437
Duration of symptoms (years)	12.0 [8.1-16.4]	10.3 [8.4-15.4]		0.9362
Subjective xerostomia	62 (93.9%)	24 (96.0%)		1.000
Subjective xerophthalmia	65 (98.5%)	22 (88.0%)		0.0615
Pathologic salivary scintigraphy	66 (100.0%)	22 (88.0%)		0.0189
Objective xerophthalmia	65 (98.5%)	19 (76%)		0.0015
Positive MSG biopsy	37/41 (90.2%)	0/19		
Anti-Ro60	46 (69.7%)	0		
Anti-La	28 (44.4%)	0		
Anti-nuclear antibodies	66 (100%)	12 (48%)		<0.0001
Rheumatoid factor	42 (63.6%)	2 (8%)		<0.0001
Immunoglobulin G (mg/dL)	1317.5 [1046-1827]	974 [928-1129]		0.0004
ESR (mm/h)	32 [17-46]	21 [10-33]		0.1322
ESSDAI at baseline	10 [8-28]			
ESSDAI at inclusion	2 [0-4]			
Moderate or high score (≥5)	9 (13.6%)			
ESSDAI biological domain	1 [0-1]			
ESSPRI at inclusion	6 [4.00-7.7]			
Extraglandular manifestations [§]	29 (43.9%)	1 (4%)		<0.0001
Arthritis	11 (16.7%)	1 (4%)		
Cutaneous vasculitis	7 (10.6%)	1 (4%)		
PNS involvement	7 (10.6%)	0		
Interstitial lung disease	6 (9.1%)	0		
Renal involvement	4 (6.1%)	0		
Active treatment	19 (28.8%)	1 (4%)		0.0103
Hydroxychloroquine	11 (16.7%)	0		
Corticosteroids	12 (18.8%)	1 (4%)		
Immunosuppressive drugs	4 (6.1%)*	0		
Rituximab	1 (1.5%)	0		
IVIg	1 (1.5%)	0		

ESSDAI: EULAR Sjögren's syndrome disease activity index; ESSPRI: EULAR Sjögren's Syndrome Patient Reported Index; ESR: erythrocyte sedimentation rate; IGIV: intravenous immunoglobulin; MSG: minor salivary gland; PNS: peripheral nervous system.

Values are expressed as n (%) or as the median and interquartile range [IQR].

[§]Several patients had more than one extraglandular manifestation at inclusion.

*Immunosuppressive drugs were methotrexate in 3 patients and mycophenolate in another patient.

nophenotypic analysis was performed using a standard stain/lysis procedure. Briefly, 100 µL of whole blood sample was stained for 15 minutes at room temperature in the dark with saturating amounts of monoclonal antibodies in a 4–8-colour panel (Suppl. Table S2). The antibody clones, fluorochromes and their source are specified in Supplementary Table S3. Afterwards, erythrocyte lysis was performed with 1 mL of Versa-Lyse Lysing Solution (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) for 10 minutes. After lysis step, cells were washed in phosphate buffered saline. Acquisition of flow data was performed immediately in a Navios flow-cytometer (Beckman-Coulter, Brea, CA, USA) and analysis software was Kaluza (Beckman-Coulter, Brea, CA, USA). Total leukocytes and lymphocytes were gated using a CD45⁺/SSC scattergram. Main lympho-

cyte populations were defined accordingly with the Human Immune Phenotyping Consortium (29). Gating strategies are illustrated in Supplementary Figure S1. Absolute counts of lymphocyte subsets were calculated using the percentages obtained by flow cytometry and the leucocyte count obtained from a haemocytometer the same day (number of cells/µL).

Statistical analysis

Categorical variables are expressed as number and percentage, whereas continuous variables are expressed as the median and interquartile range [IQR], unless otherwise specified. Fisher's exact test, Mann-Whitney U-test and Kruskal-Wallis test were used as appropriate to compare groups. All analyses were two-tailed. Pearson correlation coefficient was used to assess

correlations. The relationship between ESSDAI and serum cytokines was evaluated using Poisson regression and Pearson correlation.

The diagnostic accuracy of serum cytokines that were significantly different in pSS, as well as their ratios was evaluated using the area under the curve (AUC) of receiver operating characteristic (ROC) curves. The 95% confidence intervals (CI) of AUC were calculated with binomial exact method. Sensitivity and specificity 95% CI were calculated with Wilson method. When using combinations of cytokines, we applied logarithmic transformations to allow the sum of cytokines with different order of magnitude.

In all analyses, *p*-values <0.05 were considered statistically significant. Graphics and statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8.2.1

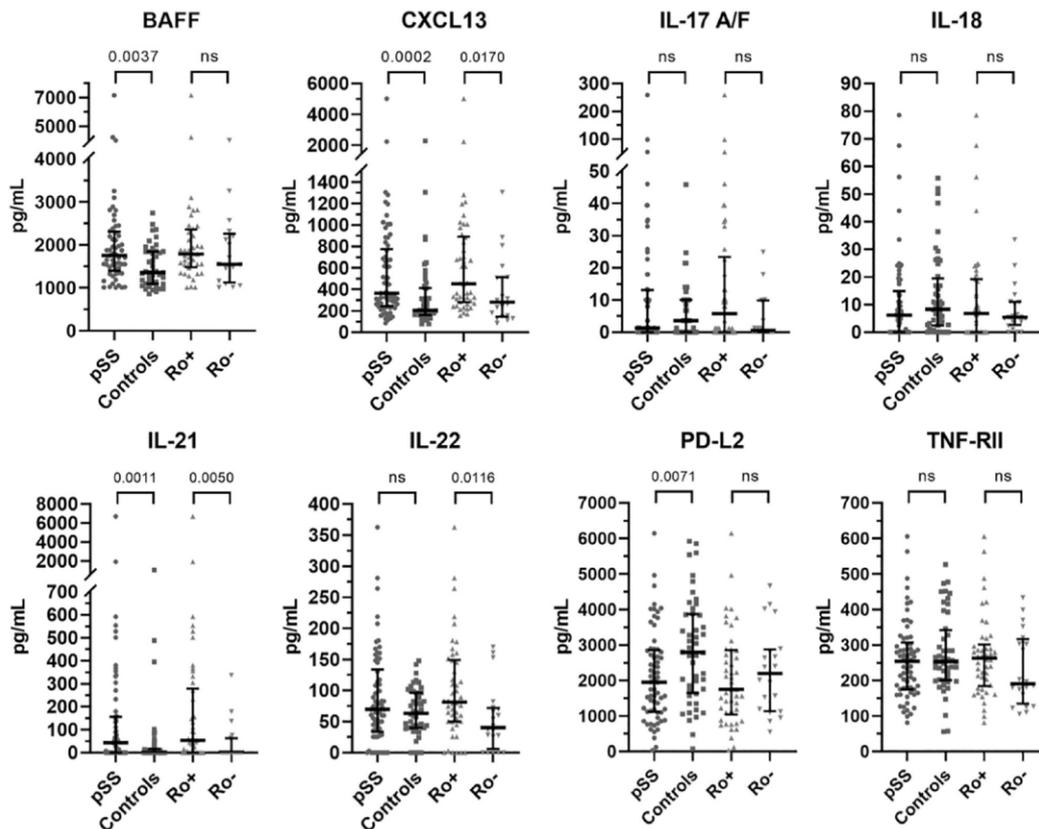


Fig. 1. Concentrations of serum cytokines in patients with primary Sjögren's syndrome and controls. Concentrations of serum cytokines in patients with primary Sjögren's syndrome (pSS) (n=66), controls (25 Sicca syndrome and 23 healthy controls), seropositive pSS patients (Ro+) (n=46) and seronegative pSS patients (Ro-) (n=20) are shown in each scatter plot, with median and interquartile range. All concentrations are shown in pg/mL. BAFF: B-cell activating factor; CXCL13: C-X-C motif chemokine 13; IL-17 A/F: Interleukin 17 A/F heterodimer; IL-18: Interleukin 18; IL-21: Interleukin 21; IL-22: Interleukin 22; PD-L2: programmed death 1-ligand 2; TNF-RII: tumour necrosis factor receptor 2.

(GraphPad Software, San Diego, CA, USA) and Stata 15.1 (Stata Corp., College Station, TX, USA).

Results

Patients

Sixty-six patients with pSS and 48 controls (25 patients with Sicca syndrome and 23 HV) were enrolled. Characteristics of patients and controls are detailed in Table I. Median age was similar in patients with pSS and Sicca syndrome (64.3 vs. 67.4 years respectively, $p=0.2671$), but HV were younger (median 48.7 years, $p=0.0001$). Almost all subjects were women. Forty-six (69.7%) patients with pSS had positive

anti-Ro60 antibodies while 28 (44.4%) had also positive anti-La antibodies. Nineteen (28.8%) pSS patients were receiving immunomodulator or immunosuppressive treatment at study inclusion. One patient with Sicca syndrome presented an isolated flare of arthritis and cutaneous vasculitis at disease onset that was treated with corticosteroids. This patient had positive ANA and RF at low titres only at baseline, with negative anti-citrullinated protein antibodies and negative Extractable Nuclear Antigen Antibodies Panel at baseline and in repeated tests and did not develop any other EGM over 10 years of follow-up.

Differences in serum cytokines between pSS patients and controls

Patients with Sicca syndrome and HV did not exhibit significant differences in serum cytokines concentrations (Suppl. Table S4), so a unique control group was considered for comparisons. Compared to controls, patients with pSS presented significantly increased CXCL13, IL-21 and BAFF concentrations, whereas PD-L2 was significantly decreased (Fig. 1).

Differences in serum cytokines between subgroups of patients with pSS

We compared serum concentrations of cytokines between pSS subgroups

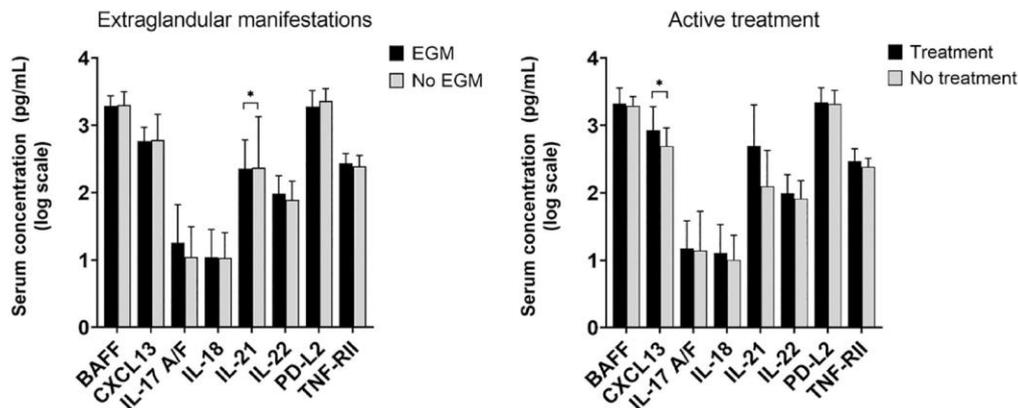


Fig. 2. Serum concentrations of cytokines in primary Sjögren's syndrome according to the presence of extraglandular manifestations and treatment status. Concentrations of serum cytokines in patients with primary Sjögren's syndrome are shown in logarithmic scale according to presence of extraglandular manifestations (left graph) and to treatment status at study entry (right graph). Bars show the mean and standard error of the mean after logarithmic transformation.

BAFF: B-cell activating factor; CXCL13: C-X-C motif chemokine 13; IL-17 A/F: Interleukin 17 A/F heterodimer; IL-18: Interleukin 18; IL-21: Interleukin 21; IL-22: Interleukin 22; PD-L2: programmed death 1-ligand 2; TNF-R2: tumour necrosis factor receptor 2; EGM: extraglandular manifestations.

according to the presence of antibodies against Ro60, EGM, and treatment status (Fig. 2). Seropositive pSS patients exhibited significantly increased CXCL13, IL-21 and IL-22 ($p=0.0170$, $p=0.0050$ and $p=0.0116$, respectively) while BAFF, IL-17 A/F, IL-18, PD-L2 and TNF-R2 were similar in both groups (Fig. 1).

Serum cytokines did not show relevant differences between patients with or without extraglandular involvement (Fig. 2). When we analysed if there was any relationship between serum cytokines and specific EGM, we found that CXCL13 was increased in patients with ILD (1143.3 vs. 330.7 pg/mL, $p=0.0043$), with a positive correlation between CXCL13 levels and the presence of ILD ($r=0.354$, $p=0.0035$).

Patients on active treatment showed similar serum levels of cytokines than those not receiving treatment, except for CXCL13 levels, that were higher in treated patients (848.8 vs. 492.1 pg/mL, $p=0.0154$) and IL-21 levels that were also higher in patients receiving treatment (76 vs. 14.9 pg/mL, $p=0.0677$).

Association between serum cytokines and markers of disease activity in pSS

We assessed correlation of serum cytokines with the ESSDAI score at study inclusion, the biological domain

of ESSDAI, ESSPRI, ESR, IgG, RF, β 2MG and the duration of disease (Fig. 3A). CXCL13 levels were significantly correlated with β 2MG levels ($r=0.374$, $p=0.0020$) and with biological domain of ESSDAI ($r=0.351$, $p=0.0039$), and exhibited a weak correlation with ESSDAI at study inclusion ($r=0.329$, $p=0.0071$). IL-21 levels correlated with ESR ($r=0.390$, $p=0.0016$), IgG level ($r=0.553$, $p<0.0001$) and RF positivity ($r=0.684$, $p<0.0001$). The cytokine that best correlated with other biomarkers of disease activity was IL-22, which was correlated with ESR ($r=0.474$, $p=0.0001$), IgG levels ($r=0.511$, $p<0.0001$), RF ($r=0.385$, $p=0.0018$), β 2MG ($r=0.398$, $p=0.0009$) and the biological domain of ESSDAI ($r=0.370$, $p=0.0022$). TNF-R2 showed correlation only with β 2MG ($r=0.425$, $p=0.0004$). No correlations were found between serum cytokines and C3 or C4 levels or presence of cryoglobulins.

In the Poisson regression model (Suppl. Table S5), ESSDAI was associated with serum levels of BAFF (OR 1.00020, $p=0.0017$), IL-18 (OR 1.00971, $p=0.0167$) and IL-22 (OR 1.00191, $p=0.0397$), but not those of CXCL13 (OR 1.00016, $p=0.0641$). Of note, patients with ESSDAI >0 exhibited higher values of CXCL13 (696.9 vs. 359.8 pg/mL, $p=0.0091$), IL-21 (311.1

vs. 49.8 pg/mL, $p=0.0461$), IL-22 (98.4 vs. 59.1 pg/mL, $p=0.0464$) and TNF-R2 (278.8 vs. 207.4 pg/mL, $p=0.0164$).

Serum cytokine levels interrelationship in pSS

We analysed the relationship between the different cytokines evaluated in this study (Fig. 4). CXCL13 correlated with IL-21 ($r=0.425$, $p=0.0004$), IL-22 ($r=0.515$, $p<0.0001$) and TNF-R2 ($r=0.471$, $p<0.0001$), but not with BAFF ($p=0.3262$). IL-22 also correlated with IL-17 A/F ($r=0.743$, $p<0.0001$), IL-18 (0.577, $p<0.0001$), IL-21 ($r=0.519$, $p<0.0001$) and TNF-R2 ($r=0.656$, $p<0.0001$). IL-17 A/F and IL-18 also showed correlation ($r=0.529$, $p<0.0001$).

Relationship between serum cytokines and lymphocyte subpopulations in pSS

We evaluated the relationship between serum cytokines levels and the absolute and relative lymphocyte counts, as well as between the relative count of CD4⁺ T-cells, activated CD4⁺ T-cells, B-cells, naïve B-cells, and memory B-cells (Fig. 3B). CXCL13, IL-17 A/F and IL-22 levels were negatively correlated with the percentage of lymphocytes ($r=-0.424$, $p=0.0004$; $r=-0.396$, $p=0.0011$; and $r=-0.336$, $p=0.0063$, respectively). IL-17 A/F and IL-22

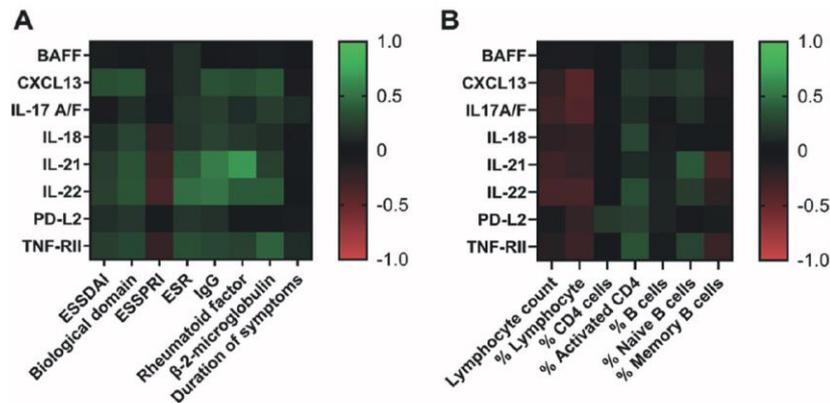


Fig. 3. Correlation of serum cytokines to disease activity and circulating lymphocyte subpopulations in primary Sjögren’s syndrome. A: Heat map of Spearman correlations between serum cytokines and disease activity measures and surrogates. B: Heat map of Spearman correlations between serum cytokines and circulating lymphocyte count and lymphocyte subpopulations. BAFF: B-cell activating factor; CXCL13: C-X-C motif chemokine 13; IL-17 A/F: Interleukin 17 A/F heterodimer; IL-18: Interleukin 18; IL-21: Interleukin 21; IL-22: Interleukin 22; PD-L2: programmed death 1-ligand 2; TNF-RII: tumour necrosis factor receptor 2; ESSDAI: EULAR Sjögren’s syndrome disease activity index; ESSPRI: EULAR Sjögren’s Syndrome Patient Reported Index; ESR: erythrocyte sedimentation rate; IgG: immunoglobulin G.

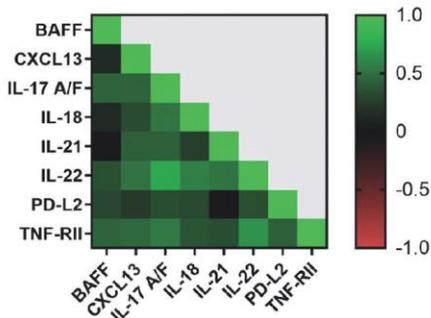


Fig. 4. Relationship between serum cytokines in primary Sjögren’s syndrome. Heat map of Spearman correlations between serum cytokines in primary Sjögren’s syndrome. BAFF: B-cell activating factor; CXCL13: C-X-C motif chemokine 13; IL-17 A/F: interleukin 17 A/F heterodimer; IL-18: interleukin 18; IL-21: interleukin 21; IL-22: interleukin 22; PD-L2: programmed death 1-ligand 2; TNF-RII: tumour necrosis factor receptor 2.

related with IL-22 ($r=0.331, p=0.0110$) and TNF-R2 ($r=0.349, p=0.0072$).

Diagnostic accuracy of serum cytokines to discriminate between pSS and Sicca syndrome

Serum cytokines that were significantly different between pSS group and control group, as well as their combinations, were assessed as diagnostic biomarkers of pSS. As summarised in Table II, BAFF, CXCL13 and PD-L2 showed the best accuracy to identify patients with pSS. CXCL13 exhibited an AUC of 0.779 (95% CI: 0.681-0.860) to discriminate between pSS and Sicca syndrome; using a cut-off of 240 pg/mL sensitivity was 77.3% (95% CI 65.8–85.7) and specificity 68% (95% CI: 48.4–82.8). The ratio

levels were also negatively correlated with the absolute count of lymphocytes ($r=-0.306, p=0.0133$, and $r=-0.334, p=0.0067$ respectively). IL-21 showed the best correlation with B-cell subpopulations percentages, exhibiting

a negative correlation with memory B-cells ($r=-0.344, p=0.0062$) and exhausted B-cells ($r=-0.422, p=0.0008$) and a positive correlation with naïve B cells ($r=0.379, p=0.0024$). The percentage of activated CD4⁺ T cells also cor-

Table II. Diagnostic accuracy of BAFF, CXCL13, IL-21 and PD-L2 to discriminate between Sicca syndrome and Sjögren’s syndrome.

