



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA



**AVALIAÇÃO ESTEREOLÓGICA DA GLÂNDULA SALIVAR MENOR EM
PACIENTES COM SUSPEITA DE SÍNDROME DE SJÖGREN**

Cacilda Satomi Yano Mallmann

MANAUS

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA



**AVALIAÇÃO ESTEREOLÓGICA DA GLÂNDULA SALIVAR MENOR EM
PACIENTES COM SUSPEITA DE SÍNDROME DE SJÖGREN**

Cacilda Satomi Yano Mallmann

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Imunologia Básica e Aplicada do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Prof^o Dr. Luiz Fernando de Souza Passos

Coorientador: Prof^o Dr. Oscar Tadeu Ferreira da Costa

MANAUS

2017

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

M254a Mallmann, Cacilda Satomi Yano
Avaliação estereológica da glândula salivar menor em pacientes com suspeita de Síndrome de Sjögren / Cacilda Satomi Yano Mallmann. 2017
85 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Luiz Fernando de Souza Passos
Coorientador: Oscar Tadeu Ferreira da Costa
Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Síndrome de Sjögren. 2. Glândula Salivar Menor. 3. Estereologia. 4. Densidade de volume. 5. Linfócitos. I. Passos, Luiz Fernando de Souza II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

AGRADECIMENTOS

Que bom estar aqui agradecendo, àqueles que direta ou indiretamente me permitiu concluir este trabalho, tão sonhado e sofrido. A Deus primeiramente pela minha vida, sempre plena e cheia de oportunidades e porque não dizer sorte. Sorte de ter uma família linda que sempre me deu muito orgulho e a certeza de estar fazendo a coisa certa, que sofreram e sofrem com a minha ausência, mas nunca deixaram de me apoiar nas minhas escolhas. Obrigada Enji meu primogênito sempre pacato e sensato, Kim o extrovertido, alegre e sempre à disposição, Tomi o carinhoso e expert em tudo que faz, além de excelente fotógrafo e perfeccionista, Samy o caçulinha, dengoso mas muito esperto, e Júnior meu esposo, companheiro de todas as horas apesar de não gostar muito das minhas escolhas nunca deixou de me apoiar e me ajudar com as tarefas do dia a dia e me poupar de muitos afazeres domésticos. Ao meu pai que foi a minha referência de vida, nunca via obstáculos ou dificuldades, sempre positivo e otimista, sei que sempre esteve comigo nesta minha luta. A minha mãe por ter me criado e educado com princípios rígidos, os quais sempre me guiam. Agradeço a Miwa minha sobrinha querida, minha filha mais velha, que sempre me apoiou e está comigo nesta e em tantas outras lutas. Ao meu irmão Claudio e minha cunhada Eva que sempre estão por perto me ajudando, e apoiando além do auxílio didático na organização do trabalho, incansável muito obrigada cunhada.

Agradeço aos meus colegas do PPGIBA, pelo companheirismo nesta luta e pelos momentos saudosos que passamos juntos, as alegrias e as decepções, além do desespero com o professor João Santana, serão únicos. A professora Dr^a Aya Sadahiro, que no momento de fraqueza pela doença que me acometia, me deu força e direção, que me fizeram perseverar e seguir. Ao Dr. Antônio Luiz Ribeiro Boechat Lopes que no momento de dúvidas me ensinou a trilhar e ver o caminho a seguir.

Aos colegas do Laboratório de Análises Clínicas do HUGV, meus companheiros de labuta que sempre me incentivaram e impulsionaram para a conclusão deste trabalho, principalmente às professoras Dras. Leila e Ermelinda, minhas queridas chefas a quem não tenho palavras para agradecer tamanho incentivo, serei eternamente grata.

Agradeço aos Serviço de Patologia da Faculdade de Medicina da UFAM, nas pessoas do professor Jeconias Câmara, Maria de Fátima Barbosa, Sr Cleuto e Leila pela acolhida e que com muita boa vontade e paciência ajudaram-me inúmeras vezes na procura de lâminas e dados de pacientes.

Um agradecimento especial a professora Dra. Tatyana Nayara Libório dos Santos, minha guru e Coordenadora, pelo ensino na análise histológica da glândula salivar menor, além da contribuição importantíssima da visão do patologista e experiência profissional, também a Profa Dra Nikeila Chacon de Oliveira Conde da Faculdade de Odontologia, na viabilização para obtenção das amostras e o cuidado dispensado ao mesmo.

Agradeço ao Serviço de Reumatologia, sempre atenciosos e prontos em me atender na busca e recrutamento dos prontuários.

Agradeço ao Dr. Rafael Pereira, residente de Oftalmologia pelos exames e sempre à disposição.

O meu muito obrigado aos colegas do Laboratório de Microscopia Quantitativa, Eriene Santos do Carmo e Raphael Maciel dos Santos, pela amizade, apoio e carinho que envolveu nosso ambiente de trabalho e ao Dr. Fernando Barcelos e a Rosilene Ribeiro Campos do Laboratório de Histologia pela preparação dos corantes e o empenho no sucesso da coloração das lâminas de resina, os quais não foram fáceis.