	Sjögren’s syndrome n=66	Sicca syndrome n=25	Cut-off	AUC	Sensitivity (%)	Specificity (%)
BAFF (pg/mL)	1754 [1452-2290]	1156 [1020-1630]	>1452.0	0.743 (0.636-0.838)	75.4 (62.9-84.8)	68.2 (47.3-83.6)
CXCL13 (pg/mL)	364.7 [243.4-764.1]	181.0 [131.8-297.5]	>239.7	0.779 (0.681-0.860)	77.3 (65.8-85.7)	68.0 (48.4-82.8)
IL-21 (pg/mL)	43.2 [0-155.2]	0 [0-12.0]	>14.92	0.661 (0.552-0.756)	57.6 (45.6-68.8)	80.0 (60.9-91.1)
PD-L2 (pg/mL)	1950.8 [1123.4-2843.9]	2199.0 [1576.1-3850.5]	<1986.7	0.600 (0.496-0.705)	68.0 (48.4-82.8)	51.5 (39.7-63.2)
CXCL13/PD-L2	0.2517 [0.1263-0.3507]	0.0777 [0.0494-0.1419]	>0.1	0.788 (0.693-0.869)	72.7 (61.0-82.0)	84.0 (65.3-93.6)
(CXCL13 + BAFF) / PDL2	1.084 [0.841-1.967]	0.544 [0.465-0.840]	>0.84	0.809 (0.706-0.890)	75.4 (62.9-84.8)	77.3 (56.6-89.9)
ln CXCL13 + ln BAFF ln PDL2	1.8157 [1.6951-1.9137]	1.5711 [1.5147-1.6743]	>1.7	0.854 (0.750-0.919)	77.2 (64.8-86.2)	86.4 (66.7-95.3)

Serum cytokines concentrations are expressed as median and 25th and 75th percentiles.

CXCL13 to PD-L2 exhibited better specificity to discriminate between pSS and *Sicca* syndrome with an AUC of 0.788 (95% CI: 0.693–0.869); the cut-off 0.1 yielded a sensitivity of 72.7% (95% CI: 61–82) and a specificity of 84% (95% CI: 65.3–93.6). However, the most accurate score was the combination of CXCL13, BAFF and PDL2 levels using the formula $[\ln(\text{CXCL13}) + \ln(\text{BAFF})] / \ln(\text{PD-L2})$, which exhibit an AUC of 0.854 (95% CI: 0.750–0.919) and yielded a sensitivity of 77.2% (95% CI: 64.8–86.2) and a specificity of 86.4% (95% CI: 66.7–95.3) using a cut-off of 1.7.

Discussion

There is an unmet need for reliable serum biomarkers of disease activity in pSS that may guide monitoring and treatment (10). BAFF, CXCL13, TNF-R2 and PD-L2, have been previously related to the ESSDAI score (15, 24). In 2016 Nishikawa *et al.*, using a high-throughput proteomic analysis to identify differentially expressed proteins between pSS patients and healthy controls, identified five proteins (CD48, CXCL13, TNF-R2, BAFF and PD-L2) that correlated with ESSDAI scores (24). In our study, we could confirm that BAFF, CXCL13 and PD-L2 levels were different between pSS patients and controls, but not those of TNF-R2. In contrast to previous studies, in our cohort CXCL13 and BAFF were weakly correlated to the ESSDAI score at the study entry. We believe that the main reason for this discrepancy is that our patients had a long-standing disease and ESSDAI may not reflect the disease activity so accurately in its advanced stages, when most clinical manifestations are long lasting (stable for at least 12 months), since stable manifestations score zero on ESSDAI and this may underestimate the overall disease activity. Indeed, in the Nishikawa *et al.* cohort the mean disease duration was 4.7 (SD 6.6) years in the derivation cohort and 3.5 (SD 5.8) years in the validation cohort, compared to 13.2 (SD 7.2) years in our patients. B-cell activating factor (BAFF), also known as B Lymphocyte Stimulator (BLyS) was one of the first cytokines

related to pSS activity (15, 30). In 2013 Quartuccio *et al.* reported a strong correlation between ESSDAI and BAFF(15). Compared to our cohort, their cohort comprised younger patients, with higher disease activity at study entry (median ESSDAI score at inclusion 10 vs. 2 in our cohort). More recently, James *et al.* also described a correlation between ESSDAI and BAFF in the largest cohort dealing on this topic (13). However, their cohort also included patients with shorter disease duration (mean 7 (SD 6.1) years vs. 13.2 (SD 7.2) years in our cohort) and higher ESSDAI scores at study entry (median 4 [1-7] vs. 2 [0-2] in ours). Altogether, our findings suggest that BAFF may be a more accurate biomarker to identify patients with high activity at early stages of the disease. C-X-C motif chemokine 13 (CXCL13), also known as B lymphocyte chemoattractant (BLC) or B cell-attracting chemokine 1 (BCA-1), is a homeostatic chemokine that regulates B-cell trafficking, and plays a key role in the organization of lymphoid structures as well as in the formation of ectopic germinal centres in pSS (31, 32). Nocturne *et al.* were the first to report the association between CXCL13 and disease activity in pSS (25). Despite our cohort included pSS patients with more long-standing disease than the Nocturne cohort (12 vs. 5 years of disease duration), and a smaller proportion of patients with ESSDAI ≥ 5 (13.6% vs. 39.3%), we also found a significant correlation between ESSDAI and CXCL13, confirming the findings of these authors (24, 25). Furthermore, in our study CXCL13 was also associated with surrogate markers of B cell activity such as anti-Ro60 positivity, $\beta 2\text{MG}$ levels and lymphopenia. Besides, CXCL13 levels were associated with ILD development, validating the findings suggested by Nishikawa *et al.* (24). This finding could be of interest in patients with ILD of unknown aetiology when pSS is suspected. In addition, serum CXCL13 levels have recently been associated with lymphoma risk development (33), but patients with prior lymphoma were excluded from our study and none of the in-

cluded patients developed a lymphoma during the subsequent follow-up until March 2021. However, three patients not included in the study due to prior lymphoma development, presented high serum CXCL13 levels (606 pg/mL in one patient with Hodgkin lymphoma, 1082 pg/mL in one patient with parotid MALT lymphoma, and 317.5 pg/mL in one patient with diffuse large B-cell lymphoma) despite being in complete remission, in line with results reported by Traiano *et al.* (33). Finally, despite CXCL13 has been related to the recruitment of circulatory memory B cells into the salivary glands (8), we did not find an association between circulating B cell subpopulations and CXCL13 levels.

IL-21 is a pleiotropic cytokine that belongs to the common cytokine receptor γ -chain-dependent cytokine family (34), and is mainly produced by T follicular helper cells (T_{FH}), operating as a driver of B cell activation and differentiation towards plasma cells (35, 36). In pSS, IL-21 has been related to proliferation of naïve and memory CD8^+ T cells, to activation, proliferation and survival of CD4^+ T cells, and to the presence of hypergammaglobulinemia (20). In the present study we could confirm that serum IL-21 levels were associated with the abnormal naïve/memory B-cell ratio characteristic of pSS (9) and with surrogate markers of B cell activity such as IgG or the biological domain of ESSDAI. Our findings support the key role of IL-21 produced in the germinal centres of inflamed glands of pSS patients in the recruitment of peripheral memory B cells.

IL-22, a cytokine that belongs to the IL-10 family, is known to regulate mucosal homeostasis and promote epithelial repair following tissue damage (37), and is overexpressed in the salivary glands of patients with pSS. IL-22 is produced by innate lymphoid cells, T cells, and ductal epithelial cells, and has a key role in B-cell recruitment and ectopic germinal centre formation (38, 39). IL-22 has been demonstrated to be involved in the production of lymphoid chemokines like CXCL13 in germinal centres, which in turn orchestrate B-cell clustering, lymphoid aggregation,

and autoantibody production (39). Of note, serum IL-22 has been related with anti-Ro and anti-La antibodies, hypergammaglobulinemia and RF in patients with pSS (40). In our cohort, additionally to previously described relationships, IL-22 was also related to the presence of lymphopenia, increased circulating activated CD4⁺ T cells, and higher ESSDAI scores, as well as with CXCL13 levels.

Programmed death-1 (PD-1) is a receptor that belongs to the CD28/CTLA-4 family and together with its two ligands (PD-L1 and PD-L2) are key factors in inhibitory T cell signalling, mediating the mechanisms of tolerance and autoimmunity (41). PD-L1 has been extensively investigated over the last years, but PD-L2 function remains unclear. It has been proposed that PD-L2 has a dominant role in mucosal responses to environmental antigens by promoting tolerance (42). Tong *et al.* recently found that patients with systemic erythematosus lupus presented lower levels of soluble PD-L2 than healthy controls (43), and Nishikawa *et al.* proposed the potential utility of PD-L2 as a biomarker of disease activity in pSS (24). In our study we confirmed that patients with pSS had lower serum levels of soluble PD-L2 than controls, but we could not find an association with disease activity. Since oral tolerance is completely abolished in mice deficient in PD-L2 (44), it is possible that insufficient levels of soluble PD-L2 are somehow related to the development or sustenance of autoimmune response in salivary glands of patients with pSS.

Finally, we found that the ratio between CXCL13 plus BAFF to PD-L2 allows the identification of patients with pSS with high specificity. This finding could be useful for seronegative patients in whom pSS diagnosis could be doubtful. This serum biomarker could be useful in patients with *sicca* symptoms and negative antibodies against Ro-60/SSA and La/SSB but who present extraglandular manifestations suggestive of pSS involvement, such as non-specific interstitial lung disease (NSIP), peripheral polyneuropathy, or sensory ganglionopathy, and in whom a salivary gland

biopsy is non-diagnostic, not feasible, contraindicated or refused by the patient (45).

Our study presents several limitations. First, the number of patients and controls in our cohort is small, despite larger than in other previous reports (24). Second, patients included in our study had long-lasting pSS, and it is possible that the behaviour of the disease activity biomarkers may be different in patients with initial or earlier stages of the disease. Likewise, it is possible that different biomarkers may be useful for different domains of disease activity (13). Lastly, the ESSDAI score may be less accurate to assess disease activity in patients with long-standing disease because persistent but stable clinical manifestations (>12 months) are scored as zero, which may underestimate disease activity in some patients.

In summary, CXCL13, BAFF, IL-21, and especially IL-22 are useful biomarkers of pSS activity, as all of them correlate with surrogate markers of B cell activity and/or ESSDAI. Furthermore, they may be more accurate indicators of disease activity than BAFF in patients with long-lasting pSS. Additionally, increased levels of IL-21 are related to the abnormal naïve/memory B-cell ratio, characteristic of pSS, and IL-22 levels are associated with increased circulating activated CD4⁺ T cells. Finally, serum PD-L2 levels are decreased in patients with pSS and the combination of serum CXCL13, BAFF, and PD-L2 levels allows discrimination between pSS patients and *Sicca* syndrome patients. Further studies are needed to confirm our findings and to clarify the role of PD-L2 in pSS and the potential utility of therapies targeting CXCL13 and PD-1 pathways.

References

1. FOX RI: Sjögren's syndrome. *Lancet* 2005; 366: 321-31.
2. QIN B, WANG J, YANG Z *et al.*: Epidemiology of primary Sjögren's syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Ann Rheum Dis* 2015; 74: 1983-9.
3. BRITO-ZERÓN P, KOSTOV B, SOLANS R *et al.*: 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.
4. ZINTZARAS E, VOUGARELIS M, MOUTSOPOULOS HM: The risk of lymphoma development in autoimmune diseases: a meta-analysis. *Arch Intern Med* 2005; 165: 2337-44.
5. SOLANS-LAQUÉ R, LÓPEZ-HERNANDEZ A, ANGEL BOSCH-GIL J, PALACIOS A, CAMPILLO M, VILARDELL-TARRES M: Risk, predictors, and clinical characteristics of lymphoma development in primary Sjögren's syndrome. *Semin Arthritis Rheum* 2011; 41: 415-23.
6. GASPAROTTO D, DE VITA S, DE RE V *et al.*: Extrasalivary lymphoma development in Sjögren's syndrome: clonal evolution from parotid gland lymphoproliferation and role of local triggering. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 3181-6.
7. GOULES AV, KAPSOGEOURGOU EK, TZIOUFAS AG: Insight into pathogenesis of Sjögren's syndrome: Dissection on autoimmune infiltrates and epithelial cells. *Clin Immunol* 2017; 182: 30-40.
8. NOCTURNE G, MARIETTE X: B cells in the pathogenesis of primary Sjögren syndrome. *Nat Rev Rheumatol* 2018; 14: 133-45.
9. LOUREIRO-AMIGO J, PALACIO-GARCÍA C, MARTÍNEZ-GALLO M, MARTÍNEZ-VALLE F, RAMENTOL-SINTAS M, SOLANS-LAQUÉ R: Utility of lymphocyte phenotype profile to differentiate primary Sjögren's syndrome from sicca syndrome. *Rheumatology* 2021 Feb 23 [Online ahead of print].
10. MANFRÉ V, CAFARO G, RICCUCCI I *et al.*: One year in review 2020: Comorbidities, diagnosis and treatment of primary Sjögren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 2021; 38: S10-22.
11. STRÖM T, EVRIN PE, KARLSSON A: Serum beta-2-microglobulin in Sjögren's syndrome. *Scand J Rheumatol* 1978; 7: 97-100.
12. KREJSEK J, SLEZÁK R, KOPECKÝ O, DERNER V, ANDRYS C: Elevation of serum soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) and beta-2-microglobulin in Sjögren's syndrome. *Clin Rheumatol* 1997; 16: 149-53.
13. JAMES K, CHIPETA C, PARKER A *et al.*: B-cell activity markers are associated with different disease activity domains in primary Sjögren's syndrome. *Rheumatology* 2018; 57: 1222-7.
14. SCHNEIDER P, MACKAY F, STEINER V *et al.*: BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. *J Exp Med* 1999; 189: 1747-56.
15. QUARTUCCIO L, SALVIN S, FABRIS M *et al.*: BlyS upregulation in Sjögren's syndrome associated with lymphoproliferative disorders, higher ESSDAI score and B-cell clonal expansion in the salivary glands. *Rheumatology* 2013; 52: 276-81.
16. SEROR R, THEANDER E, BRUN JG *et al.*: Validation of EULAR primary Sjögren's syndrome disease activity (ESSDAI) and Patient indexes (ESSPRI). *Ann Rheum Dis* 2015; 74: 859-66.
17. VARIN MM, LE POTTIER L, YOUINOU P, SAULEP D, MACKAY F, PERS JO: B-cell tolerance breakdown in Sjögren's syndrome: focus on BAFF. *Autoimmun Rev* 2010; 9: 604-8.
18. GOTTENBERG J-E, BUSSON M, COHEN-SOLAL J *et al.*: Correlation of serum B lymphocyte stimulator and beta2 microglobulin

- with autoantibody secretion and systemic involvement in primary Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2005; 64: 1050-5.
19. GOTTENBERG JE, SEROR R, MICELI-RI-CHARD C *et al.*: Serum levels of Beta2-microglobulin and free light chains of immunoglobulins are associated with systemic disease activity in primary Sjögren's syndrome. Data at enrollment in the prospective ASSESS cohort. *PLoS One* 2013; 8: 1-6.
 20. KANG K, KIM H-O, KWOK S-K *et al.*: Impact of interleukin-21 in the pathogenesis of primary Sjögren's syndrome: increased serum levels of interleukin-21 and its expression in the labial salivary glands. *Arthritis Res Ther* 2011; 13: R179.
 21. KARNELL JL, ETTINGER R: The interplay of IL-21 and BAFF in the formation and maintenance of human B cell memory. *Front Immunol* 2012; 3: 1-9.
 22. ROESCHER N, TAK P, ILLEI G: Cytokines in Sjögren's syndrome. *Oral Dis* 2009; 15: 519-26.
 23. CHEN Y, DENG F, ZHENG J *et al.*: High circulating level of interleukin-18 in patients with primary Sjögren's syndrome is associated with disease activity. *Mod Rheumatol* 2016; 26: 156-8.
 24. NISHIKAWA A, SUZUKI K, KASSAI Y *et al.*: Identification of definitive serum biomarkers associated with disease activity in primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Res Ther* 2016; 18: 106.
 25. NOCTURNE G, SEROR R, FOGEL O *et al.*: CXCL13 and CCL11 serum levels and lymphoma and disease activity in primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheumatol* 2015; 67: 3226-33.
 26. VITALI C, BOMBARDIERI S, JONSSON R *et al.*: Classification criteria for Sjögren's syndrome: A revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis* 2002; 61: 554-8.
 27. SEROR R, RAVAUD P, BOWMAN SJ *et al.*: EULAR Sjögren's syndrome disease activity index: development of a consensus systemic disease activity index for primary Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2010; 69: 1103-9.
 28. SEROR R, RAVAUD P, MARIETTE X *et al.*: EULAR Sjögren's Syndrome Patient Reported Index (ESSPRI): Development of a consensus patient index for primary Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2011; 70: 968-72.
 29. MAECKER HT, MCCOY JP, NUSSENBLATT R: Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nat Rev Immunol* 2012; 12: 191-200.
 30. SEROR R, GOTTENBERG JE, DEVAUCHELLE-PENSEC V *et al.*: European league against Rheumatism Sjögren's syndrome disease activity index and European League Against Rheumatism Sjögren's syndrome patient-reported index: A complete picture of primary Sjögren's syndrome patients. *Arthritis Care Res* 2013; 65: 1358-64.
 31. ANSEL KM, HARRIS RBS, CYSTER JG: CXCL13 is required for B1 cell homing, natural antibody production, and body cavity immunity. *Immunity* 2002; 16: 67-76.
 32. BARONE F, BOMBARDIERI M, MANZO A *et al.*: Association of CXCL13 and CCL21 expression with the progressive organization of lymphoid-like structures in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 1773-84.
 33. TRAIANOS EY, LOCKE J, LENDREM D *et al.*: Serum CXCL13 levels are associated with lymphoma risk and lymphoma occurrence in primary Sjögren's syndrome. *Rheumatol Int* 2020; 40: 541-8.
 34. SPOLSKI R, LEONARD WJ: Interleukin-21: Basic biology and implications for cancer and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 2008; 26: 57-79.
 35. VERSTAPPEN GM, KROESE FGM, MEINERS PM *et al.*: B cell depletion therapy normalizes circulating follicular TH cells in primary Sjögren syndrome. *J Rheumatol* 2017; 44: 49-58.
 36. WITAS R, GUPTA S, NGUYEN CQ: Contributions of Major Cell Populations to Sjögren's Syndrome. *J Clin Med* 2020; 9: 3057.
 37. DUDAKOV JA, HANASH AM, VAN DEN BRINK MRM: Interleukin-22: immunobiology and pathology. *Annu Rev Immunol* 2015; 33: 747-85.
 38. CICCIA F, GUGGINO G, GIARDINA A *et al.*: The role of innate and lymphoid IL-22-producing cells in the immunopathology of primary Sjögren's syndrome. *Expert Rev Clin Immunol* 2014; 10: 533-41.
 39. BARONE F, NAYAR S, CAMPOS J *et al.*: IL-22 regulates lymphoid chemokine production and assembly of tertiary lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci* 2015; 112: 11024-9.
 40. LAVOIE TN, STEWART CM, BERG KM, LI Y, NGUYEN CQ: Expression of Interleukin-22 in Sjögren's Syndrome: Significant Correlation with Disease Parameters. *Scand J Immunol* 2011; 74: 377-82.
 41. ZAMANI MR, ASLANI S, SALMANINEJAD A, JAVAN MR, REZAEI N: PD-1/PD-L and autoimmunity: A growing relationship. *Cell Immunol* 2016; 310: 27-41.
 42. FIFE BT, PAUKEN KE: The role of the PD-1 pathway in autoimmunity and peripheral tolerance. *Ann NY Acad Sci* 2011; 1217: 45-59.
 43. TONG M, FANG X, YANG J, WU P, GUO Y, SUN J: Abnormal membrane-bound and soluble programmed death ligand 2 (PD-L2) expression in systemic lupus erythematosus is associated with disease activity. *Immunol Lett* 2020; 227: 96-101.
 44. ZHANG Y, CHUNG Y, BISHOP C *et al.*: Regulation of T cell activation and tolerance by PDL2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 11695-700.
 45. LUPPI F, SEBASTIANI M, SILVA M *et al.*: Interstitial lung disease in Sjögren's syndrome: a clinical review. *Clin Exp Rheumatol* 2020; 38 (Suppl. 126): S291-300.

5. Resumen global de los resultados

El primero de los estudios que forma parte de esta tesis doctoral es un estudio observacional realizado en el Hospital Universitario Vall d'Hebron entre abril de 2014 y septiembre 2017, en el que se analizaron las poblaciones linfocitarias en sangre periférica de 68 pacientes con SSp, 26 pacientes con síndrome seco no-Sjögren y 23 voluntarios sanos. Todos los pacientes con SSp cumplían los criterios clasificatorios AECG de 2002 y ninguno de los pacientes con síndrome seco no-Sjögren los cumplía. Los pacientes se reclutaron en las consultas de enfermedades autoinmunes sistémicas del hospital, mientras que los voluntarios sanos se reclutaron entre el personal del hospital. Se recogieron las variables epidemiológicas y clínicas de todos los pacientes y se estudiaron las poblaciones linfocitarias circulantes mediante citometría de flujo, analizándose la capacidad de las diferentes poblaciones linfocitarias y sus interrelaciones para discriminar a los pacientes con SSp de los pacientes con síndrome seco no-Sjögren. En el análisis estadístico, para las comparaciones entre grupos se utilizaron pruebas no paramétricas (prueba *U* de Mann-Whitney y prueba de Kruskal-Wallis con corrección de Sidak para múltiples comparaciones). Para el análisis del rendimiento diagnóstico se utilizó el área bajo la curva (AUC) ROC y se escogieron los puntos de corte óptimos basados en la curva ROC utilizando el paquete estadístico Stata 15.1.

La mediana de edad de los pacientes fue de 65,7 años en el grupo de SSp y de 67,5 años en los pacientes con síndrome seco ($p=0,4761$), mientras que los voluntarios sanos eran más jóvenes, con una mediana de edad de 46,1 años ($p<0,0001$). Casi todos los pacientes con SSp y los voluntarios sanos fueron mujeres (95,6% y 95,7% respectivamente) mientras que todas las pacientes con síndrome seco no-Sjögren eran mujeres. La duración de los síntomas también fue similar entre los pacientes con SSp y los pacientes con síndrome seco (mediana de 12,4 vs. 11,4 años; $p=0,8880$). Los pacientes con SSp presentaron una mediana de 2 [0-3,5] puntos en el ESSDAI a la inclusión en el estudio y 30 (44,1%) presentaban o habían presentado alguna manifestación extraglandular (artritis en 12, vasculitis cutánea en 7, afectación de SNP en 7, neumopatía intersticial en 6 y afectación renal en 4). Diecinueve pacientes con SSp (27,9%) estaban recibiendo algún tratamiento inmunomodulador o inmunosupresor en el momento de la inclusión en el estudio (11 hidroxiclороquina, 12 corticoesteroides, tres metotrexato, uno micofenolato, uno

rituximab y uno IGIV). Cuarenta y ocho (70,6%) de los pacientes con SSp presentaban anticuerpos anti-Ro60, y 28 de éstos presentaban también anticuerpos anti-La. Los pacientes seropositivos fueron más jóvenes (mediana de 59,1 vs. 69,6 años, $p=0,0071$) y presentaban una mayor puntuación ESSDAI a la inclusión en el estudio (mediana de 2 [1-4] vs. 0 [0-2]; $p=0,0018$).

El recuento absoluto de leucocitos fue más bajo en los pacientes con SSp que en los pacientes con síndrome seco y los controles sanos (5510 vs. 6420 vs. 6580 células/ μ L; $p=0,017$). El porcentaje de linfocitos fue similar entre los tres grupos (29,7% vs. 31,1% vs. 32,6%; $p=0,757$) y consecuentemente el recuento absoluto de linfocitos fue más bajo en los pacientes con SSp (1640 vs. 2267 vs. 2086 células/ μ L; $p=0,022$). Sin embargo la distribución de las subpoblaciones linfocitarias fue diferente entre los tres grupos y la reducción absoluta de linfocitos circulantes en los pacientes con SSp fue debida principalmente a una disminución del recuento de linfocitos T CD4⁺ (700 vs. 953 vs. 986 células/ μ L; $p=0,0004$). Con respecto a los voluntarios sanos, los pacientes con SSp presentaron una menor proporción de linfocitos T CD4⁺ *naïve* (36,8% vs. 47,7%; $p=0,007$) y CD8⁺ *naïve* (13,5% vs. 29,9%; $p<0,001$) y una mayor proporción de linfocitos T CD4⁺ *effector memory* (22,3% vs. 12,4%; $p=0,003$) y T_H1 (33,2% vs. 23,9%; $p=0,006$). No obstante, el hallazgo más llamativo en cuanto a las subpoblaciones de linfocitos T fue que los pacientes con SSp presentaron un incremento significativo en la proporción de linfocitos T activados, tanto CD4⁺ (2,5% vs. 1,5% vs. 1,3%; $p<0,0001$) como CD8⁺ (6,8% vs. 3,3% vs. 3,7%; $p<0,0001$) con respecto a los pacientes con síndrome seco y los controles sanos.

Con respecto a los linfocitos B circulantes, los pacientes con SSp presentaron un incremento no significativo en su proporción (8,8% vs. 7,5% vs. 6,6%; $p=0,1526$), pero con una marcada alteración en la distribución de las diferentes subpoblaciones de linfocitos B. Así, con respecto a los pacientes con síndrome seco y los voluntarios sanos, los pacientes con SSp presentaron un aumento del porcentaje de linfocitos B *naïve* (77,1% vs. 67,6% vs. 63,3%; $p=0,0003$) y una reducción de los linfocitos B de memoria (14,3% vs. 25,5% vs. 31,1%; $p<0,0001$), que afectaba tanto a los linfocitos B de memoria *non-switched* (4,5% vs. 11,6% vs. 12,3%; $p<0,0001$) como a los *switched* (8,7% vs. 13,1% vs. 16,8%; $p=0,0001$), de forma que el cociente

naïve/memoria fue significativamente mayor en los pacientes con SSp (5,3 vs. 2,5 vs. 2; $p < 0,0001$).

Todas las alteraciones mencionadas en las diferentes poblaciones linfocitarias circulantes fueron más marcadas en los pacientes con SSp seropositivo, especialmente el desequilibrio en las subpoblaciones de linfocitos B.

A continuación se estudió la capacidad diagnóstica de las diferentes subpoblaciones de linfocitos circulantes para discriminar entre SSp y síndrome seco no-Sjögren en base a las alteraciones previamente descritas. El mejor parámetro individual fue el porcentaje de linfocitos B de memoria *non-switched*, que con un punto de corte $< 7,3\%$, ofreció una sensibilidad del 72% y una especificidad del 76,6% (AUC 0,795). El cociente entre el porcentaje de linfocitos B *naïve* y linfocitos B de memoria *non-switched* presentó una sensibilidad del 76,6% y una especificidad del 72% con un punto de corte > 9 (AUC 0,789). El mejor parámetro diagnóstico fue el cociente entre el porcentaje de linfocitos B de memoria *non-switched* y el de linfocitos T CD4⁺ activados, que con un punto de corte $< 4,1$ mostró una sensibilidad del 83,3% y una especificidad del 81,7% (AUC 0,840). La mejor sensibilidad fue la del cociente entre el recuento absoluto de linfocitos B de memoria *switched* y los linfocitos T CD8⁺ activados, que presentó una sensibilidad del 87,5% y una especificidad del 65% con un punto de corte $< 0,5$ (AUC 0,754). La especificidad más alta la presentó el cociente entre el recuento absoluto de linfocitos B de memoria *non-switched* y los linfocitos T CD8⁺ activados, con una sensibilidad del 70,8% y una especificidad del 88,3% para un punto de corte $< 0,7$ (AUC 0,803).

En este estudio se evaluó también la capacidad discriminativa de las subpoblaciones linfocitarias circulantes para discriminar entre SSp seronegativo y síndrome seco no-Sjögren. El cociente entre el porcentaje de linfocitos B de memoria *non-switched* y el de linfocitos T CD4⁺ activados mostró una sensibilidad del 75% y una especificidad del 66% con un punto de corte $< 4,4$ (AUC 0,742). En esta situación el mejor parámetro diagnóstico fue el recuento absoluto de linfocitos T CD4⁺ *naïve*, que mostró una sensibilidad del 76,9% y una especificidad del 88,9% para un punto de corte < 312 células/ μ L (AUC 0,821).

Por último, se hizo un análisis para evaluar la influencia del tratamiento inmunomodulador o inmunosupresor sobre las poblaciones linfocitarias circulantes.

Se observó que los pacientes que estaban recibiendo tratamiento a la inclusión en el estudio presentaban un aumento no significativo del recuento de leucocitos y un aumento significativo en el recuento de linfocitos a expensas de un mayor número absoluto de linfocitos T CD4⁺ (924 vs. 654 células/ μ L; $p=0,023$), pero sin diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ (43,2% vs. 44,4%; $p=0,277$). No hubo otras diferencias estadísticamente significativas relevantes entre el grupo de pacientes con SSp que recibía tratamiento y el que no. Se repitió también el análisis completo excluyendo del grupo de pacientes con SSp los 19 pacientes que estaban recibiendo tratamiento inmunomodulador o inmunosupresor y los resultados fueron prácticamente idénticos a los obtenidos con la cohorte completa salvo por el hecho de que los pacientes con SSp que no recibían tratamiento presentaban un recuento absoluto de leucocitos y de linfocitos significativamente menor que los pacientes con síndrome seco no-Sjögren y los voluntarios sanos.

En el segundo estudio que forma parte de esta tesis doctoral se incluyeron 66 pacientes con SSp, 25 pacientes con síndrome seco no-Sjögren y 23 voluntarios sanos. En este trabajo se estudiaron las concentraciones séricas de las citoquinas BAFF, IL-17 A/F, IL-18, IL-21, IL-22, CXCL13, TNF-R2 y PD-L2 utilizando un kit comercial de inmunoensayo personalizado (ProcartaPlexTM Multiplex Immunoassay, ThermoFisher Scientific). Una vez realizadas las determinaciones analíticas se detectó un problema con la determinación del BAFF en el kit empleado, que se comprobó con la casa comercial, por lo que las determinaciones de BAFF se hicieron finalmente mediante un kit comercial de ELISA (Quantikine, R&D Systems). Se estudió la asociación entre las concentraciones séricas de estas citoquinas y diferentes parámetros de actividad de la enfermedad en pacientes con SSp, incluyendo la puntuación ESSDAI y su dominio biológico, los niveles séricos de β 2MG e IgG y el FR. También se evaluó la relación entre las concentraciones séricas de citoquinas y las diferentes subpoblaciones linfocitarias circulantes. Por último, se analizó el rendimiento diagnóstico de los niveles séricos de estas citoquinas y sus diferentes combinaciones para discriminar entre los pacientes con SSp y aquellos con síndrome seco no-Sjögren. Para el análisis estadístico se utilizaron pruebas no paramétricas (prueba U de Mann-Whitney y prueba de Kruskal-Wallis) y se

evaluaron las correlaciones mediante el coeficiente de correlación de Pearson. La relación entre la concentración de citoquinas y el ESSDAI se evaluó también mediante regresión de Poisson. El rendimiento diagnóstico de las concentraciones de citoquinas séricas fue evaluado mediante el área bajo la curva (AUC) ROC y se escogieron los puntos de corte óptimos basados en la curva ROC utilizando el paquete estadístico Stata 15.1. Para poder evaluar combinaciones de citoquinas que presentaban concentraciones de diferentes órdenes de magnitud se aplicó una transformación logarítmica.

La mediana de edad fue de 64,3 años en los pacientes con SSp y de 67,4 años en el grupo de pacientes con síndrome seco no-Sjögren ($p=0,2671$), mientras que los voluntarios sanos eran más jóvenes, con una mediana de edad de 46,1 años ($p=0,0001$). Casi la totalidad del grupo de pacientes con SSp y de voluntarios sanos eran mujeres (95,5% y 95,7% respectivamente), mientras que todas las pacientes con síndrome seco no-Sjögren eran mujeres. La duración mediana de los síntomas fue de 12 años en los pacientes con SSp y de 10,3 años en los pacientes con síndrome seco no-Sjögren. Entre los pacientes con SSp, 46 (69,7%) presentaban anticuerpos anti-Ro60 y 28 de éstos también anticuerpos anti-La. Ningún paciente presentó anticuerpos anti-La de forma aislada. Los pacientes con SSp presentaban una mediana de 2 [0-4] puntos en el ESSDAI a la inclusión en el estudio y 29 (43,9%) presentaban o habían presentado alguna manifestación extraglandular (artritis en 11, vasculitis cutánea en 7, afectación de SNP en 7, neumopatía intersticial en 6 y afectación renal en 4). En el momento de la inclusión 19 pacientes con SSp (28,8%) recibían algún tratamiento inmunomodulador o inmunosupresor (11 hidroxicloroquina, 12 corticoides, tres metotrexato, uno micofenolato, uno rituximab y uno IGIV).

Los pacientes con síndrome seco no-Sjögren y los voluntarios sanos mostraron diferencias significativas en las concentraciones séricas de BAFF, IL-17 A/F, IL-18, IL-21, IL-22, CXCL13, TNF-R2 y PD-L2, por lo que se unificaron en un único grupo control para realizar las comparaciones con el grupo de pacientes con SSp. Los pacientes con SSp, comparados con el grupo control, mostraron niveles medios más elevados de BAFF (1982,6 vs. 1508,9 pg/mL; $p=0,0037$), CXCL13 (594,8 vs. 346,9 pg/mL; $p=0,0002$) e IL-21 (231,9 vs. 51,4 pg/mL; $p=0,0011$), así

como niveles medios más bajos de PD-L2 (2113,9 vs. 2843,6 pg/mL; $p=0,0071$). Los pacientes con SSp seropositivo, comparados con los seronegativos, mostraron niveles medios más altos de CXCL13 (684,2 vs. 398,0 pg/mL; $p=0,0170$), IL-21 (314,2 vs. 42,5 pg/mL; $p=0,0050$) e IL-22 (100,5 vs. 54,3 pg/mL; $p=0,0116$). En cambio, no hubo diferencias relevantes en la concentración de las diferentes citoquinas entre los pacientes con SSp con y sin manifestaciones extraglandulares. Los pacientes que recibían tratamiento inmunomodulador o inmunosupresor mostraron concentraciones medias más elevadas de CXCL13 (848,8 vs. 492,1 pg/mL; $p=0,0154$) y de IL-21 (497,6 vs. 124,5 pg/mL; $p=0,0677$) que los que no recibían tratamiento activo.

Con respecto a la asociación de las diferentes citoquinas con los marcadores de actividad en los pacientes con SSp, la concentración sérica de CXCL13 se correlacionó con los niveles séricos de β 2MG ($r=0,374$; $p=0,0020$) y con la puntuación ESSDAI ($r=0,329$; $p=0,0071$), especialmente con el dominio biológico del ESSDAI ($r=0,351$; $p=0,0039$). Los niveles séricos de IL-21 se correlacionaron con la VSG ($r=0,390$; $p=0,0016$), los niveles de IgG ($r=0,553$; $p<0,0001$) y con la positividad del FR ($r=0,684$; $p<0,0001$). Las concentraciones séricas de IL-22 fueron las que mostraron una mayor asociación con otros parámetros de actividad, correlacionándose con la VSG ($r=0,474$; $p=0,0001$), los niveles de IgG ($r=0,511$; $p<0,0001$), la positividad del FR ($r=0,385$; $p=0,0018$), la concentración de β 2MG ($r=0,398$; $p=0,0009$) y el dominio biológico del ESSDAI ($r=0,370$; $p=0,0022$).

Al evaluar la asociación entre la concentración sérica de las diferentes citoquinas y la puntuación ESSDAI mediante el modelo de regresión de Poisson, se halló una asociación entre la puntuación ESSDAI y BAFF (OR 1,00020; $p=0,0017$), IL-18 (OR 1,00971; $p=0,0017$) e IL-22 (OR 1,00191; $p=0,0397$). Además, los pacientes con SSp con actividad (definida como ESSDAI>0) presentaron concentraciones séricas medias más elevadas de CXCL13 (696,9 vs. 359,8 pg/mL; $p=0,0091$), IL-21 (311,1 vs. 49,8 pg/mL; $p=0,0461$), IL-22 (98,4 vs. 59,1 pg/mL; $p=0,0464$) y TNF-R2 (278,8 vs. 207,4 pg/mL; $p=0,0164$).

En los pacientes con SSp, las concentraciones séricas de CXCL13 se correlacionaron con las de IL-21 ($r=0,425$; $p=0,0004$) e IL-22 ($r=0,514$; $p<0,0001$) pero no con las de BAFF ($p=0,3252$), mientras que las concentraciones séricas de IL-21 e IL-22 se correlacionaron entre ellas ($r=0,519$; $p<0,0001$).

Con respecto a las poblaciones de linfocitos circulantes, el porcentaje de linfocitos circulantes se correlacionó negativamente con las concentraciones séricas de CXCL13 ($r=-0,424$; $p=0,0004$), IL-17 A/F ($r=-0,396$; $p=0,0011$) e IL-22 ($r=-0,336$; $p=0,0063$). Los niveles séricos de IL-21 mostraron la asociación más fuerte con las subpoblaciones de linfocitos B, con una correlación negativa con los linfocitos B de memoria ($r=-0,344$; $p=0,0062$) y una correlación positiva con los linfocitos B *naïve* ($r=0,379$; $p=0,0024$). El porcentaje de linfocitos T CD4⁺ activados se correlacionó con las concentraciones séricas de IL-22 ($r=0,331$; $p=0,0110$) y TNF-R2 ($r=0,349$; $p=0,0072$).

Por último, se analizó la capacidad de las concentraciones séricas de las distintas citoquinas para discriminar a los pacientes con SSp de los pacientes con síndrome seco no-Sjögren. De forma individual, CXCL13 mostró la mayor capacidad diagnóstica (AUC 0,779) con una sensibilidad del 77,3% y una especificidad del 68% usando un punto de corte $>239,7$ pg/mL. El cociente entre CXCL13 y PD-L2 mostró una especificidad del 84% y una sensibilidad del 72,7% usando un punto de corte $>0,1$ (AUC 0,788) para diferenciar entre SSp y síndrome seco no-Sjögren. Sin embargo, el mejor parámetro diagnóstico fue la combinación de los niveles séricos de CXCL13, BAFF y PD-L2 con transformación logarítmica usando la fórmula $[\ln(\text{CXCL13})+\ln(\text{BAFF})]/\ln(\text{PD-L2})$, que con un punto de corte $>1,7$ mostró una sensibilidad del 77,2% y una especificidad del 86,4% (AUC 0,854).

6. Resumen global de la discusión

El diagnóstico del SSp puede ser difícil en algunos casos, especialmente en aquellos pacientes que presentan manifestaciones extraglandulares sin síntomas de sequedad, en los casos en los que la sequedad es tan leve que el paciente no la refiere, o en los casos de SSp sin anticuerpos específicos (seronegativos)(124). Por otra parte, valorar la actividad de la enfermedad en los pacientes con SSp también puede ser complejo en algunos casos debido a la gran diversidad de manifestaciones glandulares y extraglandulares que presenta esta enfermedad. Por estas razones la identificación y la validación de nuevos biomarcadores que puedan ser útiles para el diagnóstico y el pronóstico en el SSp son objetivos importantes en las líneas de investigación de esta enfermedad(201,229).

En la presente tesis se ha profundizado en la utilidad clínica de las diferentes subpoblaciones linfocitarias circulantes y de algunas citoquinas y quimioquinas como biomarcadores de diagnóstico y de actividad en el SSp.

En el primer estudio de la presente tesis doctoral se analiza si la distribución de las subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica, determinada mediante citometría de flujo, es de utilidad para el diagnóstico del SSp. En este estudio se confirma que el aumento del cociente entre los linfocitos B *naïve* y los linfocitos B de memoria y el aumento de linfocitos T CD4⁺ activados son característicos del SSp, y que el análisis de estas poblaciones permite diferenciar a los pacientes con SSp de los pacientes con síndrome seco no-Sjögren, validando y ampliando la propuesta del grupo francés liderado por Devauchelle-Pensec(199). Además, se constata que las alteraciones en la distribución de los linfocitos B son más marcadas en los pacientes con SSp seropositivos.