Ao Profº Dr. Luiz Fernando de Souza Passos meu orientador pelos ensinamentos e direcionamento deste trabalho e a aplicação de sua vasta experiência profissional.

A Juliana Lameiras, pela amizade e o ensinamento no uso da ferramenta de indexação (ENDNOTE) sem os quais não conseguiria organizar e formatar de modo mais fácil este trabalho.

Por fim, agradecimento especial ao Professor Dr. Oscar Tadeu Ferreira da Costa que me segurou pelas mãos e me conduziu pelos caminhos tortuosos, com os quais consegui trilhar e chegar até aqui. Agradeço a paciência, a dedicação e a amizade sem os quais não poderia concluir este trabalho, peço a Deus de todo coração para abençoá-lo sempre.

RESUMO

No diagnóstico da Síndrome de Sjögren (SS) usamos os critérios aprovados pela American College of Rheumatology (ACR), que é uma doença inflamatória crônica do tecido epitelial das glândulas de secreção exócrina. É caracterizada por alterações imunológicas como a infiltração das glândulas salivares e lacrimais por linfócitos T CD4⁺ e linfócitos B e pela presença de autoanticorpos contra antígenos nucleares. Do ponto de vista experimental, as metodologias envolvidas nesta caracterização são suscetíveis ao viés, visto que se baseiam em uma área extremamente restrita de tecido a ser analisado e têm o potencial de gerar resultados com baixa precisão e acurácia. A proposta neste trabalho foi padronizar medidas morfométricas usando estereologia na glândula salivar menor (GSM) de pacientes suspeitos de SS afim de garantir precisão e acurácia na determinação de SS. Para tal, 10 biópsias de mulheres foram processadas histologicamente e incluídas em resina acrílica. Seções seriais (6-13/biópsia) foram coradas após a fragmentação da biópsia em blocos orientados ao acaso, para permitir a obtenção de seções isotrópicas (*orientator*). Campos de vista escolhidos de forma uniforme, sistemática e ao acaso foram fotografados em Estereomicroscópio Digital System e analisados quantitativamente. Aplicando os critérios da ACR para SS, houve segregação dos pacientes em Grupo Não-SS e Grupo SS. Na avaliação da densidade de volume dos componentes das GSMs (test-t) houve um aumento significativo na proporção de linfócitos do Grupo SS ($p = 0,033$). Os demais componentes não apresentaram alterações significativas. O número de linfócitos ($p = 0,025$) e infiltrados linfoplasmocitários ($p = 0,038$) estiveram aumentados no Grupo SS, contudo nenhuma alteração significativa foi observada no número de plasmócitos e no volume das GSMs entre os grupos. Na determinação do volume da GSM o coeficiente de erro manteve-se abaixo de 5%. O número de seções avaliadas influencia a precisão e acurácia dos resultados. Não há correlação entre os dados patológicos e o estereológico na avaliação dos infiltrados linfocitários. Concluímos que a análise estereológica fornece informações detalhadas que podem implementar e complementar os achados no diagnóstico da Síndrome de Sjögren.

Palavras-chave: Síndrome de Sjögren, glândula salivar menor, estereologia, densidade de volume, linfócitos.

ABSTRACT

Sjögren's syndrome (SS) is a chronic inflammatory disease that affects the epithelial tissue of exocrine secretion glands, characterized by immunological changes as the infiltration of salivary and lacrimal glands by CD4 + T lymphocytes and B lymphocytes and the presence of autoantibodies against nuclear antigens. Genetic, hormonal and environmental factors are also important in its pathogenesis. In its diagnosis are used different criteria approved by the American College of Rheumatology (ACR) and the European Call Against Rheumatism (EULAR) which include semi-quantitative histological examination of samples of minor salivary glands sublabial processed in paraffin and stained with hematoxylin-eosin (foci scores; 50 lymphocytes/4 mm²). From the experimental point of view, this method is susceptible to bias, since it is based on an extremely limited area of tissue to be analyzed and has the potential to result in lower precision and accuracy. In an attempt to minimize such bias this proposal aims to standardize quantitative morphometric measurements in minor salivary gland biopsies (GSM) in SS suspected patients using stereological tools free of systematic bias, therefore, to ensuring precision and accuracy in morphometry. Such tools allow the detection of minimal morphological changes that would otherwise be overlooked by semi-quantitative assessment of routine. To this end, 10 biopsies of female patients suspected of having SS were histologically processed and embedded in acrylic resin hydroxyethyl methacrylate (Technovit 7100, Heraeus-Kulzer, Germany). The blocks containing the biopsy fragments were randomly oriented to allow obtaining isotropic sections (Orientator). Serial sections (6-13/biopsy) were stained with eosin hematoxylin and Harys. Fields of view chosen in a uniform, systematic and random way were photographed and analyzed quantitatively using appropriate software (IMOD 4.5/Stereology). Based on the criteria for the diagnosis of SS by the ACR, patients were divided into Group Non-SS (N = 4; 0-1 satisfied criterion) and SS group (N = 6; 2-3 criteria met). In evaluating the density of the components of GSMs (t-test), there was a significant increase in the proportion of lymphocytes in the SS group ($p = 0.033$). The other components showed no significant changes. The number of lymphocytes ($p=0.025$) and lymphoplasmacytic infiltrates ($p = 0.038$) were increased in the SS group, but no significant change was observed in the number of plasma cells and the volume of GSMs between groups. The CE of GSM Cavalieri volume remained below 5%. The number of evaluated sections influences the precision and accuracy of the results. There is no correlation between pathological score and stereological evaluation of lymphocytic infiltrates. The SS group was characterized by the presence of positive values for the Anti-SSA antibodies/Anti-SSB, high focal score and reduced dry score. We conclude that quantitative analysis of GSM by stereology provides detailed information that can implement and complement the laboratory and clinical findings in the diagnosis of Sjögren's syndrome.

Keywords: Sjögren's syndrome, minor salivary gland, stereology, volume density, lymphocytes.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Sigla	Descrição
AAL	Ambulatório Araújo Lima
ACR	(American College of Rheumatology) Colégio Americano de Reumatologia
AIDS	Síndrome de imunodeficiência adquirida
ANOVA	Análise de Variância One-Way
Anti-SSA	Anticorpo Anti-Ro
Anti-SSB	Anticorpo Anti-La
AQP	Aquaporina
CD4+	Cluster of differentiation (molécula que se expressa na superfície de algumas células T)
CE	Coeficiente de erro
CG	Centro Germinativo
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DPML	Departamento de Patologia e Medicina Legal
DR3; DR4	Frações de um haplótipo multigênico ligado a doença autoimune
ES	Esclerose sistêmica
ESCLERO	Esclerodermia
EULAR	(European-Criteria Consensus Group) Concenso americano – Europeu
FAN/ANA	Fator anti nuclear
FAO	Faculdade de Odontologia
FR	Fator Reumatóide
FSE	Fluxo salivar estimulado
FSR	Fluxo salivar em repouso
GSM	Glândula salivar menor
GTA	Glutaraldeído
HBSAg	(Hepatitis B surface antigen) Antígeno de superfície da Hepatite B
HCV	(Hepatitis C virus) vírus da hepatite C
HE	Hematoxilina eosina
HIV	(Human immunodeficiency virus) vírus da imunodeficiência
HUGV	Hospital Universitário Getúlio Vargas
IUR	(Isotropic Uniform Random) Seções uniforme isotrópico ao acaso
LAMIQ	Laboratório de Microscopia Quantitativa
OD	Olho direito

OE	Olho esquerdo
PCR	Proteína C Reativa
SS	Síndrome de Sjögren
SSDAI	Systemic Sjogren Disease Activity Index
SSp	Síndrome de Sjögren primária
SSsec	Síndrome de Sjögren secundária
SURS	(Systematic Uniform Randon sampling) Amostragem uniforme sistemática ao acaso
SUS	Sistema único de saúde
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TFH	T folicular helper
TS	Teste de Schimer I
VUR	(Vertical Uniform Randon) Seções uniforme verticais ao acaso

LISTA DE FIGURAS

Ordem	Descrição
Figura 1	Esquema de contagem de pontos segundo o Princípio de Cavalieri.....23
Figura 2	Coleta das GSMs.....30
Figura 3	Esquema com as etapas envolvidas na orientação e quantificação das biópsias avaliadas no presente estudo.....35
Figura 4	Estruturas observadas da Glândula Salivara Menor.....42
Figura 5	Ácino preservado (Ap); Ácino alterado (Aa); Vaso (V); ducto estriado (De) ; Ducto intercalar (Di) e Tecido adiposo (Ta) no aumento de 400x43
Figura 6	Localização dos focos linfocitários: A) Foco perivascular; Foco periductal + periacinar; C) Foco perivascular + periacinar, no aumento de 200x44
Figura 7	Diferentes Tipos de infiltrado inflamatório: A) Foco linfocitário; B) Foco plasmocitário; C) Foco linfoplasmocitário; D) Plasmócitos e Linfócitos45
Figura 8	Comportamento do Grupo Não-SS e Grupo SS em relação ao escore seco, escore focal e avaliação de anticorpos observado no presente estudo50
Figura 9	Estimativa do volume da GSM segundo Cavalieri.....50
Figura 10	Estimativa do coeficiente de erro da avaliação do volume pelo método de Cavalieri.....51
Figura 11	Efeito do número de seções utilizadas em relação ao volume da GSM...51
Figura 12	Análise morfométrica (densidade de volume) dos componentes estruturais que compõem a GSM dos pacientes do Grupo Não-SS e Grupo SS.....52
Figura 13	Contagem de perfis de linfócitos, plasmócitos e total linfoplasmocitário.53
Figura 14	A. Distribuição dos escores da contagem de focos linfocitários pelo patologista e pelo estereologista sobre as mesmas seções das GSM. B. Regressão linear utilizando os dados anteriores. $y = 0,150x + 0,443$; $R^2 = 0,39$54
Figura 15	Comportamento do Grupo Não-SS e Grupo SS em relação a suas respectivas avaliações quantitativas de linfócitos e plasmócitos.....55