En el segundo estudio incluido en esta tesis doctoral se analiza la utilidad de las concentraciones séricas de BAFF, IL-17, IL-18, IL-21, IL-22, CXCL13, TNF-R2 y PD-L2 como biomarcadores diagnósticos y de actividad en el SSp. Como hallazgo más novedoso, se observó que los pacientes con SSp presentaban niveles más bajos de PD-L2 que los controles, lo que podría tener implicaciones patogénicas y ofrecer una nueva diana terapéutica. La combinación de niveles bajos de PD-L2 con niveles elevados de BAFF y CXCL13 permitió discriminar a los pacientes con SSp de los pacientes con síndrome seco no-Sjögren, ofreciendo un biomarcador diagnóstico

potencialmente útil. Por otra parte, fue posible confirmar la utilidad de IL-21, IL-22 y CXCL13 como biomarcadores de actividad en el SSp(166,224,230).

A continuación se discuten de forma más detallada los resultados de los dos estudios, que permiten dar respuesta a los objetivos de investigación planteados en esta tesis.

Estudio 1: Poblaciones linfocitarias circulantes como biomarcadores en el SSp

En este estudio se constata que los pacientes con SSp presentan profundas alteraciones en la distribución de las poblaciones linfocitarias circulantes, especialmente en lo que respecta a los diferentes subconjuntos de linfocitos T CD4⁺ y sobre todo de los linfocitos B, y que dichas alteraciones permiten diferenciar a los pacientes con SSp de los pacientes con síndrome seco no-Sjögren.

Los pacientes con SSp de esta cohorte presentaban recuentos absolutos más bajos de leucocitos y linfocitos que los pacientes con síndrome seco no-Sjögren y los controles sanos, aunque la proporción de linfocitos fue similar en los tres grupos. El menor recuento linfocitario fue debido fundamentalmente a un menor número absoluto de linfocitos T, a expensas principalmente de una disminución de las células T CD4⁺, con un cociente CD4/CD8 disminuido. La disminución de linfocitos CD4⁺ es bien conocida en el SSp y se ha relacionado con un aumento en la apoptosis de los linfocitos CD4⁺ circulantes, así como con una mayor migración de los linfocitos CD4⁺ a las glándulas exocrinas(58,186,187,231–235). En la cohorte de este estudio, la disminución de linfocitos T CD4⁺ fue a expensas de las subpoblaciones de CD4⁺ *naïve* y *central memory*, con un aumento relativo de los linfocitos CD4⁺ *effector memory*. Este hallazgo apoya el incremento de la migración de los CD4⁺ circulantes hacia los sitios de inflamación en el SSp como mecanismo subyacente a la disminución de los linfocitos T CD4⁺ en sangre periférica(46,196). Esta reducción del compartimento T *naïve* también se constató en los linfocitos CD8⁺ de los pacientes con SSp. Con respecto a la polarización de los linfocitos CD4⁺, se halló un aumento en el porcentaje de T_{H1} en los pacientes con SSp respecto a los pacientes con síndrome seco no-Sjögren y los controles sanos, que es acorde con el predominio de la respuesta T_{H1} en la patogenia del SSp(41,44,236). No obstante, en la presente cohorte no se observaron diferencias en la proporción de células T_{H17} en los

pacientes con SSp, hallazgo que contrasta con estudios previos. Esto puede ser debido a las diferencias en la metodología utilizada para identificar las células T_H17, ya que en el presente estudio se identificaron mediante los marcadores CD3⁺/CD4⁺/CXCR3⁻/CCR6⁺, mientras que en otros trabajos se identificó esta subpoblación celular mediante la producción de IL-17, método que permite identificar un mayor número de células T_H17(190,237–239). Por último, en este estudio se encontró un incremento notable en la proporción de linfocitos T activados, tanto CD4⁺ como CD8⁺, lo que coincide con lo descrito previamente por Mingueneu *et al.*(58). En conjunto, las alteraciones observadas en las subpoblaciones de linfocitos T sugieren un aumento de la diferenciación y de la migración a los tejidos inflamados así como una activación sostenida de las células T *naïve* en los pacientes con SSp(44,240).

Cabe destacar que las alteraciones más importantes en la distribución de las poblaciones linfocitarias circulantes observadas en los pacientes con SSp fueron las que afectaban al compartimento de células B. De acuerdo con la literatura, se encontró una menor proporción de linfocitos B de memoria y una mayor proporción de linfocitos B *naïve* en los pacientes con SSp con respecto a los pacientes con síndrome seco no-Sjögren y controles sanos. Esta disminución de los linfocitos B de memoria afectaba tanto a la subpoblación con cambio de isotipo (*switched*) como a la población sin cambio de isotipo (*non-switched*)(57,58,186,193,194,196). Además, el recuento absoluto de linfocitos B *naïve* no difirió entre los grupos, lo que sugiere que la reducción de los linfocitos B de memoria se debe a una disminución real del número absoluto los mismos, mientras que el aumento relativo de linfocitos B *naïve* simplemente refleja la disminución del número de linfocitos B de memoria, tal como sugirieron Roberts *et al.*(193). Se ha propuesto que la disminución de los linfocitos B de memoria en el SSp se debe a la migración de estas células a las glándulas salivales inflamadas, y/o a una diferenciación anormal de los linfocitos B en células plasmáticas con el consiguiente desprendimiento del CD27 de la superficie de los linfocitos B de memoria(57,241,242).

Aunque la utilidad diagnóstica de la distribución de las subpoblaciones de linfocitos B en sangre periférica en pacientes con SSp había sido previamente explorada por otros autores, en la presente tesis doctoral se ha analizado la utilidad

de un inmunofenotipado completo en sangre periférica, tanto de linfocitos B como T, para discriminar entre pacientes con SSp y pacientes con síndrome seco no-Sjögren(198–200). En lo que respecta al compartimento de linfocitos B, se confirmó que el mejor parámetro diagnóstico para diferenciar ambas entidades era el cociente entre el porcentaje de linfocitos B *naïve* y el de linfocitos B de memoria *non-switched* (B_{NSM}), que mostraba una precisión diagnóstica superior a la que había publicado recientemente Barcelos *et al.*, aunque ligeramente inferior a la relación análoga $(Bm2 + Bm2')/(eBm5 + Bm5)$ descrita anteriormente por Cornec *et al.* y Binard *et al.*(198–200). Sin embargo, el cociente entre los porcentajes de B_{NSM} y linfocitos T $CD4^+$ activados ($B_{NSM}/CD4_{ACT}$) fue el parámetro que mostró una mejor precisión diagnóstica para distinguir a los pacientes con SSp de los pacientes con síndrome seco no-Sjögren, mejor que las distintas relaciones entre subpoblaciones de linfocitos B. El cociente $B_{NSM}/CD4_{ACT}$ permitió incluso discriminar entre pacientes con SSp seronegativo y pacientes con síndrome seco no-Sjögren. Ciertamente, el hecho de utilizar un cociente que combina tanto subpoblaciones de linfocitos B como T mejora la rentabilidad diagnóstica en el caso de los pacientes con SSp seronegativo, ya que las subpoblaciones de linfocitos B están mucho más alteradas en los pacientes seropositivos y son más similares a la normalidad en los seronegativos, mientras que las alteraciones en los linfocitos T (especialmente la disminución de los recuentos de linfocitos T *naïve* y el incremento de linfocitos T activados, tanto $CD4^+$ como $CD8^+$) siguen siendo muy marcadas en los pacientes con SSp seronegativo. Estos resultados sugieren que el inmunofenotipo linfocitario en sangre periférica puede ser de utilidad diagnóstica en pacientes con sospecha de SSp en los que los anticuerpos anti-Ro/SSA y anti-La/SSA son negativos, y en los que la BGS_m no resulta diagnóstica, no es factible o es rechazada por el paciente. Aunque Minguenau *et al.* ya habían sugerido la posible utilidad diagnóstica del inmunofenotipo linfocitario completo en sangre periférica, ningún estudio había analizado en profundidad la precisión diagnóstica de la distribución de las subpoblaciones de linfocitos T y B para diferenciar entre SSp y síndrome seco no-Sjögren previamente a la publicación de este estudio incluido en la presente tesis doctoral(58,243).

Este estudio tiene algunas limitaciones que es necesario mencionar. En primer lugar, el número de pacientes incluidos es pequeño y por tanto los resultados deberán ser validados en otras cohortes con un mayor número de sujetos. No obstante, la cohorte de este estudio estaba compuesta por un grupo bien definido de pacientes con SSp con un seguimiento prospectivo prolongado, y por un grupo de pacientes con síndrome seco no-Sjögren de larga evolución que no cumplieron criterios clasificatorios de SSp durante un seguimiento prolongado, descartándose por tanto la posibilidad de que estos pacientes presenten en realidad un SSp en una fase precoz de la enfermedad. En segundo lugar, la inclusión de pacientes bajo tratamientos inmunomoduladores o inmunosupresores podría haber influido en la distribución de las subpoblaciones linfocitarias circulantes. Sin embargo, los resultados obtenidos sugieren que aunque el tratamiento activo puede aumentar el número absoluto de linfocitos circulantes, no afecta de forma significativa a los recuentos relativos de linfocitos, ya que el inmunofenotipo linfocitario en sangre periférica fue similar en los pacientes con SSp que estaban recibiendo tratamiento y en los que no. Por ello, se decidió incluir en el presente estudio tanto a los pacientes tratados como a los no tratados, para evitar el sesgo de selección derivado de excluir a los pacientes tratados, que son los que presentan una enfermedad más grave. Por último, cabe destacar que la mayoría de los pacientes con SSp presentaban una enfermedad de larga duración y que la distribución de las subpoblaciones linfocitarias circulantes podría ser diferente en las etapas iniciales y en las avanzadas de la enfermedad, de forma similar a lo que se ha descrito recientemente en los pacientes con LES(244). Por tanto, será necesario validar los resultados de este trabajo en otras cohortes que incluyan pacientes con SSp de diagnóstico reciente.

La principal fortaleza del presente estudio es la utilización de un inmunofenotipado por citometría de flujo estandarizado y aceptado internacionalmente, que permite una identificación fiable y reproducible de las diferentes subpoblaciones de linfocitos(182). Esta metodología diferencia el presente trabajo de estudios previos que habían utilizado el sistema de clasificación de las células B maduras Bm1-Bm5, propuesto inicialmente para los linfocitos B de los órganos linfoides secundarios y que se basa fundamentalmente en los marcadores de superficie IgD y CD38, pero que no tiene en cuenta el CD27, que es el marcador

fundamental de las células B de memoria circulantes(194,245,246). Por otra parte, el seguimiento prospectivo prolongado de todos los pacientes con SSp y síndrome seco no-Sjögren en un hospital universitario con amplia experiencia en SSp permite una clara diferenciación entre ambos grupos de pacientes(22).

A modo de conclusión, en este estudio se confirma que los pacientes con SSp presentan un desequilibrio muy importante en la distribución de las subpoblaciones de linfocitos tanto T como B, con una disminución de los linfocitos T CD4⁺ y de los linfocitos B de memoria, y un incremento de los linfocitos T activados y de los linfocitos B *naïve*. Estas alteraciones permiten de hecho discriminar entre los pacientes con SSp y aquellos con síndrome seco no-Sjögren, utilizando el cociente entre los porcentajes de linfocitos B de memoria *non-switched* y linfocitos T CD4⁺ activados, que presenta una buena sensibilidad para detectar a los pacientes que realmente presentan SSp, incluso en el caso de pacientes seronegativos.

Estudio 2: Citoquinas y quimioquinas séricas como biomarcadores en el SSp

En este segundo estudio que conforma la presente tesis doctoral, se evalúa la utilidad de los niveles séricos de BAFF, IL-17, IL-18, IL-21, IL-22, CXCL13, TNF-R2 y PD-L2 como biomarcadores diagnósticos y de actividad de la enfermedad en el SSp. Se decidió analizar la utilidad de las citoquinas BAFF, IL-17, IL-18, IL-21, IL-22 y de la quimioquina CXCL13 porque ya habían sido estudiadas en mayor o menor medida en pacientes con SSp (Tabla 1.6). En cambio, TNF-R2 y PD-L2 se añadieron al proyecto en base a un trabajo publicado en 2016 por Nishikawa *et al.*, que utilizando un análisis proteómico de alto rendimiento para identificar proteínas con diferente expresión entre pacientes con SSp y controles sanos, identificaron cinco proteínas (CD48, CXCL13, TNF-R2, BAFF y PD-L2) que se correlacionaban con las puntuaciones ESSDAI en pacientes con SSp(207).

En el presente estudio fue posible confirmar que los niveles de BAFF, CXCL13, IL-21 y PD-L2 eran diferentes entre los pacientes con SSp y el grupo control (formado por pacientes con síndrome seco no-Sjögren y voluntarios sanos) y que los niveles séricos de BAFF, CXCL13, IL-21 y IL-22 se relacionaban con la actividad de la enfermedad en los pacientes con SSp. Sin embargo, los niveles séricos de CXCL13 y BAFF se asociaron de forma más débil con la puntuación

ESSDAI en el momento de la inclusión que en publicaciones previas. Esta discrepancia se debe probablemente a que las características de nuestra cohorte son diferentes a las de estudios previos, pues los pacientes de esta cohorte presentaban una enfermedad de larga duración (mediana de 12 [8-16] años, media de 13,2 (DE 7,2) años) y poca actividad (mediana de puntuación ESSDAI de 2 [0-2]), con solo un 13,6% de los pacientes con actividad moderada o alta (ESSDAI \geq 5). En este sentido, es posible argumentar que la puntuación ESSDAI no refleja adecuadamente la actividad de la enfermedad en sus etapas avanzadas, cuando la mayoría de las manifestaciones clínicas son de larga duración, ya que según este sistema de puntuación las manifestaciones clínicas “estables durante al menos 12 meses” puntúan como cero, hecho que puede subestimar la actividad de la enfermedad.

El factor de activación de células B (BAFF), también conocido como estimulador de linfocitos B (BLyS), fue una de las primeras citocinas relacionadas con la actividad en pacientes con SSp. En 2013, Quartuccio *et al.* hallaron una correlación importante entre la puntuación ESSDAI y los niveles séricos de BAFF(210). En contraste con la cohorte de nuestro estudio, la cohorte de Quartuccio *et al.* estaba compuesta por pacientes más jóvenes (edad media de 49,7 (DE 14,1) años) y con más actividad de la enfermedad (puntuación mediana de ESSDAI de 10). Más recientemente, James *et al.* también describieron una correlación entre el ESSDAI y los niveles séricos de BAFF en la cohorte más amplia publicada a este respecto(209). De forma similar al estudio de Quartuccio *et al.*, su cohorte incluía pacientes con una menor duración de la enfermedad (media de 7 (DE 6,1) años vs. 13,2 (DE 7,2) años) y una mayor puntuación ESSDAI (mediana de ESSDAI de 4 [1-7] vs. 2 [0-2]) que los de nuestra cohorte. En conjunto, los hallazgos de estos autores en contraste con los de nuestro estudio sugieren que BAFF puede ser un biomarcador más preciso para identificar pacientes con alta actividad en las primeras etapas de la enfermedad.

La quimioquina 13 con motivo CXC (CXCL13), también conocida como quimioatrayente de linfocitos B (BLC) o quimiocina 1 atrayente de células B (BCA-1), es una quimioquina homeostática que regula el tráfico de células B y desempeña un papel clave en la organización de las estructuras linfoides, así como en la formación de centros germinales ectópicos en los pacientes con SSp(247,248). El

grupo de Nocturne *et al.* fue el primero en describir la asociación entre CXCL13 y la actividad de la enfermedad en pacientes con SSp, una observación confirmada posteriormente por Nishikawa *et al.*(166,207). En nuestro estudio pudimos corroborar también la correlación existente entre la puntuación ESSDAI y los niveles séricos de CXCL13 a pesar de que los pacientes de nuestra cohorte presentaban una mayor duración de la enfermedad con respecto a las cohortes de Nocturne *et al.* (mediana de 5 años) y de Nishikawa *et al.* (media de 4,7 (DE 6,6) años en la cohorte de derivación y 3,5 (DE 5,8) años en la cohorte de validación) y una menor proporción de nuestros pacientes presentaba actividad moderada o alta (ESSDAI \geq 5) con respecto a la cohorte de Nocturne *et al.* (13,6% vs. 39,3%). Además, en nuestro estudio, los niveles de CXCL13 se correlacionaron también con otros marcadores subrogados de actividad de las células B, tales como los anticuerpos anti-Ro60, los niveles de β 2MG y la linfopenia, y de forma llamativa con la enfermedad pulmonar intersticial, validando los hallazgos de Nishikawa *et al.*(207). Este hallazgo podría ser de interés en pacientes con neumopatía intersticial de etiología no filiada, ya que en ocasiones puede ser la forma de presentación del SSp en pacientes que no presentan síntomas de sequedad(249). Es especialmente relevante que los niveles séricos de CXCL13 se han asociado recientemente con el desarrollo de linfoma, pero en nuestro estudio la existencia de linfoma previo o concomitante era un criterio de exclusión y ninguno de los pacientes incluidos desarrolló un linfoma durante el seguimiento posterior hasta marzo de 2021. Sin embargo, tres pacientes con SSp que no fueron incluidos en el estudio por presentar linfoma previo, presentaban niveles séricos elevados de CXCL13 (606 pg/mL en una paciente con linfoma de Hodgkin, 1082 pg/mL en una paciente con linfoma MALT parotídeo y 317,5 pg/mL en una paciente con LBDCG) a pesar de estar en remisión completa, en línea con los resultados publicados por Traiano *et al.*(215). Por último, CXCL13 se ha relacionado con el reclutamiento de linfocitos B de memoria circulantes en las glándulas salivales, pero en nuestro estudio no se encontró ninguna asociación entre las subpoblaciones de linfocitos B circulantes y los niveles séricos de CXCL13(52).

La IL-21 es una citoquina pleiotrópica que pertenece a la familia de citoquinas dependientes de la cadena γ del receptor común de citoquinas(250). Es producida principalmente por los linfocitos T colaboradores foliculares T (T_{FH}) y una de sus

funciones es dirigir la activación de las células B y su diferenciación a células plasmáticas(251,252). En el SSp, la IL-21 se ha relacionado con la proliferación de linfocitos T CD8⁺ *naïve* y de memoria, con la activación, proliferación y supervivencia de linfocitos T CD4⁺, y con la presencia de hipergammaglobulinemia(222). En la presente tesis doctoral se ha podido confirmar que los niveles séricos de IL-21 se asocian con la relación *naïve*/memoria alterada de las células B que es característica del SSp, así como con marcadores subrogados de activación de célula B como pueden ser los niveles séricos de IgG o el dominio biológico del ESSDAI. Estos hallazgos apoyan el papel clave de la IL-21 producida en los centros germinales de las glándulas inflamadas de los pacientes con SSp en el reclutamiento de linfocitos B de memoria circulantes.

La IL-22 es una citoquina que pertenece a la familia de la IL-10, y se sabe que regula la homeostasis de las mucosas y promueve la reparación epitelial después de un daño tisular(253). Es producida por células linfoides innatas, linfocitos T y células epiteliales ductales y se ha observado que se encuentra sobreexpresada en las glándulas salivales de los pacientes con SSp, donde tiene un papel clave en el reclutamiento de células B y la formación de centros germinales ectópicos(54,254). Se ha demostrado que la IL-22 está involucrada en la producción de quimioquinas linfoides como CXCL13 en los centros germinales, que a su vez orquestan la organización de células B, la formación de agregados linfocitarios y la producción de autoanticuerpos(54). Cabe destacar que la IL-22 sérica se ha relacionado con los anticuerpos anti-Ro/SSA y anti-La/SSB, con la hipergammaglobulinemia y el FR en pacientes con SSp(224). En el presente estudio, la IL-22 se relacionó también con la presencia de linfopenia, con un incremento de linfocitos T CD4⁺ activados circulantes y con puntuaciones ESSDAI más altas, así como con los niveles séricos de CXCL13, lo que apoya el papel fundamental de la IL-22 en la generación de los centros germinales ectópicos.

La proteína de muerte celular programada 1, conocida simplemente como PD-1 (*Programmed Death 1*) es un receptor que pertenece a la familia CD28/CTLA-4 y en conjunto con sus dos ligandos (PD-L1 y PD-L2) son factores clave en la señalización inhibitoria de las células T, mediando los mecanismos de tolerancia y autoinmunidad(255). El PD-L1 se ha investigado ampliamente en los últimos años,

pero la función del PD-L2 sigue sin estar clara, aunque se ha propuesto que PD-L2 tiene un papel dominante en las respuestas mucosas frente a antígenos ambientales promoviendo la tolerancia(256,257). En el ámbito de las enfermedades autoinmunes sistémicas hay publicaciones recientes y contradictorias en pacientes con LES, ya que mientras Tong *et al.* encontraron niveles séricos más bajos de PD-L2 en los pacientes con LES que en los sujetos sanos, Hirahara *et al.* encontraron niveles séricos más elevados, aunque en ambos estudios se halló una correlación positiva con los niveles de complemento(258,259). En la esclerosis sistémica se ha descrito que los niveles séricos de PD-L2 se encuentran aumentados y que se asocian a la extensión de la fibrosis cutánea y a algunas características clínicas e inmunológicas(260). En el SSp, Nishikawa *et al.* propusieron en 2016 la utilidad de PD-L2 como biomarcador de actividad(207). En la presente tesis doctoral se ha observado que los pacientes con SSp presentan niveles séricos más bajos de PD-L2 que los controles, pero no se halló asociación con la actividad de la enfermedad, resultados en la línea del estudio de Tong *et al.* en el LES(258). El hallazgo de niveles disminuidos de PD-L2 en los pacientes con pSS es el más novedoso del presente estudio, ya que es la primera vez que se describe en la literatura, pero a la vista de los resultados contradictorios en los pacientes con LES, y con lo publicado por Nishikawa *et al.*, deberá confirmarse en otras cohortes(207,258,259). Dado que los ratones *knockout* PD-L2 (PD-L2^{-/-}) presentan una abolición de la tolerancia a antígenos orales y una hiperreactividad bronquial exacerbada ante la provocación con antígenos respiratorios, es posible especular que niveles bajos de PD-L2 soluble puedan estar relacionados de alguna manera con el desarrollo o el mantenimiento de la respuesta autoinmune en las glándulas salivales de los pacientes con SSp(261,262). Por otra parte, Liang *et al.* demostraron que los ratones PD-L2^{-/-} presentan una mayor susceptibilidad frente a la infección por *Leishmania mexicana*, en comparación con los ratones normales y los ratones PD-L1^{-/-}; estos autores proponen como mecanismo subyacente una producción exagerada de IgM e IgG2 específicas contra antígenos de *Leishmania* que suprimiría la respuesta inflamatoria normal. Los hallazgos del estudio de Liang *et al.* sugieren por tanto que PD-L2 participa en la regulación de las respuestas inmunes humorales mediando la

activación de los linfocitos B, por lo que es posible que las alteraciones de la vía PD-1/PD-L1 y PD-1/PD-L2 estén implicadas en la patogenia del SSp(263).

Con respecto a la utilidad diagnóstica de las citoquinas analizadas en el presente estudio, se halló que el cociente entre la suma de las concentraciones séricas de BAFF y CXCL13 y los niveles séricos de PD-L2 permite identificar a los pacientes con SSp con una buena especificidad, incluso si se trata de pacientes con SSp seronegativo.

Este estudio presenta varias limitaciones que hay que señalar. En primer lugar, el número de pacientes y de controles incluidos es pequeño, a pesar de ser mayor que en otras publicaciones anteriores. En segundo lugar, los pacientes con SSp incluidos en este estudio presentaban una enfermedad de larga duración, y es posible que las citoquinas y quimioquinas analizadas tengan un comportamiento dinámico en los pacientes con SSp y presenten concentraciones séricas diferentes en los pacientes con estadios iniciales o más tempranos de la enfermedad, que son los que habitualmente se han incluido en las cohortes publicadas hasta el momento. Asimismo, cabe la posibilidad de que distintos biomarcadores séricos puedan ser útiles para diferentes dominios de actividad de la enfermedad, y que por tanto los resultados de distintas cohortes sean diferentes en función de las manifestaciones extraglandulares que presenten los pacientes(209). Por último, es posible que el ESSDAI pueda ser menos preciso para evaluar la actividad de la enfermedad en pacientes con enfermedad de larga duración, ya que las manifestaciones clínicas persistentes pero estables más de 12 meses se puntúan como cero, lo que puede subestimar la actividad de la enfermedad en algunos casos.

A pesar de estas limitaciones, hay que señalar que tanto los pacientes con SSp como los pacientes con síndrome seco no-Sjögren incluidos en la cohorte del estudio son pacientes con un seguimiento prospectivo muy prolongado (más de 10 años en la mayoría de los casos) en una unidad de referencia de un hospital universitario con experiencia en SSp, por lo que la validez de los biomarcadores diagnósticos propuestos es muy sólida.

En resumen, en base a este estudio se puede afirmar que CXCL13, BAFF, IL-21 y especialmente IL-22 son biomarcadores séricos de actividad útiles en pacientes con SSp, ya que se correlacionan con marcadores subrogados de actividad de las

células B y/o con la puntuación ESSDAI. Además, CXCL13, IL-21 e IL-22 podrían ser indicadores más precisos de la actividad de la enfermedad que el BAFF sérico en pacientes con SSp de larga duración. Asimismo, los niveles séricos de IL-21 se relacionan con el cociente de células B *naïve*/memoria que se halla característicamente aumentado en el SSp, y los niveles séricos de IL-22 se asocian con el aumento de células T CD4⁺ activadas en sangre periférica. Por último, los niveles séricos de PD-L2 están disminuidos en los pacientes con SSp y la relación entre los niveles séricos de CXCL13, BAFF y PD-L2 permite discriminar a los pacientes con SSp de los que presentan síndrome seco no-Sjögren. En cualquier caso, son precisos nuevos estudios para confirmar estos hallazgos y aclarar el papel de PD-L2 en el SSp, así como la potencial utilidad de las terapias dirigidas a las vías de CXCL13 y PD-1.

Aportación a la práctica clínica

En conjunto, los resultados de los estudios incluidos en la presente tesis doctoral abren la puerta a la utilización del inmunofenotipo linfocitario en sangre periférica y de la determinación de citoquinas séricas con fines diagnósticos en pacientes con sospecha de SSp que no puede ser confirmada de otra forma, bien por ser pacientes sin anticuerpos anti-Ro/SSA ni anti-La/SSB, bien por no ser diagnóstica o factible la BGSm o bien porque no presentan ningún síntoma de sequedad.

En los últimos años se ha planteado la existencia de pacientes con un SSp extraglandular “puro” (también llamado SSp “oculto”) que no presentarían afectación glandular significativa, de forma análoga a lo que ocurre en la ES en los pacientes sin afectación cutánea (forma *sine* esclerodermia), o en la arteritis de células gigantes en pacientes con afectación exclusiva de grandes vasos (formas extracraneales)(124,264,265). Algunos ejemplos análogos en el SSp podrían ser determinados pacientes con enfermedad pulmonar intersticial que no cumplen criterios clasificatorios de ninguna enfermedad autoinmune sistémica, o pacientes con polineuropatía sensitiva que no presentan síntomas de sequedad de mucosas pero que pueden realmente presentar una forma sistémica de SSp. De hecho, en los últimos años se ha dedicado una atención especial a los pacientes con SSp con

neumopatía intersticial, ya que se ha descrito que hasta en un 20% de estos pacientes el diagnóstico de la enfermedad pulmonar intersticial precede al diagnóstico de SSp. En este sentido, Manfredi *et al.* describieron una serie de 13 pacientes en los que se diagnosticó un SSp a raíz de una neumopatía intersticial, y en 6 de estos 13 pacientes no había síntomas de sequedad en la evaluación inicial y no presentan anticuerpos anti-Ro/SSA ni anti-La/SSB, por lo que fueron clasificados como enfermedad intersticial pulmonar difusa de etiología idiopática, hasta que acabaron presentando manifestaciones clínicas sugestivas de SSp tiempo después, lo que conllevó una demora diagnóstica mediana de 16 meses(249). Las neuropatías periféricas asociadas al SSp también pueden preceder a las manifestaciones glandulares del SSp o incluso presentarse en pacientes que nunca llegan a desarrollar síntomas de sequedad, por lo que en pacientes seronegativos puede ser difícil llegar a un diagnóstico si no se recurre a la BGSm(266). Por ello, es esencial disponer de herramientas diagnósticas que permitan identificar a los pacientes con alguna manifestación extraglandular sugestiva de SSp pero que no presentan síntomas de sequedad ni anticuerpos específico y que en cambio pueden presentar un SSp. Así, se podría plantear la realización de una BGSm en los pacientes con algún biomarcador sérico de SSp, ya que practicar una BGSm a todos los pacientes con alguna manifestación extraglandular sugestiva de SSp pero sin otros datos clínicos ni serológicos sugestivos no parece una estrategia aceptable. Los hallazgos de la presente tesis apoyan la utilización del análisis de subpoblaciones de linfocitos T y B en sangre periférica y de los niveles séricos de CXCL13, BAFF y PD-L2 con fines diagnósticos en aquellos casos en los que se plantea la posibilidad de un SSp pero en los que no se puede alcanzar el diagnóstico con las pruebas complementarias convencionales (autoanticuerpos específicos, test de sequedad ocular y oral objetivos, BGSm).

7. Conclusiones

- 1) El cociente entre el porcentaje de linfocitos B de memoria sin cambio de isotipo (*non-switched*) y el de linfocitos T CD4⁺ activados permite diferenciar a los pacientes con síndrome de Sjögren primario de los pacientes con síndrome seco no-Sjögren
- 2) La relación entre los niveles séricos de BAFF y CXCL13 y los de PD-L2 permite discriminar entre los pacientes con síndrome de Sjögren primario y los pacientes con síndrome seco no-Sjögren.
- 3) Los pacientes con síndrome de Sjögren primario con actividad sistémica (ESSDAI>0) presentan niveles séricos más elevados de CXCL13, IL-21, IL-22 y TNF-R2, aunque no hay una correlación lineal entre estos biomarcadores y el ESSDAI.
- 4) La IL-21 y la IL-22 se asocian con la alteración de la relación *naïve*/memoria de las células B y con el incremento de linfocitos T CD4⁺ activados respectivamente, y ambas se correlacionan con la VSG, el factor reumatoide y los niveles séricos de IgG en los pacientes con síndrome de Sjögren primario.

8. Líneas de futuro

Los biomarcadores diagnósticos propuestos en los estudios realizados en el seno de la presente tesis doctoral necesitan en primer lugar ser validados en otras cohortes diferentes de pacientes con SSp y deberán validarse también no solo frente a controles sanos y pacientes con síndrome seco no-Sjögren, sino también frente a pacientes con otras conectivopatías, especialmente LES y ES. En cualquier caso, disponer de biomarcadores séricos que sugieran el diagnóstico de SSp puede ser muy útil en determinadas patologías y será interesante estudiar estos biomarcadores en cohortes de pacientes con neumonía intersticial con rasgos autoinmunes (IPAF).

Con respecto al inmunofenotipo linfocitario, en los últimos años se han publicado algunos estudios sobre el papel de los linfocitos T_{FH} en el SSp(267). El grupo de Fonseca *et al.* propuso la utilidad diagnóstica del cociente entre las células T foliculares reguladoras y las T_{FH} para identificar a los pacientes con SSp y la utilidad como biomarcador de actividad de las células T_{FH} activadas ($PD-1^+ICOS^+$), que se correlacionarían con el ESSDAI(268). Por tanto, los futuros estudios sobre la utilidad del inmunofenotipo linfocitario circulante como biomarcador en SSp deberán incluir también estas subpoblaciones.

En el presente trabajo no se estudió la relación entre las poblaciones linfocitarias circulantes y las tisulares debido a que la mayoría de las biopsias disponibles estaban realizadas varios años antes del presente proyecto. Este problema es habitual en otras cohortes y es imprescindible diseñar un estudio en pacientes con SSp incidente, de tal forma que se analicen las BGSm y las subpoblaciones linfocitarias circulantes obtenidas de forma próxima en el tiempo, para conocer si realmente la distribución de los linfocitos en sangre periférica refleja lo que está ocurriendo en los tejidos inflamados.

Por otra parte en la cohorte de pacientes estudiada en esta tesis doctoral no hubo casos incidentes de linfoma, aunque el seguimiento prospectivo de los pacientes continúa y es posible que en el futuro se pueda extraer nueva información de interés pronóstico de las determinaciones realizadas en estos pacientes. En cualquier caso, será necesario estudiar cohortes más numerosas y con un mayor seguimiento prospectivo para determinar si las alteraciones en el inmunofenotipo linfocitario circulante se asocian al riesgo de desarrollo de linfoma y para confirmar

los hallazgos del grupo de Nocturne, que en 2015 publicaron una asociación entre los niveles séricos de CXCL13 y desarrollo de linfoma(166).

Por último, los hallazgos con respecto a los niveles disminuidos de PD-L2 deben ser confirmados en nuevos estudios, debido a que los resultados son discordantes con los de Nishikawa *et al.*, que son los únicos autores que han estudiado los niveles de PD-L2 en el SSp(207). Además, en base a los hallazgos de nuestro trabajo parece necesario llevar a cabo un nuevo estudio en el que se analicen todos los componentes de la vía de PD-1, incluyendo tanto PD-1, como PD-L1 y PD-L2, para analizar las relaciones entre ellos, con otras citoquinas, con las poblaciones linfocitarias y con los hallazgos histológicos de las BGSm, idealmente obtenidas de forma simultánea en el tiempo con la sangre periférica. Si se confirma que la actividad de PD-L2 está disminuida en el SSp esto podría abrir la puerta a utilizar la vía PD-1 como una diana terapéutica en esta enfermedad.

9. Bibliografía

1. Sjögren H. Zur Kenntnis der Keratoconjunctivitis sicca : (Keratitis filiformis bei Hypofunktion der Tränendrüsen). *Acta Ophthalmol.* 1933;(Suppl. II):1–151.
2. Hadden WB. On “dry mouth”, or suppression of the salivary and buccal secretions. *Trans Clin Soc London.* 1888;21:176–9.
3. Gouguerot H. Insuffisance progressive et atrophie des glandes salivaires et muqueuses de la bouche, des conjonctives (et parfois des muqueuses nasale, laryngée, vulvaire), sécheresse de la bouche, des conjonctives, etc. *Bull médical.* 1926;40:360–8.
4. Sjögren H. Keratoconjunctivitis sicca. *Hygiea.* 1930;92:829.
5. Murube J. The first definition of Sjögren’s syndrome. Vol. 8, *Ocular Surface.* Elsevier; 2010. p. 101–10.
6. Jonsson R. The 100-year anniversary of Henrik Sjogren. In: *Scandinavian Journal of Rheumatology.* Taylor & Francis; 1999. p. 385.
7. von Grösz S. Aetiologie und Therapie der Keratoconjunctivitis sicca [Etiology and therapy of the Keratoconjunctivitis sicca]. *Klin Monatsbl Augenheilkd.* 1936;97:472–85.
8. Weber FP, Schüter A. Parotisschwellung, Xerostomie und Sjögren’s Syndrom. *Deutsch Arch klin Med.* 1937;180:333–40.
9. De Roeth A. Hypofunction of the lacrimal gland and the Sjögren syndrome. *Lancet.* 1945;65:423–5.
10. Knapp A. A New Conception of Keratoconjunctivitis Sicca. *Arch Ophthalmol.* 1944;31(4):357–8.
11. Jones BR. Lacrimal and Salivary Precipitating Antibodies in Sjögren’s Syndrome. *Lancet.* 1958 Oct 11;272(7050):773–6.
12. Bunim JJ. A Broader Spectrum of Sjogren’s Syndrome and Its Pathogenetic Implications. *Ann Rheum Dis.* 1961 Mar 1;20(1):1–10.
13. Bloch KJ, Buchanan WW, Wohl MJ, Bunim JJ. Sjögren’s syndrome: A clinical, pathological, and serological study of sixty-two cases. *Med (United States).* 1965 May;44(3):187–231.
14. Beck JS, Anderson JR, Bloch KJ, Buchanan WW, Bunim JJ. Antinuclear and Precipitating Auto-antibodies in Sjogren’s Syndrome. *Ann Rheum Dis.* 1965

- Jan 1;24(1):16–22.
15. Alspaugh MA, Tan EM. Antibodies to cellular antigens in Sjogren's syndrome. *J Clin Invest.* 1975 May 1;55(5):1067–73.
 16. Strand V, Talal N. Advances in the diagnosis and concept of Sjogren's syndrome (autoimmune exocrinopathy). Vol. 30, *Bulletin on the Rheumatic Diseases.* 1979. p. 1046–52.
 17. Kassan SS, Thomas TL, Moutsopoulos HM, Hoover R, Kimberly RP, Budman DR, et al. Increased risk of lymphoma in sicca syndrome. *Ann Intern Med.* 1978;89(6):888–92.
 18. Moutsopoulos HM. Sjogren's syndrome: Autoimmune epithelitis. In: *Clinical Immunology and Immunopathology.* Academic Press Inc.; 1994. p. 162–5.
 19. Moutsopoulos HM, Chused TM, Mann DL. Sjogren's syndrome (Sicca syndrome): Current issues. *Ann Intern Med.* 1980;92(2 I):212–26.
 20. Amador-Patarroyo MJ, Arbelaez JG, Mantilla RD, Rodriguez-Rodriguez A, Cárdenas-Roldán J, Pineda-Tamayo R, et al. Sjögren's syndrome at the crossroad of polyautoimmunity. *J Autoimmun.* 2012 Sep;39(3):199–205.
 21. Kollert F, Fisher BA, Fisher BA. Equal rights in autoimmunity: Is Sjögren's syndrome ever “secondary”? *Rheumatol (United Kingdom).* 2020;59(6):1218–25.
 22. Ramos-Casals M, Solans R, Rosas J, Camps MT, Gil A, Del Pino-Montes J, et al. Primary Sjögren syndrome in Spain: Clinical and immunologic expression in 1010 patients. *Medicine (Baltimore).* 2008;87(4):210–9.
 23. Qin B, Wang J, Yang Z, Yang M, Ma N, Huang F, et al. Epidemiology of primary Sjögren's syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Ann Rheum Dis.* 2015 Nov 1;74(11):1983–9.
 24. Alamanos Y, Tsifetaki N, Voulgari P V., Venetsanopoulou AI, Siozos C, Drosos AA. Epidemiology of primary Sjögren's syndrome in north-west Greece, 1982-2003. *Rheumatology.* 2006 Feb 1;45(2):187–91.
 25. Gøransson LG, Haldorsen K, Brun JG, Harboe E, Jonsson M V., Skarstein K, et al. The point prevalence of clinically relevant primary Sjögren's syndrome in two Norwegian counties. *Scand J Rheumatol.* 2011 May;40(3):221–4.
 26. Maldini C, Seror R, Fain O, Dhote R, Amoura Z, De Bandt M, et al.