LISTA DE QUADRO E TABELAS

Quadro 1 – Desenho experimental da sequência encaminhamento dos pacientes ao longo da pesquisa.	26
Tabela 1. Aspectos gerais, dados clínicos, história familiar e dados dos pacientes que se encaixam (SS) e não se encaixam (Não SS) nos critérios propostos pelo Colégio Americano de Reumatologia de 2012.....	37
Tabela 2. Dados Oftalmológicos (Schimer e Score seco), bucais (sialometria) e laboratoriais dos pacientes que se encaixam (SS) e não se encaixam (Não SS) nos critérios propostos pelo Colégio Americano de Reumatologia de 2012.....	39
Tabela 3. Dados histopatológicos da glândula salivar menor (GSM) como ferramenta no diagnóstico da SS mostrando o estado da arquitetura glandular em pacientes que se encaixam (SS) e não se encaixam (Não SS) nos critérios propostos pelo Colégio Americano de Reumatologia de 2012.....	40
Tabela 4. Critérios segundo a ACR 2012 aplicados a pacientes que se encaixam (SS) e não se encaixam (Não SS) nos critérios propostos pelo Colégio Americano de Reumatologia de 2012.....	41
Tabela 5. Análise morfométrica (volume de Cavalieri, mm ³) das GSMs dos pacientes (biópsias) sugestivos de síndrome de Sjogren avaliados neste estudo. As regiões parenquimais e estromais foram separadas na contagem. Para cada região foi determinado o erro devido à contagem de pontos e a microtomia. O total representa a contribuição dos dois componentes e não representa a soma direta dos mesmos. O volume absoluto dos componentes é apresentado como mm ³	48
Tabela 6 Análise morfométrica das GSMs quanto a Densidade de Volume dos Componentes (princípio de Delesse Vol %)	49
Tabela 7. Comparação entre o score focal efetuados por especialistas na patologia e na estereologia sobre as seções histológicas das biópsias da GSM.	54

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	13
2 - REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1. Síndrome de Sjögren, conceito, consenso e epidemiologia	16
2.2. Glândulas salivares	19
2.3. Estereologia	21
3 – JUSTIFICATIVA	24
4 - OBJETIVOS.....	25
4.1. Objetivo Geral.....	25
4.2. Objetivos Específicos	25
5 - MATERIAIS E MÉTODOS	26
5.1.1 Aspectos Éticos	26
5.1.2 População estudada	26
5.1.3 Desenho experimental.....	26
5.1.3 Critérios de Inclusão	27
5.1.4 Critérios de Exclusão.....	27
5.1.5 Tamanho amostral.....	27
5.2 - Metodologia	27
5.2.1 Avaliação clínica no Serviço de Reumatologia	28
5.2.2 Avaliação no Serviço de Oftalmologia.....	28
5.2.3 Avaliação oral na Clínica de Odontologia.....	28
5.2.4 Exames Laboratoriais.....	29
5.2.5 Coleta e biópsia da Glândula Salivar Menor (GSM)	30
5.2.6 Processamento histológico	31
5.2.7 Orientação da biópsia e quantificação estereológica	31
5.2.8 Densidade de volume na GSM	32
5.2.9 Volume da GSM	33
5.2.10 Número de perfis celulares.....	33
5.2.11 Análise estatística	34
6 - RESULTADOS	36
6.1 Avaliação clínica.....	36
6.2 Avaliação estereológica da GSM	46
7 - Discussão	56
8 - Conclusão.....	62
9 - Referências	63

10. Anexos.....	74
<i>ANEXO 1 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa/HUGV.</i>	74
<i>ANEXO 2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)</i>	75
<i>ANEXO 3 Questionário de saúde Avaliação estereológica da glândula salivar menor em pacientes com suspeita de Síndrome de Sjögren</i>	77
<i>ANEXO 4 - Questionário Oftalmo-Reumato</i>	80
<i>ANEXO 5 Critério para diagnóstico da SS (versão revisada pelo Consenso Americano Europeu – AECG-2002)</i>	82
<i>ANEXO 6 Critérios de Classificação da Síndrome de Sjögren propostos pelo Colégio Americano de Reumatologia em 2012 (SHIBOSKI et al., 2012).</i>	83

1 - INTRODUÇÃO

A síndrome de Sjögren (SS) é uma doença inflamatória crônica, de natureza autoimune com importante participação de fatores genéticos, hormonais e ambientais, que envolve o tecido epitelial das glândulas exócrinas, particularmente salivares e lacrimais, que exibem manifestações imunológicas como a infiltração por linfócitos T CD4+ e, em menores quantidades, células T CD8+, linfócitos B e plasmócitos, que levam eventualmente a dano de ácinos e ductos e insuficiência secretória; e pela presença de autoanticorpos contra os antígenos nucleares anti-Ro e anti-La. Há predisposição genética ligada à região HLA, onde DR3 estaria ligado a SS primária e DR4 a SS secundária ou associada (BRITO et al., 1994; MAVRAGANI; MOUTSOPOULOS, 2010).

As doenças autoimunes como o lupus eritematoso sistêmico (LES), a artrite reumatoide (AR), a esclerose sistêmica (ES) e a SS se manifestam quando existe uma falha no sistema imune, resultando numa resposta agressiva contra o próprio organismo, com a formação de auto-anticorpos e linfócitos autorreativos (PARSLOW, 2001). Partindo desta definição, as doenças autoimunes classificam-se dentro de um espectro em que numa extremidade se encontram as doenças autoimunes “específica de órgão” como a tireoidite de Hashimoto e na outra extremidade as “doenças sistêmicas”, em que as lesões envolvem múltiplos órgãos (ex. LES). A SS é predominantemente uma doença localizada envolvendo as glândulas lacrimais e salivares, mas frequentemente há manifestações sistêmicas e lesões em outros tecidos epiteliais (epitélio vaginal, túbulos renais, hepatócitos), daí o termo “*epitelitis autoimune*”, além de manifestações neurais, vasculares e oncológicas (linfoma) (ROESCHER et al., 2009; MANOUSSAKIS; KAPSOGEOURGOU, 2010).

Existem dois tipos reconhecidos de SS: a primária e a secundária ou associada. A síndrome secundária ou associada é diagnosticada na presença de outras doenças do tecido conjuntivo como o LES, AR, ES. A primária não se associa a nenhuma outra colagenose. Ambas caracterizam-se pelo predomínio de ceratoconjuntivite seca, xerostomia, podendo ocorrer o envolvimento de glândulas exócrinas da vagina, da pele, dos sistemas respiratório, urinário e gastrintestinal. Porém, a principal manifestação da síndrome primária é a xerostomia. O diagnóstico da SS é muitas vezes despercebido, em parte pela diversidade e pouca especificidade dos sinais e sintomas, nem sempre evidenciados ao mesmo tempo. Consequentemente o período do aparecimento dos primeiros sintomas ao diagnóstico é

longo, podendo chegar a 10 anos (ASMUSSEN et al., 1997; MANTHORPE et al., 1997; GIOVELLI, 2013). Essa doença acomete principalmente o sexo feminino com uma prevalência de 9 mulheres para cada homem (FELBERG & DANTAS, 2006b), e idade de estabelecimento dos sintomas em torno dos 45 a 50 anos, sendo rara em crianças e jovens (SANTOS et al., 2007). Segundo VALIM e colaboradores (2013), existe a prevalência de síndrome seca em 18% em uma população brasileira, podendo chegar a 30% da população de idosos.

Para o diagnóstico da SS usam-se diferentes critérios. O mais atual foi o proposto pelo Colégio Americano de Reumatologia em 2012. Aplica-se a indivíduos com sinais/sintomas sugestivos de SS, se possuírem pelo menos 2 entre 3 critérios por eles estabelecidos: (i) Presença de anti-SSA-Ro e/ou anti-SSB-La; ou Fator Reumatóide positivo e ANA título $\geq 1:320$; (ii) Sialadenite linfocítica focal com presença de focos/score ≥ 1 foco/ 4mm^2 ; (iii) Ceratoconjuntivite seca com escore de coloração ocular ≥ 3 (válido para pacientes que não estejam em uso de colírio para glaucoma e não tenham sido submetido cirurgia em córnea ou estética de pálpebras nos últimos 5 anos). Neste contexto o exame decisivo é a histopatologia da glândula salivar menor (GSM) que possui alta sensibilidade e especificidade principalmente em pacientes com disfunção glandular e anticorpos negativos (DANIELS et al., 2011; GIOVELLI, 2013), onde podem ser encontrados focos de infiltração linfocítica, atrofia acinar, hipertrofia do epitélio ductal e, conseqüentemente, obstrução gradual da luz do ducto (DANIELS; WHITCHER, 1994). A quantidade de infiltrado linfocitário é avaliada respeitando-se o critério de que um grupo de mais de 50 linfócitos é um “foco” e contando-se a quantidade de focos em 4mm^2 de tecido (LEE et al., 1998).

Visto que o padrão morfológico das glândulas salivares fornece uma evidência substancial para o diagnóstico da SS, então os estudos que se comprometem em avaliar qualitativamente e quantitativamente essa estrutura devem ter o potencial em agregar valor ao diagnóstico de suas patologias. Para avaliar quantitativamente uma estrutura várias técnicas morfométricas estão disponíveis (BAAK; OORT, 1983; OORT; BAAK, 1983). Em comum, todas estão fundamentadas em uma amostragem orientada das estruturas de interesse e isso implica em dizer que a interferência do observador é preponderante no resultado final. Em outras palavras: se eu busco uma patologia/estrutura, eu a encontro, mesmo que a representatividade da mesma seja insignificante para o órgão como um todo. De um modo geral, essas metodologias são baseadas em “modelos analíticos pressupostos”

(*model-based*). Além da extrema influência do observador, a conclusão do estudo baseia-se em uma avaliação semi-quantitativa (quando ela existe). Atualmente as avaliações quantitativas apresentam uma característica "*design-based*", o que implica em: (i) o observador não tem efeito sobre a análise; (ii) a amostragem se dá de forma aleatória, uniforme, sistemática; (iii) os dados obtidos são passíveis de análise estatística (portanto geram uma medida central e medidas de dispersão). Em outras palavras, o observador sabe o quanto de erro está embutido em sua análise.