- Epidemiology of primary Sjögren's syndrome in a french multiracial/multiethnic area. *Arthritis Care Res.* 2014 Mar;66(3):454–63.
27. Cornec D, Chiche L. Is primary Sjögren's syndrome an orphan disease? A critical appraisal of prevalence studies in Europe. Vol. 74, *Annals of the Rheumatic Diseases*. BMJ Publishing Group Ltd; 2015. p. e25.
 28. Sisó-Almirall A, Kostov B, Martínez-Carbonell E, Brito-Zerón P, Ramirez PB, Acar-Denizli N, et al. The prevalence of 78 autoimmune diseases in Catalonia (MASCAT-PADRIS Big Data Project). Vol. 19, *Autoimmunity Reviews*. *Autoimmun Rev*; 2020.
 29. Nocturne G, Mariette X. Advances in understanding the pathogenesis of primary Sjögren's syndrome. *Nat Rev Rheumatol.* 2013;9(9):544–56.
 30. Björk A, Mofors J, Wahren-Herlenius M. Environmental factors in the pathogenesis of primary Sjögren's syndrome. *J Intern Med.* 2020;287(5):475–92.
 31. Shimizu T, Nakamura H, Takatani A, Umeda M, Horai Y, Kurushima S, et al. Activation of Toll-like receptor 7 signaling in labial salivary glands of primary Sjögren's syndrome patients. *Clin Exp Immunol.* 2019 Apr 28;196(1):39–51.
 32. Bodewes ILA, Björk A, Versnel MA, Wahren-Herlenius M. Innate immunity and interferons in the pathogenesis of Sjögren's syndrome. *Rheumatol (United Kingdom).* 2021 Jun 1;60(6):2561–73.
 33. Imgenberg-Kreuz J, Rasmussen A, Sivils K, Nordmark G. Genetics and epigenetics in primary Sjögren's syndrome. *Rheumatol (United Kingdom).* 2021;60(5):2085–98.
 34. Pontarini E, Lucchesi D, Bombardieri M. Current views on the pathogenesis of Sjögren's syndrome. *Curr Opin Rheumatol.* 2018;30(2):215–21.
 35. McCoy SS, Sampene E, Baer AN. Association of Sjögren's Syndrome With Reduced Lifetime Sex Hormone Exposure: A Case–Control Study. *Arthritis Care Res.* 2020 Sep 1;72(9):1315–22.
 36. Harris VM, Sharma R, Cavett J, Kurien BT, Liu K, Koelsch KA, et al. Klinefelter's syndrome (47,XXY) is in excess among men with Sjögren's syndrome. *Clin Immunol.* 2016 Jul 1;168:25–9.
 37. Morthen MK, Tellefsen S, Richards SM, Lieberman SM, Darabad RR, Kam

- WR, et al. Testosterone influence on gene expression in lacrimal glands of mouse models of sjögren syndrome. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2019 May 1;60(6):2181–97.
38. Ishimaru N, Arakaki R, Watanabe M, Kobayashi M, Miyazaki K, Hayashi Y. Development of autoimmune exocrinopathy resembling Sjögren’s syndrome in estrogen-deficient mice of healthy background. *Am J Pathol*. 2003 Oct 1;163(4):1481–90.
39. Guidelli GM, Martellucci I, Galeazzi M, Francini G, Fioravanti A. Sjögren’s syndrome and aromatase inhibitors treatment: Is there a link? *Clin Exp Rheumatol*. 2013;31(4):653–4.
40. Shim GJ, Warner M, Kim HJ, Andersson S, Liu L, Ekman J, et al. Aromatase-deficient mice spontaneously develop a lymphoproliferative autoimmune disease resembling Sjögren’s syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Aug 24;101(34):12628–33.
41. Tzioufas AG, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM. Pathogenesis of Sjögren’s syndrome: What we know and what we should learn. *J Autoimmun*. 2012 Aug;39(1–2):4–8.
42. Manoussakis MN, Kapsogeorgou EK. The role of intrinsic epithelial activation in the pathogenesis of Sjögren’s syndrome. *J Autoimmun*. 2010 Nov;35(3):219–24.
43. Chivasso C, Sarrand J, Perret J, Delporte C, Soyfoo MS. The involvement of innate and adaptive immunity in the initiation and perpetuation of sjögren’s syndrome. *Int J Mol Sci*. 2021 Jan 2;22(2):1–21.
44. Goules A V., Kapsogeorgou EK, Tzioufas AG. Insight into pathogenesis of Sjögren’s syndrome: Dissection on autoimmune infiltrates and epithelial cells. *Clin Immunol*. 2017;182:30–40.
45. Gong YZ, Nititham J, Taylor K, Miceli-Richard C, Sordet C, Wachsmann D, et al. Differentiation of follicular helper T cells by salivary gland epithelial cells in primary Sjögren’s syndrome. *J Autoimmun*. 2014;51:57–66.
46. Christodoulou MI, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM. Characteristics of the minor salivary gland infiltrates in Sjögren’s syndrome. *J Autoimmun*. 2010 Jun 1;34(4):400–7.

47. Fox RI, Adamson TC, Fong S, Young C, Howell F V. Characterization of the phenotype and function of lymphocytes infiltrating the salivary gland in patients with primary Sjogren syndrome. *Diagn Immunol*. 1983;1(3):233–9.
48. Kapsogeorgou EK, Christodoulou MI, Panagiotakos DB, Paikos S, Tassidou A, Tzioufas AG, et al. Minor salivary gland inflammatory lesions in Sjögren syndrome: Do they evolve? *J Rheumatol*. 2013 Sep 1;40(9):1566–71.
49. Kang EH, Lee YJ, Hyon JY, Yun PY, Song YW. Salivary cytokine profiles in primary Sjögren’s syndrome differ from those in non-sjögren sicca in terms of TNF- α levels and Th-1/Th-2 ratios. *Clin Exp Rheumatol*. 2011;29(6):970–6.
50. Van Woerkom JM, Kruize AA, Wenting-Van Wijk MJG, Knol E, Bihari IC, Jacobs JWG, et al. Salivary gland and peripheral blood T helper 1 and 2 cell activity in Sjögren’s syndrome compared with non-Sjögren’s sicca syndrome. *Ann Rheum Dis*. 2005 Oct;64(10):1474–9.
51. Fasano S, Mauro D, Macaluso F, Xiao F, Zhao Y, Lu L, et al. Pathogenesis of primary Sjögren’s syndrome beyond B lymphocytes. *Clin Exp Rheumatol*. 2020;38(4):S315–23.
52. Nocturne G, Mariette X. B cells in the pathogenesis of primary Sjögren syndrome. *Nat Rev Rheumatol*. 2018;14(3):133–45.
53. Verstappen GM, Corneth OBJ, Bootsma H, Kroese FGM. Th17 cells in primary Sjögren’s syndrome: Pathogenicity and plasticity. *J Autoimmun*. 2018 Feb 1;87:16–25.
54. Barone F, Nayar S, Campos J, Cloake T, Withers DR, Toellner K-M, et al. IL-22 regulates lymphoid chemokine production and assembly of tertiary lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci*. 2015 Sep 1;112(35):11024–9.
55. Corsiero E, Sutcliffe N, Pitzalis C, Bombardieri M, Reddy J. Accumulation of self-reactive naïve and memory B cell reveals sequential defects in B cell tolerance checkpoints in Sjögren’s Syndrome. *PLoS One*. 2014 Dec 23;9(12):1–20.
56. Daridon C, Pers JO, Devauchelle V, Martins-Carvalho C, Hutin P, Pennec YL, et al. Identification of transitional type II B cells in the salivary glands of patients with Sjögren’s syndrome. *Arthritis Rheum*. 2006 Jul;54(7):2280–8.
57. Hansen A, Odendahl M, Reiter K, Jacobi AM, Feist E, Scholze J, et al.

- Diminished peripheral blood memory B cells and accumulation of memory B cells in the salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 2002 Aug;46(8):2160–71.
58. Mingueneau M, Boudaoud S, Haskett S, Reynolds TL, Nocturne G, Norton E, et al. Cytometry by time-of-flight immunophenotyping identifies a blood Sjögren's signature correlating with disease activity and glandular inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2016 Jun;137(6):1809-1821.e12.
 59. Gatto D, Brink R. The germinal center reaction. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;126(5):898–907.
 60. Risselada AP, Looije MF, Kruize AA, Bijlsma JWJ, Van Roon JAG. The Role of Ectopic Germinal Centers in the Immunopathology of Primary Sjögren's Syndrome: A Systematic Review. *Semin Arthritis Rheum.* 2013;42(4):368–76.
 61. Theander E, Vasaitis L, Baecklund E, Nordmark G, Warfvinge G, Liedholm R, et al. Lymphoid organisation in labial salivary gland biopsies is a possible predictor for the development of malignant lymphoma in primary Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis.* 2011 Aug;70(8):1363–8.
 62. Roszkowska AM, Oliverio GW, Aragona E, Inferrera L, Severo AA, Alessandrello F, et al. Ophthalmologic manifestations of primary sjögren's syndrome. Vol. 12, *Genes*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2021. p. 365.
 63. Saldanha IJ, Bunya VY, McCoy SS, Makara M, Baer AN, Akpek EK. Ocular Manifestations and Burden Related to Sjögren Syndrome: Results of a Patient Survey. *Am J Ophthalmol.* 2020 Nov 1;219:40–8.
 64. Kassan SS, Moutsopoulos HM. Clinical manifestations and early diagnosis of Sjögren syndrome. *Arch Intern Med.* 2004;164(12):1275–84.
 65. Napeñas JJ, Rouleau TS. Oral complications of Sjögren's syndrome. Vol. 26, *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America*. Oral Maxillofac Surg Clin North Am; 2014. p. 55–62.
 66. Wang SL, Zou ZJ, Yu SF, Zhu JR. Recurrent swelling of parotid glands and Sjögren's syndrome. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1993;22(6):362–5.
 67. Mathieu A, Cauli A, Pala R, Satta L, Nurchis P, Loi GL, et al. Tracheo-

- bronchial mucociliary clearance in patients with primary and secondary Sjögren's syndrome. *Scand J Rheumatol*. 1995;24(5):300–4.
68. Bongi SM, Rosso A Del, Orlandi M, Matucci-Cerinic M. Gynaecological symptoms and sexual disability in women with primary sjögren's syndrome and sicca syndrome. *Clin Exp Rheumatol*. 2013;31(5):683–90.
 69. Ng WF, Bowman SJ. Primary Sjogren's syndrome: too dry and too tired. *Rheumatology (Oxford)*. 2010 May 1;49(5):844–53.
 70. Hackett KL, Gotts ZM, Ellis J, Deary V, Rapley T, Ng WF, et al. An investigation into the prevalence of sleep disturbances in primary Sjögren's syndrome: A systematic review of the literature. *Rheumatol (United Kingdom)*. 2017 Dec 24;56(4):570–80.
 71. Atzeni F, Cazzola M, Benucci M, Di Franco M, Salaffi F, Sarzi-Puttini P. Chronic widespread pain in the spectrum of rheumatological diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2011;25(2):165–71.
 72. Vitali C, Del Papa N. Pain in primary Sjögren's syndrome. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2015 Feb 1;29(1):63–70.
 73. Wang H-C, Chang K, Lin C-Y, Chen Y-H, Lu P-L. Periodic fever as the manifestation of primary Sjogren's syndrome: a case report and literature review. *Clin Rheumatol*. 2012 Oct 27;31(10):1517–9.
 74. Moutsopoulos HM. Sjögren's syndrome: A forty-year scientific journey. *J Autoimmun*. 2014 Jun 1;51:1–9.
 75. Baldini C, Pepe P, Quartuccio L, Priori R, Bartoloni E, Alunno A, et al. Primary sjögren's syndrome as a multi-organ disease: Impact of the serological profile on the clinical presentation of the disease in a large cohort of Italian patients. *Rheumatol (United Kingdom)*. 2014;53(5):839–44.
 76. Ramos-Casals M, Brito-Zerón P, Seror R, Bootsma H, Bowman SJ, Dörner T, et al. Characterization of systemic disease in primary Sjögren's syndrome: EULAR-SS Task Force recommendations for articular, cutaneous, pulmonary and renal involvements. *Rheumatol (United Kingdom)*. 2015 Dec 1;54(12):2230–8.
 77. Colafrancesco S, Priori R, Gattamelata A, Picarelli G, Minniti A, Brancatisano F, et al. Myositis in primary Sjögren's syndrome: Data from a multicentre

- cohort. *Clin Exp Rheumatol*. 2015;33(4):457–64.
78. Generali E, Costanzo A, Mainetti C, Selmi C. Cutaneous and Mucosal Manifestations of Sjögren's Syndrome. Vol. 53, *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*. *Clin Rev Allergy Immunol*; 2017. p. 357–70.
 79. Flament T, Bigot A, Chaigne B, Henique H, Diot E, Marchand-Adam S. Pulmonary manifestations of Sjögren's syndrome. *Eur Respir Rev*. 2016 Jun 1;25(140):110–23.
 80. Sambataro G, Ferro F, Orlandi M, Sambataro D, Torrisi SE, Quartuccio L, et al. Clinical, morphological features and prognostic factors associated with interstitial lung disease in primary Sjögren's syndrome: A systematic review from the Italian Society of Rheumatology. *Autoimmun Rev*. 2020 Feb 1;19(2):102447.
 81. Retamozo S, Acar-Denizli N, Rasmussen A, Horváth IF, Baldini C, Priori R, et al. Systemic manifestations of primary Sjögren's syndrome out of the ESSDAI classification: Prevalence and clinical relevance in a large international, multi-ethnic cohort of patients. *Clin Exp Rheumatol*. 2019;37(3):S97–106.
 82. Nardi N, Brito-Zerón P, Ramos-Casals M, Aguiló S, Cervera R, Ingelmo M, et al. Circulating auto-antibodies against nuclear and non-nuclear antigens in primary Sjögren's syndrome. *Clin Rheumatol*. 2006;25(3):341–6.
 83. Malladi AS, Sack KE, Shiboski SC, Shiboski CH, Baer AN, Banushree R, et al. Primary Sjögren's syndrome as a systemic disease: A study of participants enrolled in an international Sjögren's syndrome registry. *Arthritis Care Res*. 2012 Jun 1;64(6):911–8.
 84. Ramos-Casals M, Sánchez-Tapias JM, Parés A, Forns X, Brito-Zerón P, Nardi N, et al. Characterization and differentiation of autoimmune versus viral liver involvement in patients with Sjögren's syndrome. *J Rheumatol*. 2006;33(8):1593–9.
 85. Goules A V., Tatouli IP, Moutsopoulos HM, Tzioufas AG. Clinically Significant Renal Involvement in Primary Sjögren's Syndrome: Clinical Presentation and Outcome. *Arthritis Rheum*. 2013 Nov;65(11):2945–53.
 86. Cafaro G, Perricone C, Carubbi F, Baldini C, Quartuccio L, Priori R, et al.

- Peripheral Nervous System Involvement in Sjögren's Syndrome: Analysis of a Cohort From the Italian Research Group on Sjögren's Syndrome. *Front Immunol.* 2021 Mar 24;12(March):1–8.
87. Mekinian A, Tennenbaum J, Lahuna C, Dellal A, Belfeki N, Capron J, et al. Primary Sjögren's syndrome: Central and peripheral nervous system involvements. *Clin Exp Rheumatol.* 2021;38(4):S103–9.
88. Brito-Zerón P, Akasbi M, Bosch X, Bové A, Pérez-De-Lis M, Diaz-Lagares C, et al. Classification and characterisation of peripheral neuropathies in 102 patients with primary Sjögren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol.* 2013 Jan;31(1):103–10.
89. Baimpa E, Dahabreh IJ, Voulgarelis M, Moutsopoulos HM. Hematologic Manifestations and Predictors of Lymphoma Development in Primary Sjögren Syndrome. *Medicine (Baltimore).* 2009 Sep;88(5):284–93.
90. Ramos-Casals M, Font J, García-Carrasco M, Brito MP, Rosas J, Calvo-Alen J, et al. Primary Sjögren syndrome: Hematologic patterns of disease expression. *Medicine (Baltimore).* 2002;81(4):281–92.
91. García-Carrasco M, Sisó A, Ramos-Casals M, Rosas J, De la Red G, Gil V, et al. Raynaud's phenomenon in primary Sjögren's syndrome. Prevalence and clinical characteristics in a series of 320 patients. *J Rheumatol.* 2002;29(4):726–30.
92. Brito-Zerón P, Pasoto SG, Robles-Marhuenda A, Mandl T, Vissink A, Armagan B, et al. Autoimmune congenital heart block and primary Sjögren's syndrome: Characterisation and outcomes of 49 cases. *Clin Exp Rheumatol.* 2021;38(4):S95–102.
93. Upala S, Yong WC, Sanguankeo A. Association between primary Sjögren's syndrome and pregnancy complications: a systematic review and meta-analysis. *Clin Rheumatol.* 2016 Jun 8;35(8):1949–55.
94. Robbins A, Hentzien M, Toquet S, Didier K, Servettaz A, Pham BN, et al. Diagnostic utility of separate anti-Ro60 and anti-Ro52/TRIM21 antibody detection in autoimmune diseases. *Front Immunol.* 2019;10(MAR):444.
95. Vitali C, Moutsopoulos HM, Bombardieri S. The European Community Study Group on Diagnostic Criteria for Sjögren's Syndrome. Sensitivity and

- specificity of tests for ocular and oral involvement in Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis*. 1994 Oct 1;53(10):637–47.
96. Schall GL, Anderson LG, Wolf RO, Herdt JR, Tarpley TM, Cummings NA, et al. Xerostomia in Sjögren's Syndrome: Evaluation by Sequential Salivary Scintigraphy. *JAMA J Am Med Assoc*. 1971 Jun 28;216(13):2109–16.
 97. Vinagre F, Santos MJ, Prata A, da Silva JC, Santos AI. Assessment of salivary gland function in Sjögren's syndrome: The role of salivary gland scintigraphy. *Autoimmun Rev*. 2009 Jul;8(8):672–6.
 98. Zhou M, Song S, Wu S, Duan T, Chen L, Ye J, et al. Diagnostic accuracy of salivary gland ultrasonography with different scoring systems in Sjögren's syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*. 2018 Dec 20;8(1):17128.
 99. Bron AJ, Abelson MB, Ousler G, Pearce E, Tomlinson A, Yokoi N, et al. Methodologies to diagnose and monitor dry eye disease: Report of the diagnostic methodology subcommittee of the international Dry Eye Workshop (2007). *Ocul Surf*. 2007;5(2):108–52.
 100. Begley C, Caffery B, Chalmers R, Situ P, Simpson T, Nelson JD. Review and analysis of grading scales for ocular surface staining. *Ocul Surf*. 2019 Apr 1;17(2):208–20.
 101. Brito-Zerón P, Acar-Denizli N, Ng W-FF, Zeher M, Rasmussen A, Mandl T, et al. How immunological profile drives clinical phenotype of primary Sjögren's syndrome at diagnosis: Analysis of 10,500 patients (Sjögren Big Data Project). *Clin Exp Rheumatol*. 2018;36(2):S102–11.
 102. Tzioufas AG, Tatouli IP, Moutsopoulos HM. Autoantibodies in Sjögren's syndrome: Clinical presentation and regulatory mechanisms. Vol. 41, *Presse Medicale*. Elsevier Masson SAS; 2012.
 103. Fayyaz A, Kurien BT, Scofield RH. Autoantibodies in Sjögren's Syndrome. *Rheum Dis Clin North Am*. 2016;42(3):419–34.
 104. Theander E, Jonsson R, Sjöström B, Brokstad K, Olsson P, Henriksson G. Prediction of Sjögren's syndrome years before diagnosis and identification of patients with early onset and severe disease course by autoantibody profiling. *Arthritis Rheumatol*. 2015;67(9):2427–36.

105. Routsias JG, Tzioufas AG. Sjögren's syndrome - Study of autoantigens and autoantibodies. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2007;32(3):238–51.
106. Agmon-Levin N, Damoiseaux J, Kallenberg C, Sack U, Witte T, Herold M, et al. International recommendations for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies. *Ann Rheum Dis*. 2014 Jan;73(1):17–23.
107. Gottenberg JE, Seror R, Miceli-Richard C, Benessiano J, Devauchelle-Pensec V, Dieude P, et al. Serum Levels of Beta2-Microglobulin and Free Light Chains of Immunoglobulins Are Associated with Systemic Disease Activity in Primary Sjogren's Syndrome. Data at Enrollment in the Prospective ASSESS Cohort. *PLoS One*. 2013;8(5):1–6.
108. Daniels TE, Cox D, Shiboski CH, Schjødt M, Wu A, Lanfranchi H, et al. Associations between salivary gland histopathologic diagnoses and phenotypic features of Sjögren's syndrome among 1,726 registry participants. *Arthritis Rheum*. 2011 Jul 1;63(7):2021–30.
109. Guellec D, Cornec D, Jousse-Joulin S, Marhadour T, Marcorelles P, Pers JO, et al. Diagnostic value of labial minor salivary gland biopsy for Sjögren's syndrome: A systematic review. *Autoimmun Rev*. 2013;12(3):416–20.
110. Parisi D, Chivasso C, Perret J, Soyfoo MS, Delporte C. Current State of Knowledge on Primary Sjögren's Syndrome, an Autoimmune Exocrinopathy. *J Clin Med*. 2020 Jul 20;9(7):2299.
111. Ramos-Casals M, Brito-Zerón P, Sisó-Almirall A, Bosch X. Primary Sjögren syndrome. *BMJ*. 2012 Jun 14;345(7872):e3821–e3821.
112. Puderbach S, Stolze HH. Tear ferning and other lacrimal tests in normal persons of different ages. *Int Ophthalmol*. 1991 Nov;15(6):391–5.
113. Percival RS, Challacombe S, Marsh PD. Flow Rates of Resting Whole and Stimulated Parotid Saliva in Relation to Age and Gender. *J Dent Res*. 1994;73(8):1416–20.
114. Shimizu M, Okamura K, Kise Y, Takeshita Y, Furuhashi H, Weerawanich W, et al. Effectiveness of imaging modalities for screening IgG4-related dacryoadenitis and sialadenitis (Mikulicz's disease) and for differentiating it from Sjögren's syndrome (SS), with an emphasis on sonography. *Arthritis Res*

- Ther. 2015 Aug 23;17(1).
115. Kamiński B, Błochowiak K. Mikulicz's disease and Küttner's tumor as manifestations of IgG4-related diseases: A review of the literature. *Reumatologia*. 2020 Aug 1;58(4):243–50.
 116. Skillington SA, Ogden MA. IgG4-Related Disease and the Salivary Glands: A Review of Pathophysiology, Diagnosis, and Management. *Otolaryngol Clin North Am*. 2021 Jun 1;54(3):497–508.
 117. Al Tabaa O, Gouze H, Hamroun S, Bergé E, Belkhir R, Pavy S, et al. Normal salivary gland ultrasonography could rule out the diagnosis of Sjögren's syndrome in anti-SSA-negative patients with sicca syndrome. *RMD Open*. 2021 Jan 1;7(1):e001503.
 118. Mariette X, Caudmont C, Bergé E, Desmoulins F, Pinabel F. Dry eyes and mouth syndrome or sicca, asthenia and polyalgia syndrome? *Rheumatology*. 2003 Jul 1;42(7):914–5.
 119. Tashbayev B, Garen T, Palm, Chen X, Herlofson BB, Young A, et al. Patients with non-Sjögren's sicca report poorer general and oral health-related quality of life than patients with Sjögren's syndrome: a cross-sectional study. *Sci Rep*. 2020 Dec 1;10(1).
 120. Kabasakal Y, Kitapçioğlu G, Karabulut G, Tezcan M, Balkarlı A, Aksoy A, et al. Criteria sets for primary Sjogren's syndrome are not adequate for those presenting with extraglandular organ involvements as their dominant clinical features. *Rheumatol Int*. 2017 May 1;37(5):675–84.
 121. Vitali C, Bombardieri S, Moutsopoulos HM, Balestrieri G, Bencivelli W, Bernstein RM, et al. Preliminary criteria for the classification of Sjögren's syndrome. Results of a prospective concerted action supported by the European community. *Arthritis Rheum*. 1993;36(3):340–7.
 122. Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, et al. Classification criteria for Sjögren's syndrome: A revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis*. 2002;61(6):554–8.
 123. Shiboski CH, Shiboski SC, Seror R, Criswell LA, Labetoulle M, Lietman TM, 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. *Arthritis Rheumatol.* 2017 Jan;69(1):35–45.
124. Brito-Zerón P, Theander E, Baldini C, Seror R, Retamozo S, Quartuccio L, et al. Early diagnosis of primary Sjögren's syndrome: EULAR-SS task force clinical recommendations. Vol. 12, *Expert Review of Clinical Immunology.* 2016. p. 137–56.
 125. Seror R, Bowman SJ, Brito-Zeron P, Theander E, Bootsma H, Tzioufas A, et al. EULAR Sjögren's syndrome disease activity index (ESSDAI): A user guide. *RMD Open.* 2015;1(1):1–9.
 126. Seror R, Ravaud P, Bowman SJ, Baron G, Tzioufas A, Theander E, et al. EULAR Sjogren's syndrome disease activity index: development of a consensus systemic disease activity index for primary Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis.* 2010;69(6):1103–9.
 127. Seror R, Meiners P, Baron G, Bootsma H, Bowman SJ, Vitali C, et al. Development of the ClinESSDAI: A clinical score without biological domain. A tool for biological studies. *Ann Rheum Dis.* 2016 Nov 1;75(11):1945–50.
 128. Seror R, Ravaud P, Mariette X, Bootsma H, Theander E, Hansen A, et al. EULAR Sjögren's Syndrome Patient Reported Index (ESSPRI): Development of a consensus patient index for primary Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis.* 2011 Jun 1;70(6):968–72.
 129. Seror R, Theander E, Brun JG, Ramos-Casals M, Valim V, Dörner T, et al. Validation of EULAR primary Sjögren's syndrome disease activity (ESSDAI) and Patient indexes (ESSPRI). *Ann Rheum Dis.* 2015 May;74(5):859–66.
 130. Brito-Zerón P, Retamozo S, Ramos-Casals M. Phenotyping Sjögren's syndrome: Towards a personalised management of the disease. *Clin Exp Rheumatol.* 2018;36:S198–209.
 131. Fox RI. Sjögren's syndrome. *Lancet.* 2005 Jul;366(9482):321–31.
 132. Meijer JM, Meiners PM, Slater JJRH, Spijkervet FKL, Kallenberg CGM, Vissink A, et al. Health-related quality of life, employment and disability in patients with sjögren's syndrome. *Rheumatology.* 2009 Sep;48(9):1077–82.
 133. Cui Y, Xia L, li L, Zhao Q, Chen S, Gu Z. Anxiety and depression in primary

- Sjögren's syndrome: A cross-sectional study. *BMC Psychiatry*. 2018 May 16;18(1).
134. Hackett KL, Newton JL, Frith J, Elliott C, Lendrem D, Foggo H, et al. Impaired functional status in primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Care Res*. 2012 Nov 1;64(11):1760–4.
 135. Miyamoto ST, Valim V, Fisher BA. Health-related quality of life and costs in Sjögren's syndrome. *Rheumatol (United Kingdom)*. 2021 Jun 1;60(6):2588–601.
 136. McCormick N, Marra CA, Sadatsafavi M, Kopec JA, Aviña-Zubieta JA. Excess Productivity Costs of Systemic Lupus Erythematosus, Systemic Sclerosis, and Sjögren's Syndrome: A General Population-Based Study. *Arthritis Care Res*. 2019 Jan 1;71(1):142–54.
 137. Gairy K, Knight C, Anthony P, Hoskin B. Burden of illness among subgroups of patients with primary Sjögren's syndrome and systemic involvement. *Rheumatol*. 2021 Apr 6;60(4):1871–81.
 138. Brito-Zerón P, Kostov B, Solans R, Fraile G, Suárez-Cuervo C, Casanovas A, et al. 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(2):348–55.
 139. Luppi F, Sebastiani M, Silva M, Sverzellati N, Cavazza A, Salvarani C, et al. Interstitial lung disease in Sjögren's syndrome: a clinical review. *Clin Exp Rheumatol*. 2021;38 Suppl 1(4):291–300.
 140. Nocturne G, Mariette X. Sjögren Syndrome-associated lymphomas: an update on pathogenesis and management. *Br J Haematol*. 2015 Feb;168(3):317–27.
 141. Solans-Laqué R, López-Hernandez A, Angel Bosch-Gil J, Palacios A, Campillo M, Vilardell-Tarres M. Risk, Predictors, and Clinical Characteristics of Lymphoma Development in Primary Sjögren's Syndrome. *Semin Arthritis Rheum*. 2011;41(3):415–23.
 142. Retamozo S, Brito-Zerón P, Ramos-Casals M. Prognostic markers of lymphoma development in primary Sjögren syndrome. *Lupus*. 2019 Jul 19;28(8):923–36.
 143. Fallah M, Liu X, Ji J, Försti A, Sundquist K, Hemminki K. Hodgkin

- lymphoma after autoimmune diseases by age at diagnosis and histological subtype. *Ann Oncol*. 2014;25(7):1397–404.
144. Brito-Zerón P, Kostov B, Fraile G, Caravia-Durán D, Maure B, Rascón FJ, et al. Characterization and risk estimate of cancer in patients with primary Sjögren syndrome. *J Hematol Oncol*. 2017 Apr 17;10(1).
 145. Vasaitis L, Nordmark G, Theander E, Backlin C, Smedby KE, Askling J, et al. Population-based study of patients with primary Sjögren's syndrome and lymphoma: lymphoma subtypes, clinical characteristics, and gender differences. *Scand J Rheumatol*. 2020;49(3):225–32.
 146. Voulgarelis M, Ziakas PD, Papageorgiou A, Baimpa E, Tzioufas AG, Moutsopoulos HM. Prognosis and Outcome of Non-Hodgkin Lymphoma in Primary Sjögren Syndrome. *Medicine (Baltimore)*. 2012 Jan;91(1):1–9.
 147. Igoe A, Merjanah S, Scofield RH. Sjögren Syndrome and Cancer. *Rheum Dis Clin North Am*. 2020;46(3):513–32.
 148. Johnsen SJ, Brun JG, Gøransson LG, Johannesen TB, Haldorsen K, Harboe E, et al. Risk of non-Hodgkin's lymphoma in primary Sjögren's syndrome: A population-based study. *Arthritis Care Res*. 2013 May;65(5):816–21.
 149. Sène D, Ismael S, Forien M, Charlotte F, Kaci R, Cacoub P, et al. Ectopic Germinal Center–Like Structures in Minor Salivary Gland Biopsy Tissue Predict Lymphoma Occurrence in Patients With Primary Sjögren's Syndrome. *Arthritis Rheumatol*. 2018 Sep 1;70(9):1481–8.
 150. Ansell P, Simpson J, Lightfoot T, Smith A, Kane E, Howell D, et al. Non-Hodgkin lymphoma and autoimmunity: Does gender matter? *Int J Cancer*. 2011 Jul 15;129(2):460–6.
 151. Ramírez Sepúlveda JI, Kvarnström M, Eriksson P, Mandl T, Norheim KB, Johnsen SJ, et al. Long-term follow-up in primary Sjögren's syndrome reveals differences in clinical presentation between female and male patients. *Biol Sex Differ*. 2017 Aug 8;8(1).
 152. Anaya JM, Liu GT, D'Souza E, Ogawa N, Luan X, Talal N. Primary Sjögren's syndrome in men. *Ann Rheum Dis*. 1995;54(9):748–51.
 153. Sutcliffe N, Inanc M, Speight P, Isenberg D. Predictors of lymphoma development in primary Sjogren's syndrome. *Semin Arthritis Rheum*.

- 1998;28(2):80–7.
154. Ioannidis JPA, Vassiliou VA, Moutsopoulos HM. Long-term risk of mortality and lymphoproliferative disease and predictive classification of primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 2002;46(3):741–7.
 155. Brito-Zerón P, Ramos-Casals M, Bove A, Sentis J, Font J. Predicting adverse outcomes in primary Sjögren's syndrome: Identification of prognostic factors. *Rheumatology.* 2007 Aug;46(8):1359–62.
 156. Baldini C, Pepe P, Luciano N, Ferro F, Talarico R, Grossi S, et al. A clinical prediction rule for lymphoma development in primary Sjögren's syndrome. *J Rheumatol.* 2012 Apr 1;39(4):804–8.
 157. Risselada AP, Kruize AA, Bijlsma JWW. Clinical features distinguishing lymphoma development in primary Sjögren's syndrome-A retrospective cohort study. *Semin Arthritis Rheum.* 2013 Oct;43(2):171–7.
 158. Nocturne G, Virone A, Ng WF, Le Guern V, Hachulla E, Cornec D, et al. Rheumatoid Factor and Disease Activity Are Independent Predictors of Lymphoma in Primary Sjögren's Syndrome. *Arthritis Rheumatol.* 2016 Apr 1;68(4):977–85.
 159. Fragkioudaki S, Mavragani CP, Moutsopoulos HM. Predicting the risk for lymphoma development in Sjogren syndrome. *Med (United States).* 2016 Jun 1;95(25).
 160. De Vita S, Gandolfo S, Zandonella Callegher S, Zabotti A, Quartuccio L. The evaluation of disease activity in Sjögren's syndrome based on the degree of MALT involvement: Glandular swelling and cryoglobulinaemia compared to ESSDAI in a cohort study. *Clin Exp Rheumatol.* 2018;36:S150–6.
 161. Theander E, Henriksson G, Ljungberg O, Mandl T, Manthorpe R, Jacobsson LTH. Lymphoma and other malignancies in primary Sjögren's syndrome: A cohort study on cancer incidence and lymphoma predictors. *Ann Rheum Dis.* 2006 Jun 1;65(6):796–803.
 162. Abrol E, González-Pulido C, Praena-Fernández JM, Isenberg DA. A retrospective study of long-term outcomes in 152 patients with primary Sjögren's syndrome: 25-Year experience. *Clin Med J R Coll Physicians London.* 2014 Mar 1;14(2):157–64.

163. Skopouli FN, Dafni U, Ioannidis JPA, Moutsopoulos HM. Clinical evolution, and morbidity and mortality of primary Sjogren's syndrome. *Semin Arthritis Rheum.* 2000;29(5):296–304.
164. Quartuccio L, Isola M, Baldini C, Priori R, Bartoloni Bocci E, Carubbi F, et al. Biomarkers of lymphoma in Sjögren's syndrome and evaluation of the lymphoma risk in prelymphomatous conditions: Results of a multicenter study. *J Autoimmun.* 2014;51:75–80.
165. Ismail F, Mahmoud A, Abdelhaleem H, Mamdoh A, Geneidy M, Kamal E. Primary Sjögren's syndrome and B-non-Hodgkin lymphoma: role of CD4+ T lymphocytopenia. *Rheumatol Int.* 2013 Apr 12;33(4):1021–5.
166. Nocturne G, Seror R, Fogel O, Belkhir R, Boudaoud S, Saraux A, et al. CXCL13 and CCL11 serum levels and lymphoma and disease activity in primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheumatol.* 2015 Dec 1;67(12):3226–33.
167. Martel C, Gondran G, Launay D, Lalloué F, Palat S, Lambert M, et al. Active immunological profile is associated with systemic Sjögren's syndrome. *J Clin Immunol.* 2011 Oct;31(5):840–7.
168. Brito-Zerón P, Retamozo S, Gandía M, Akasbi M, Pérez-De-Lis M, Diaz-Lagares C, et al. Monoclonal gammopathy related to Sjögren syndrome: A key marker of disease prognosis and outcomes. *J Autoimmun.* 2012 Aug;39(1–2):43–8.
169. Weng MY, Huang YT, Liu MF, Lu TH. Incidence of cancer in a nationwide population cohort of 7852 patients with primary Sjögren's syndrome in Taiwan. *Ann Rheum Dis.* 2012 Apr;71(4):524–7.
170. Zhang W, Feng S, Yan S, Zhao Y, Li M, Sun J, et al. Incidence of malignancy in primary Sjögren's syndrome in a Chinese cohort. *Rheumatology.* 2009 Mar 1;49(3):571–7.
171. Brito-Zerón P, Kostov B, Solans R, Fraile G, Suárez-Cuervo C, Casanovas A, et al. 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(2):348–55.
172. Huang H, Xie W, Geng Y, Fan Y, Zhang Z. Mortality in patients with primary

- Sjögren's syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Rheumatology*. 2021 Sep 1;60(9):4029–38.
173. Ramos-Casals M, Brito-Zerón P, Bombardieri S, Bootsma H, De Vita S, Dörner T, et al. EULAR recommendations for the management of Sjögren's syndrome with topical and systemic therapies. *Ann Rheum Dis*. 2020;79(1):3–18.
174. Foulks GN, Forstot SL, Donshik PC, Forstot JZ, Goldstein MH, Lemp MA, et al. Clinical guidelines for management of dry eye associated with Sjögren disease. *Ocul Surf*. 2015 Apr 1;13(2):118–32.
175. Pucker AD, Ng SM, Nichols JJ. Over the counter (OTC) artificial tear drops for dry eye syndrome. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016 Feb 23;2016(2).
176. Pan Q, Angelina A, Marrone M, Stark WJ, Akpek EK. Autologous serum eye drops for dry eye. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017 Feb 28;2017(2).
177. Ervin AM, Law A, Pucker AD. Punctal occlusion for dry eye syndrome. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017 Jun 26;2017(6).
178. Gottenberg JE, Ravaud P, Puéchal X, Le Guern V, Sibia J, Goeb V, et al. Effects of hydroxychloroquine on symptomatic improvement in primary sjögren syndrome: The JOQUER randomized clinical trial. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2014 Jul 16;312(3):249–58.
179. Devauchelle-Pensec V, Mariette X, Jousse-Joulin S, Berthelot J-M, Perdriger A, Puéchal X, et al. Treatment of Primary Sjögren Syndrome With Rituximab. *Ann Intern Med*. 2014 Feb 18;160(4):233–42.
180. Vita S De, Quartuccio L, Seror R, Salvin S, Ravaud P, Fabris M, et al. Efficacy and safety of belimumab given for 12 months in primary Sjögren's syndrome: The BELISS open-label phase II study. *Rheumatol (United Kingdom)*. 2015 Dec 1;54(12):2249–56.
181. Mariette X, Seror R, Quartuccio L, Baron G, Salvin S, Fabris M, et al. Efficacy and safety of belimumab in primary Sjögren's syndrome: Results of the BELISS open-label phase II study. *Ann Rheum Dis*. 2015 Mar 1;74(3):526–31.
182. Maecker HT, McCoy JP, Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nat Rev Immunol*. 2012 Feb

- 17;12(3):191–200.
183. Kroef M, Hoogen LL, Mertens JS, Blokland SLM, Haskett S, Devaprasad A, et al. Cytometry by time of flight identifies distinct signatures in patients with systemic sclerosis, systemic lupus erythematosus and Sjögrens syndrome. *Eur J Immunol*. 2020 Jan 11;50(1):119–29.
 184. Ermann J, Rao DA, Teslovich NC, Brenner MB, Raychaudhuri S. Immune cell profiling to guide therapeutic decisions in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2015 Oct 1;11(9):541–51.
 185. Mandl T, Bredberg A, Jacobsson LTH, Manthorpe R, Henriksson G. CD4+ T-lymphocytopenia--a frequent finding in anti-SSA antibody seropositive patients with primary Sjögren's syndrome. *J Rheumatol*. 2004 Apr;31(4):726–8.
 186. Sudzius G, Mieliauskaite D, Siaurys A, Viliene R, Butrimiene I, Characiejus D, et al. Distribution of Peripheral Lymphocyte Populations in Primary Sjögren's Syndrome Patients. *J Immunol Res*. 2015;2015:1–10.
 187. Davies R, Hammenfors D, Bergum B, Jakobsen K, Solheim M, Vogelsang P, et al. Patients with Primary Sjögren's Syndrome Have Alterations in Absolute Quantities of Specific Peripheral Leucocyte Populations. *Scand J Immunol*. 2017;86(6):491–502.
 188. Verstappen GM, Meiners PM, Corneth OBJ, Visser A, Arends S, Abdulahad WH, et al. Attenuation of Follicular Helper T Cell–Dependent B Cell Hyperactivity by Abatacept Treatment in Primary Sjögren's Syndrome. *Arthritis Rheumatol*. 2017 Sep 1;69(9):1850–61.
 189. Kwok SK, Cho M La, Her YM, Oh HJ, Park MK, Lee SY, et al. TLR2 ligation induces the production of IL-23/IL-17 via IL-6, STAT3 and NF- κ B pathway in patients with primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Res Ther*. 2012 Mar 14;14(2).
 190. Fei Y, Zhang W, Lin D, Wu C, Li M, Zhao Y, et al. Clinical parameter and Th17 related to lymphocytes infiltrating degree of labial salivary gland in primary Sjögren's syndrome. *Clin Rheumatol*. 2014;33(4):523–9.
 191. Szabo K, Papp G, Barath S, Gyimesi E, Szanto A, Zeher M. Follicular helper T cells may play an important role in the severity of primary Sjögren's