Uma das mais notáveis ferramentas quantitativas amplamente difundidas na área biológica a partir da década de 60 é a estereologia (UNDERWOOD, 1970; GUNDERSEN et al., 1988; HOWARD; REED, 2005; MOUTON, 2011). Estereologia é a ciência que possibilita a inferência estatística de parâmetros geométricos (3-D) a partir de informações amostradas espacialmente (2-D). Utilizando métodos estereológicos, parâmetros tais como o volume (GUNDERSEN; JENSEN, 1987; CRUZ-ORIVE, 1997), podem ser estimados de uma forma livre de qualquer erro sistemático (i.e. viés) referente à estratégia de amostragem e sem a necessidade de qualquer referência quanto à forma da estrutura a ser investigada. Com um determinado número de medidas, não excessivas (portanto, elevada eficiência), é possível obter medidas precisas da estrutura de interesse. A estereologia é uma ferramenta utilizada de forma crescente na medicina contribuindo na inserção de novos parâmetros em estudos de patologia experimental ou na caracterização de alterações morfológicas (GUNDERSEN et al., 1988).

Apesar das evidências disponíveis, ainda são escassos os estudos estereológicos envolvendo a SS associada e as alterações na GSM. Estima-se que existem entre 600 a 1000 GSMs na região submucosa na maior parte da cavidade oral. Aproximadamente 7% da saliva produzida provem das GSMs. Sendo uma biópsia de obtenção relativamente fácil, sua análise tem representatividade na afecção provocada pela SS nas glândulas exócrinas. Além disso, os procedimentos histopatológicos de rotina empregados para a quantificação dos focos linfocitários não consideram o emprego de seções seriais, uma característica essencial da estereologia, o que pode resultar em subestimação desse parâmetro e comprometer o diagnóstico na SS. Assim, o foco central deste estudo está em caracterizar morfometricamente a GSM de pacientes sugestivos de SS e agregar conhecimento à patogênese desta enfermidade.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Síndrome de Sjögren, conceito, consenso e epidemiologia

A SS é uma exocrinopatia inflamatória autoimune afetando predominantemente as glândulas salivares e lacrimais, levando ao quadro de olho seco, boca seca e hipertrofia de parótidas. Além das manifestações glandulares, apresenta manifestações extraglandulares que permitem classificar com uma doença sistêmica (RAMOS-CASALS et al., 2013).

O primeiro estudo extensivo sobre a SS foi realizada por (SJÖGREN, 1933), um oftalmologista sueco que estabeleceu a correlação entre um conjunto de sintomas associados: ceratoconjuntivite seca, artrite, boca seca, com ou sem a associação de aumento de glândula salivar. No entanto a primeira descrição da xerostomia ou a boca seca foi atribuída a (HADDEN, 1888), o estudo do componente lacrimal atribuído a (MIKULICZ, 1892), a origem sistêmica atribuída a (GOUGEROT, 1925) e a associação entre condições imunes atribuída a (HOUWER, 1927).

No entanto, a síndrome de Sjögren iniciou e atravessou o século XX em controversas definições e nomeações de acordo com diferentes pesquisadores e pelas associações efetuadas entre algumas condições sistêmicas relacionadas ao quadro descrito por Mikulicz ainda em 1892 (HOUWER, 1927; MORGAN; CASTLEMAN, 1953; GLEESON et al., 1986).

Diferentemente de SS onde há um predomínio de infiltrado linfocitário, doenças relacionadas com a IgG4 foram recentemente definidas como uma doença caracterizado por uma densa infiltração plasmocítica de IgG4 em diversos órgãos, causando fibrose, e lesões tumefativa. Entre os alvos principais estão as glândulas salivares e lacrimais. Foi relatado o caso de um homem de 66 anos que se apresentou com aumento da glândula salivar e grave hipofunção salivar sendo diagnosticado como doenças relacionadas à IgG4 com base em uma biópsia de glândula salivar labial (BAER et al., 2013).

Atualmente, foram estabelecidos critério para o estudo e diagnóstico da síndrome de Sjögren. Diante de uma variedade de sinais e sintomas, o seu diagnóstico só pode ser validado por um conjunto de critérios que relaciona as manifestações clínicas, os achados histopatológicos e os resultados de exames sorológicos, estudados nos pacientes com suspeita da doença. Desta classificação resultou no Consenso Americano - Europeu, em 2002 (VITALI et al., 2002; BARROS, 2010; TINCANI et al., 2013) (ANEXO 5).

Recentemente a American College of Rheumatology (ACR) (2012) propôs uma classificação baseada na presença e quantificação de Ceratoconjuntivite seca, avaliação histopatológica de glândula salivar menor e presença de anticorpos anti –SSA/Ro e/ou anti –SSB/La, três critérios puramente objetivos para o diagnóstico da síndrome (ANEXO 6).

Alguns autores revelam que a avaliação histopatológica de glândula salivar menor representa um dos exames mais importantes para o diagnóstico oral da SS, pois, desta forma podemos caracterizar o grau de comprometimento glandular causado pela reação inflamatória e relacionar a gravidade da síndrome (NEVILLE; DD; et al., 2009; NEVILLE; DOUGLAS; et al., 2009; BARROS, 2010; MORAES et al., 2010; TINCANI et al., 2013). Poderia ser considerado o “padrão ouro” para o diagnóstico.

A classificação da SS, consensual na literatura especializada, separa aquela que ocorre isoladamente, como síndrome primária (SSp), daquela em que os sintomas ocorrem concomitantemente a presença de doença do tecido conjuntivo como Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES), Artrite Reumatoide (AR) e esclerodermia, denominada de Sjögren secundária (SS sec) ou associada (LIQUIDATO; BUSSOLOTI FILHO, 2005; FELBERG & DANTAS, 2006b, a; MORAES et al., 2010; JIN; YU, 2013).

A síndrome de Sjögren tem distribuição mundial e afeta de 1 a 4 milhões de pessoas nos Estados Unidos. Segundo o Colégio Americano de Reumatologia, estima-se que 4 milhões de americanos tenham a Síndrome de Sjögren, muitos deles sem diagnóstico. Nove entre dez pessoas com Sjögren são mulheres (EPSTEIN; SCULLY, 1992; FERNANDES, 2009). Esta maior propensão feminina é mais prevalente em mulheres caucasianas, idade mediana (40 a 50 anos) que estabelecem o diagnóstico comumente na menopausa ou em idade mais avançada. Também pode ocorrer em crianças e adolescentes, porém é mais raro. Mulheres jovens com Sjögren podem apresentar complicações na gravidez. No Brasil, não se sabe o número exato de portadores da Síndrome de Sjögren (LIQUIDATO; BUSSOLOTI FILHO, 2005; FELBERG & DANTAS, 2006b; GOMES et al., 2011).

Segundo Gomes e colaboradores (2011), a SS está entre as três doenças sistêmicas autoimunes mais comuns, sendo a segunda doença reumatológica mais comum depois da AR. Por ser uma doença inflamatória autoimune crônica e sistêmica, ressalta-se o comprometimento glandular, a invasão e modificação do equilíbrio das glândulas exócrinas, principalmente lacrimais e salivares, evidenciada pela diminuição da secreção em

consequência ao intenso infiltrado linfoplasmocitário dos tecidos acometidos. Além do envolvimento sistêmico, pode apresentar comprometimento cutâneo, respiratório, renal, hepático, neurológico e vascular, mesmo que seja em menor frequência.

Nas doenças autoimunes um importante grupo de anticorpos direcionam-se contra antígenos celulares, compreendendo estruturas de núcleo e citoplasma, os quais são pesquisados por imunofluorescência indireta tendo como substrato células epiteliais humanas (Células Hep II). Esses anticorpos foram chamados inicialmente de anticorpos antinucleares (ANA-antinuclear antibodies), ou fator anti-nuclear (FAN). Alguns antígenos nucleares são moléculas proteicas associadas a RNA e são passíveis de serem extraídas do núcleo, daí o nome de antígenos nucleares extraíveis (ENA – extractable nuclear antigens), incluem anticorpos anti-Sm, anti-RNP, anti-Ro (SS-A) e anti-La (SS-B) (PRINCE; HOGREFE, 1998). Os anticorpos anti-Ro / SSA e anti-La / SSB têm sido tradicionalmente associado com LES e SS (YAMAMOTO, 2003). Anti-Ro / SSA e anti-La / SSB podem ser detectadas em 70-100% e 40-90%, respectivamente, de pacientes com SS (WENZEL et al., 2001), e a presença destes anticorpos é um dos critérios para o diagnóstico e classificação de SS.

As medidas precisas do fluxo salivar são requeridas para preencher diversos protocolos clínicos e experimentais. A importância disso está no fato de que ela pode nos dar uma ideia da qualidade da saúde oral e também sistêmica (LEITE et al., 2002). Sabemos que as glândulas estão integradas sob o controle neuronal através de complexos mecanismos regulatórios (FISCHER et al., 1998) e que a saliva é uma secreção rigorosamente controlada pelo sistema nervoso (SANTOS et al., 2007). Noventa e três por cento da secreção salivar é produzido por glândulas salivares maiores e apenas 7% pelas glândulas salivares menores (LIU et al., 2002). A xerostomia é um dos principais sintomas relatados pelos pacientes com SS (FELBERG & DANTAS, 2006b)

A patogênese envolvida na diminuição das secreções relacionadas à SS é complexa e diferentes fatores podem desempenhar um papel significativo no desenvolvimento da doença. Recentes estudos tem mostrado o envolvimento de receptores HLA (LINDAHL et al., 1985; MOUTSOPOULOS et al., 1986; LOISEAU et al., 2001), presença de anticorpos antireceptor muscarínico, localização das aquaporinas 5 (DELPORTE; STEINFELD, 2006; DELPORTE, 2009) e produção de citocinas (OXHOLM et al., 1992; AZUMA et al., 1997; ABU-HELU et al., 2001). No momento é evidente que a hipossalivação ou hiposecreção precede a

destruição da arquitetura glandular, visto que fenômenos moleculares são cruciais no mecanismo secretório.