- syndrome. *Clin Immunol.* 2013;147(2):95–104.
192. Alunno A, Carubbi F, Bistoni O, Caterbi S, Bartoloni E, Bigerna B, et al. CD4–CD8– T-cells in primary Sjögren’s syndrome: Association with the extent of glandular involvement. *J Autoimmun.* 2014 Jun;51:38–43.
193. Roberts MEP, Kaminski D, Jenks SA, Maguire C, Ching K, Burbelo PD, et al. Primary Sjögren’s Syndrome Is Characterized by Distinct Phenotypic and Transcriptional Profiles of IgD+ Unswitched Memory B Cells. *Arthritis Rheumatol.* 2014 Sep;66(9):2558–69.
194. Bohnhorst JO, Bjorgan MB, Thoen JE, Natvig JB, Thompson KM. Bm1-Bm5 Classification of Peripheral Blood B Cells Reveals Circulating Germinal Center Founder Cells in Healthy Individuals and Disturbance in the B Cell Subpopulations in Patients with Primary Sjogren’s Syndrome. *J Immunol.* 2001;167(7):3610–8.
195. Hansen A, Gosemann M, Pruss A, Reiter K, Ruzickova S, Lipsky PE, et al. Abnormalities in peripheral B cell memory of patients with primary Sjögren’s syndrome. *Arthritis Rheum.* 2004;50(6):1897–908.
196. Szabó K, Papp G, Szántó A, Tarr T, Zeher M. A comprehensive investigation on the distribution of circulating follicular T helper cells and B cell subsets in primary Sjogren’s syndrome and systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol.* 2016;183(1):76–89.
197. Dörner T, Lipsky PE. Abnormalities of B cell phenotype, immunoglobulin gene expression and the emergence of autoimmunity in Sjögren’s syndrome. *Arthritis Res.* 2002;4(6):360–71.
198. Cornec D, Saraux A, Pers JO, Jousse-Joulin S, Marhadour T, Roguedas-Contios AM, et al. Diagnostic accuracy of blood B-cell subset profiling and autoimmunity markers in Sjögren’s syndrome. *Arthritis Res Ther.* 2014;16(1):R15.
199. Binard A, Le Pottier L, Devauchelle-Pensec V, Saraux A, Youinou P, Pers J-O. Is the blood B-cell subset profile diagnostic for Sjogren syndrome? *Ann Rheum Dis.* 2009 Sep 1;68(9):1447–52.
200. Barcelos F, Martins C, Papoila A, Geraldés C, Cardigos J, Nunes G, et al. Association between memory B-cells and clinical and immunological features

- of primary Sjögren's syndrome and Sicca patients. *Rheumatol Int.* 2018;38(6):1063–73.
201. Giacomelli R, Afeltra A, Alunno A, Baldini C, Bartoloni-Bocci E, Berardicurti O, et al. International consensus: What else can we do to improve diagnosis and therapeutic strategies in patients affected by autoimmune rheumatic diseases (rheumatoid arthritis, spondyloarthritis, systemic sclerosis, systemic lupus erythematosus, antiphospholip. Vol. 16, *Autoimmunity Reviews. Autoimmun Rev*; 2017. p. 911–24.
 202. Jin J-O, Yu Q. T Cell-Associated Cytokines in the Pathogenesis of Sjögren's Syndrome. *J Clin Cell Immunol.* 2013;S!(9):1–14.
 203. Szodoray P, Alex P, Brun JG, Centola M, Jonsson R. Circulating Cytokines in Primary Sjogren's Syndrome Determined by a Multiplex Cytokine Array System. *Scand J Immunol.* 2004 Jun;59(6):592–9.
 204. Szodoray P, Alex P, Jonsson M V., Knowlton N, Dozmorov I, Nakken B, et al. Distinct profiles of Sjögren's syndrome patients with ectopic salivary gland germinal centers revealed by serum cytokines and BAFF. *Clin Immunol.* 2005;117(2):168–76.
 205. López-Villalobos EF, Muñoz-Valle JF, Palafox-Sánchez CA, García-Arellano S, Martínez-Fernández DE, Orozco-Barocio G, et al. Cytokine profiles and clinical characteristics in primary Sjögren's syndrome patient groups. *J Clin Lab Anal.* 2021 Feb 17;35(2):e23629.
 206. Spadaro A, Rinaldi T, Ricciari V, Taccari E, Valesini G. Interleukin-13 in auto-immune rheumatic diseases: Relationship with the autoantibody profile. *Clin Exp Rheumatol.* 2002 Feb;20(2):213–6.
 207. Nishikawa A, Suzuki K, Kassai Y, Gotou Y, Takiguchi M, Miyazaki T, et al. Identification of definitive serum biomarkers associated with disease activity in primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Res Ther.* 2016;18(1):106.
 208. Groom J, Kalled SL, Cutler AH, Olson C, Woodcock S a, Schneider P, et al. Association of BAFF / BLYS overexpression and altered B cell differentiation with Sjögren's syndrome. *J Clin Invest.* 2002;109(1):59–68.
 209. James K, Chipeta C, Parker A, Harding S, Cockell SJ, Gillespie CS, et al. B-cell activity markers are associated with different disease activity domains in

- primary Sjögren's syndrome. *Rheumatology*. 2018 Jul 1;57(7):1222–7.
210. Quartuccio L, Salvin S, Fabris M, Maset M, Pontarini E, Isola M, et al. BLYS upregulation in Sjogren's syndrome associated with lymphoproliferative disorders, higher ESSDAI score and B-cell clonal expansion in the salivary glands. *Rheumatology*. 2013 Feb 1;52(2):276–81.
211. Mariette X, Roux S, Zhang J, Bengoufa D, Lavie F, Zhou T, et al. The level of BLYS (BAFF) correlates with the titre of autoantibodies in human Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis*. 2003;62(2):168–71.
212. Jonsson M V., Szodoray P, Jellestad S, Jonsson R, Skarstein K. Association between circulating levels of the novel TNF family members APRIL and BAFF and lymphoid organization in primary Sjogren's syndrome. *J Clin Immunol*. 2005;25(3):189–201.
213. Kramer JM, Klimatcheva E, Rothstein TL. CXCL13 is elevated in Sjögren's syndrome in mice and humans and is implicated in disease pathogenesis. *J Leukoc Biol*. 2013;94(5):1079–89.
214. Mandal SK, Sandhya P, Kabeerdoss J, Ramya J, Mahasampath G, Danda D. CXCL13 levels in serum but not in saliva are elevated in Asian Indian patients with primary Sjögren's syndrome. *Rheumatol Int*. 2018 May 1;38(5):831–6.
215. Traianos EY, Locke J, Lendrem D, Bowman S, Hargreaves B, Macrae V, et al. Serum CXCL13 levels are associated with lymphoma risk and lymphoma occurrence in primary Sjögren's syndrome. *Rheumatol Int*. 2020 Apr 1;40(4):541–8.
216. Bombardieri M, Barone F, Pittoni V, Alessandri C, Conigliaro P, Blades MC, et al. Increased circulating levels and salivary gland expression of interleukin-18 in patients with Sjögren's syndrome: relationship with autoantibody production and lymphoid organization of the periductal inflammatory infiltrate. *Arthritis Res Ther*. 2004 Aug 3;6(5):1–10.
217. Chen Y, Deng F, Zheng J, Yin J, Huang R, Liu W, et al. High circulating level of interleukin-18 in patients with primary Sjögren's syndrome is associated with disease activity. *Mod Rheumatol*. 2016 Jan 2;26(1):156–8.
218. Eriksson P, Andersson C, Ekerfelt C, Ernerudh J, Skogh T. Relationship between serum levels of IL-18 and IgG1 in patients with primary Sjögren's

- syndrome, rheumatoid arthritis and healthy controls. *Clin Exp Immunol.* 2004 Sep;137(3):617–20.
219. Deng F, Chen J, Zheng J, Chen Y, Huang R, Yin J, et al. Association of BAFF and IL-17A with subphenotypes of primary Sjögren's syndrome. *Int J Rheum Dis.* 2016;19(7):715–20.
 220. Katsifis GE, Rekka S, Moutsopoulos NM, Pillemer S, Wahl SM. Systemic and local interleukin-17 and linked cytokines associated with Sjögren's syndrome immunopathogenesis. *Am J Pathol.* 2009;175(3):1167–77.
 221. Miletić M, Stojanović R, Pajić O, Bugarski D, Mojsilović S, Čokić V, et al. Serum interleukin-17 & nitric oxide levels in patients with primary Sjögren's syndrome. *Indian J Med Res.* 2012 Apr;135(4):513–9.
 222. Kang K, Kim H-O, Kwok S-K, Ju J, Park K-S, Sun D-I, et al. Impact of interleukin-21 in the pathogenesis of primary Sjogren's syndrome: increased serum levels of interleukin-21 and its expression in the labial salivary glands. *Arthritis Res Ther.* 2011;13(5):R179.
 223. Jin L, Yu D, Li XX, Yu N, Li XX, Wang YY, et al. CD4+CXCR5+ follicular helper T cells in salivary gland promote B cells maturation in patients with primary Sjogren's syndrome. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7(5):1988–96.
 224. Lavoie TN, Stewart CM, Berg KM, Li Y, Nguyen CQ. Expression of Interleukin-22 in Sjögren's Syndrome: Significant Correlation with Disease Parameters. *Scand J Immunol.* 2011 Oct;74(4):377–82.
 225. Vázquez-Villamar M, Palafox-Sánchez CA, Muñoz-Valle JF, Valle Y, Orozco-Barocio G, Hernández-Bello J, et al. Analysis of IL10 haplotypes in primary Sjögren's syndrome patients from Western Mexico: Relationship with mRNA expression, IL-10 soluble levels, and autoantibodies. *Hum Immunol.* 2015;76(7):473–9.
 226. Perrier S, Serre AF, Dubost JJ, Beaujon G, Plazonnet MP, Albuisson E, et al. Increased serum levels of interleukin 10 in Sjögren's syndrome; correlation with increased IgG1. *J Rheumatol.* 2000 Apr;27(4):935–9.
 227. Hulkkonen J, Pertovaara M, Anttonen J, Pasternack A, Hurme M. Elevated interleukin-6 plasma levels are regulated by the promoter region polymorphism of the IL6 gene in primary Sjogren's syndrome and correlate

- with the clinical manifestations of the disease. *Rheumatology*. 2001 Jun 1;40(6):656–61.
228. García-Carrasco M, Font J, Filella X, Cervera R, Ramos-Casals M, Sisó A, et al. Circulating levels of Th1/Th2 cytokines in patients with primary Sjögren's syndrome: Correlation with clinical and immunological features. *Clin Exp Rheumatol*. 2001;19(4):411–5.
229. Goules A V., Tzioufas AG. Primary Sjögren's syndrome: Clinical phenotypes, outcome and the development of biomarkers. *Autoimmun Rev*. 2016;15(7):695–703.
230. Kwok SK, Lee J, Yu D, Kang KY, Cho M La, Kim HR, et al. A pathogenetic role for IL-21 in primary Sjögren syndrome. *Nat Rev Rheumatol*. 2015;11(6):368–74.
231. Ichikawa Y, Arimori K, Yoshida M, Horiki T, Hoshina Y, Morita K, et al. Abnormal expression of apoptosis-related antigens, Fas and bcl-2, on circulating T-lymphocytes subsets in primary Sjogren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol*. 1995;13(3):307–13.
232. Kirtava Z, Blomberg J, Bredberg A, Henriksson G, Jacobsson L, Manthorpe R. CD4+ T-lymphocytopenia without HIV infection: Increased prevalence among patients with primary Sjogren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol*. 1995;13(5):609–16.
233. Ferraccioli GF, Tonutti E, Casatta L, Pegoraro I, De Vita S, Sala P, et al. CD4 cytopenia and occasional expansion of CD4+CD8+ lymphocytes in Sjögren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol*. 1996;14(2):125–30.
234. Zeher M, Szodoray P, Gyimesi E, Szondy Z. Correlation of Increased Susceptibility To Apoptosis of Cd43 T Cells With Lymphocyte Activation and Activity of Disease in Patients With Primary Sj Gren'S Syndrome. *Arthritis Rheum*. 1999 Aug;42(8):1673–81.
235. Manganelli P, Fietta P. Apoptosis and Sjögren syndrome. *Semin Arthritis Rheum*. 2003;33(1):49–65.
236. Singh N, Cohen PL. The T cell in Sjogren's syndrome: Force majeure, not spectateur. *J Autoimmun*. 2012;39(3):229–33.
237. Alunno A, Bistoni O, Bartoloni E, Caterbi S, Bigerna B, Tabarrini A, et al. IL-

- 17-producing CD4-CD8- T cells are expanded in the peripheral blood, infiltrate salivary glands and are resistant to corticosteroids in patients with primary Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis*. 2013 Feb;72(2):286–92.
238. Alunno A, Carubbi F, Bistoni O, Caterbi S, Bartoloni E, Mirabelli G, et al. T Regulatory and T Helper 17 Cells in Primary Sjögren's Syndrome: Facts and Perspectives. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:1–10.
239. Li L, He J, Zhu L, Yang Y, Jin Y, Jia R, et al. The clinical relevance of IL-17-producing CD4+CD161+ cell and its subpopulations in primary Sjögren's syndrome. *J Immunol Res*. 2015 Sep 8;2015:307453.
240. Zhou H, Yang J, Tian J, Wang S. CD8+ T Lymphocytes: Crucial Players in Sjögren's Syndrome. *Front Immunol*. 2021;11(January):1–12.
241. Bohnhorst J, Bjørgan MB, Thoen JE, Jonsson R, Natvig JB, Thompson KM. Abnormal B cell differentiation in primary Sjögren's syndrome results in a depressed percentage of circulating memory B cells and elevated levels of soluble CD27 that correlate with serum IgG concentration. *Clin Immunol*. 2002 Apr;103(1):79–88.
242. Hansen A, Reiter K, Ziprian T, Jacobi A, Hoffmann A, Gosemann M, et al. Dysregulation of chemokine receptor expression and function by B cells of patients with primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum*. 2005 Jul;52(7):2109–19.
243. Loureiro-Amigo J, Palacio-García C, Martínez-Gallo M, Martínez-Valle F, Ramentol-Sintas M, Soláns-Laqué R. Utility of lymphocyte phenotype profile to differentiate primary Sjögren's syndrome from sicca syndrome. *Rheumatology*. 2021 Dec 1;60(12):5647–58.
244. Zhu L, Yin Z, Ju B, Zhang J, Wang Y, Lv X, et al. Altered frequencies of memory B cells in new-onset systemic lupus erythematosus patients. *Clin Rheumatol*. 2018;37(1):205–12.
245. Pascual V, Liu YJ, Magalski A, de Bouteiller O, Banchereau J, Capra JD. Analysis of somatic mutation in five B cell subsets of human tonsil. *J Exp Med*. 1994 Jul 1;180(1):329–39.
246. Klein U, Rajewsky K, Küppers R. Human Immunoglobulin (Ig)M+IgD+ Peripheral Blood B Cells Expressing the CD27 Cell Surface Antigen Carry

- Somatically Mutated Variable Region Genes: CD27 as a General Marker for Somatically Mutated (Memory) B Cells. *J Exp Med*. 1998 Nov 2;188(9):1679–89.
247. Ansel KM, Harris RBS, Cyster JG. CXCL13 is required for B1 cell homing, natural antibody production, and body cavity immunity. *Immunity*. 2002;16(1):67–76.
 248. Barone F, Bombardieri M, Manzo A, Blades MC, Morgan PR, Challacombe SJ, et al. Association of CXCL13 and CCL21 expression with the progressive organization of lymphoid-like structures in Sjögren’s syndrome. *Arthritis Rheum*. 2005 Jun;52(6):1773–84.
 249. Manfredi A, Sebastiani M, Cerri S, Cassone G, Bellini P, Casa G Della, et al. Prevalence and characterization of non-sicca onset primary Sjögren syndrome with interstitial lung involvement. *Clin Rheumatol*. 2017 Jun 21;36(6):1261–8.
 250. Spolski R, Leonard WJ. Interleukin-21: Basic biology and implications for cancer and autoimmunity. Vol. 26, *Annual Review of Immunology*. Annu Rev Immunol; 2008. p. 57–79.
 251. Verstappen GM, Kroese FGM, Meiners PM, Corneth OB, Huitema MG, Haacke EA, et al. B cell depletion therapy normalizes circulating follicular TH cells in primary Sjögren syndrome. *J Rheumatol*. 2017 Jan 1;44(1):49–58.
 252. Witas R, Gupta S, Nguyen CQ. Contributions of Major Cell Populations to Sjögren’s Syndrome. *J Clin Med*. 2020 Sep 22;9(9):3057.
 253. Dudakov JA, Hanash AM, Van Den Brink MRM. Interleukin-22: Immunobiology and pathology. Vol. 33, *Annual Review of Immunology*. Annual Reviews Inc.; 2015. p. 747–85.
 254. Ciccia F, Guggino G, Giardina A, Ferrante A, Carrubbi F, Giacomelli R, et al. The role of innate and lymphoid IL-22-producing cells in the immunopathology of primary Sjögren’s syndrome. Vol. 10, *Expert Review of Clinical Immunology*. Expert Reviews Ltd.; 2014. p. 533–41.
 255. Zamani MR, Aslani S, Salmaninejad A, Javan MR, Rezaei N. PD-1/PD-L and autoimmunity: A growing relationship. *Cell Immunol*. 2016 Dec;310:27–41.
 256. Fife BT, Pauken KE. The role of the PD-1 pathway in autoimmunity and peripheral tolerance. *Ann N Y Acad Sci*. 2011 Jan;1217(1):45–59.

257. Patsoukis N, Wang Q, Strauss L, Boussiotis VA. Revisiting the PD-1 pathway. *Sci Adv*. 2020 Sep 18;6(38):eabd2712.
258. Tong M, Fang X, Yang J, Wu P, Guo Y, Sun J. Abnormal membrane-bound and soluble programmed death ligand 2 (PD-L2) expression in systemic lupus erythematosus is associated with disease activity. *Immunol Lett*. 2020;227(September):96–101.
259. Hirahara S, Katsumata Y, Kawasumi H, Kawaguchi Y, Harigai M. Serum levels of soluble programmed cell death protein 1 and soluble programmed cell death protein ligand 2 are increased in systemic lupus erythematosus and associated with the disease activity. *Lupus*. 2020;29(7):686–96.
260. Fukasawa T, Yoshizaki A, Ebata S, Nakamura K, Saigusa R, Miura S, et al. Contribution of Soluble Forms of Programmed Death 1 and Programmed Death Ligand 2 to Disease Severity and Progression in Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheumatol*. 2017 Sep 1;69(9):1879–90.
261. Zhang Y, Chung Y, Bishop C, Daugherty B, Chute H, Holst P, et al. Regulation of T cell activation and tolerance by PDL2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Aug 1;103(31):11695–700.
262. Akbari O, Stock P, Singh AK, Lombardi V, Lee W-L, Freeman GJ, et al. PD-L1 and PD-L2 modulate airway inflammation and iNKT-cell-dependent airway hyperreactivity in opposing directions. *Mucosal Immunol*. 2010 Jan 9;3(1):81–91.
263. Liang SC, Greenwald RJ, Latchman YE, Rosas L, Satoskar A, Freeman GJ, et al. PD-L1 and PD-L2 have distinct roles in regulating host immunity to cutaneous leishmaniasis. *Eur J Immunol*. 2006 Jan;36(1):58–64.
264. Simeón-Aznar CP, Fonollosa-Plá V, Tolosa-Vilella C, Espinosa-Garriga G, Ramos-Casals M, Campillo-Grau M, et al. Registry of the Spanish Network for Systemic Sclerosis: Clinical Pattern According to Cutaneous Subsets and Immunological Status. *Semin Arthritis Rheum*. 2012 Jun;41(6):789–800.
265. Muratore F, Kermani TA, Crowson CS, Green AB, Salvarani C, Matteson EL, et al. Large-vessel giant cell arteritis: a cohort study. *Rheumatology*. 2015 Mar 1;54(3):463–70.
266. Sivadasan A, Muthusamy K, Patel B, Benjamin R, Prabhakar A, Mathew V, et

- al. Clinical Spectrum, Therapeutic Outcomes, and Prognostic Predictors in Sjogren's Syndrome-associated Neuropathy. *Ann Indian Acad Neurol.* 2017 Jul 1;20(3):278–83.
267. Yao Y, Ma JF, Chang C, Xu T, Gao CY, Gershwin ME, et al. Immunobiology of T Cells in Sjögren's Syndrome. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2021;60(1):111–31.
268. Fonseca VR, Romão VC, Agua-Doce A, Santos M, López-Presa D, Ferreira AC, et al. The Ratio of Blood T Follicular Regulatory Cells to T Follicular Helper Cells Marks Ectopic Lymphoid Structure Formation While Activated Follicular Helper T Cells Indicate Disease Activity in Primary Sjögren's Syndrome. *Arthritis Rheumatol.* 2018 May 1;70(5):774–84.

10. Anexos

10.1. Anexo 1. Financiación

Los trabajos que forman parte del proyecto de esta tesis doctoral se financiaron con una beca de investigación del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) y la Federación Española de Enfermedades Raras (FEDER): FIS PI13/0065.