Envolvidos no mecanismo de secreção salivar estão as aquaporinas (AQPs) que são proteínas amplamente distribuídas por todos os órgãos, desempenhando várias funções no corpo, inclusive a salivação. Aquaporinas (AQPs) estão envolvidas no transporte de água entre membranas e das 13 isoformas já conhecidas a AQP5 é encontrada em pulmões, córnea, glândulas salivares e lacrimais. Inclusive na glândula salivar, a AQP5 está localizada na membrana apical das células acinares do tipo seroso (BEROUKAS; HISCOCK; et al., 2002; TAKATA et al., 2004; HASEGAWA et al., 2011). AQP 5 trabalha em conjunto com o comando neural colinérgico acionado pelos receptores muscarínicos.

Olho seco também denominado xeroftalmia é a principal manifestação ocular da síndrome de Sjögren e ocorre por diminuição progressiva do componente aquoso do filme lacrimal, em função da destruição das glândulas lacrimais principais e acessórias. O paciente relata de forma subjetiva, ardor, comichão, sensação de areia ou corpo estranho, fotofobia (intolerância à luz). Ocorre também diminuição da produção de lágrimas e a sua qualidade (NISHIWAKI DANTAS, 2000). Ainda, pode apresentar dilatação das glândulas lacrimais, infecções oculares, blefarite (inflamação das pálpebras) e em casos mais graves podem ocorrer lesões como úlceras da córnea, ceratites ou ceratoconjuntivite (BARBOZA et al., 2008).

A xeroftalmia é diagnosticada utilizando testes que identificam a presença de lesão da córnea (ceratite punctata) causada pelo ressecamento (coloração com fluoresceína ou verde de lisamina ou ainda rosa bengala), ou medida da quantidade de lágrima (teste de Schirmer) (VAN BIJSTERVELD, 1969; AMERICAN ACADEMY OF OPHTHALMOLOGY, 2014). Outros testes menos usuais na prática clínica também estão disponíveis para a avaliação de pacientes com suspeita ou diagnóstico estabelecido de olho seco, como citologia conjuntival de impressão, análise do perfil proteico do filme lacrimal, medida da osmolaridade da lágrima e o teste de cristalização do filme lacrimal, dentre outros (FELBERG & DANTAS, 2006b).

2.2. Glândulas salivares

As glândulas salivares são divididas em maiores e menores, as maiores são em números reduzidos, porém se apresentam em duplas, são elas parótidas, submandibulares e

sublinguais, enquanto que as menores são numerosas variando entre 600 a 1000 pequenas glândulas que se espalham pela mucosa da cavidade bucal, exceto nas gengivas e na mucosa da porção anterior do palato duro (KING et al., 2004).

Cada glândula salivar é formada por elementos parenquimatosos revestidos e sustentados por tecido conjuntivo. O parênquima é formado por ácinos e um sistema de ductos. O tecido conjuntivo, por sua parte, forma o estroma glandular, que é composto por uma cápsula e septos conjuntivos que dividem grupos de ácinos e de ductos em lobos e lóbulos. O estroma, além de fornecer o suporte para o parênquima, contém os vasos sanguíneos e linfáticos e os nervos que suprem as glândulas.

A maioria das glândulas salivares menores é constituída por ácinos com células mucosas e serosas (semiluas), tendo por isso uma função glandular do tipo mista. Das glândulas salivares menores saem curtos ductos que se abrem na cavidade oral (KATCHBURIAN; ARANA, 1999).

A secreção salivar é um líquido aquoso que contém eletrólitos e uma mistura de proteínas que pode ser estimulada por agônistas muscarínicos, uma vez que o fluxo da água intracelular está relacionado com a expressão, localização e função de uma das principais proteínas de transporte de água que envolve a secreção salivar em resposta ao aumento da concentração de Ca^{2+} , como as aquaporinas (AQPs), elas tem sido muito estudadas. A presença de AQP1, AQP5 e AQP8 tem sido geralmente aceita por muitos, enquanto a presença de AQP3, AQP4, AQP6 e AQP7 ainda permanece controversa. Funcionalmente, AQP5 parece ser a única AQP, até agora, a ter um papel importante no processo de secreção salivar (DELPORTE; STEINFELD, 2006).

A principal característica patológica da SSj é o infiltrado linfocitário (foco) que consiste em agregados de linfócitos, começando ao redor dos ductos, depois vasos, ácinos, e depois envolvendo o lóbulo inteiro. Há uma destruição das células epiteliais pelo infiltrado linfocitário, levando a uma substituição do tecido glandular por células mononucleares. Células como histiócitos, mastócitos e monócitos também podem estar presentes nas glândulas de alguns pacientes, sendo rara a presença de células natural killer (DALAVANGA et al., 1985). Além do infiltrado linfoplasmocitário, outras características histopatológicas podem ser encontradas nos cortes histológicos de glândulas salivares menores dos pacientes com SS, como ectasia dos ductos, alteração na arquitetura acinar com consequente

substituição dos ácinos por fibrose; edema, proliferação vascular e progressiva substituição do parênquima por tecido adiposo (BARCELLOS; ANDRADE, 2005).

A maioria dos linfócitos presentes no infiltrado linfoplasmocitário é representada por células T, porém 10% a 20% dos linfócitos infiltrantes são células B. As células B são encontradas na maioria das vezes nas margens dos focos de infiltrados, mas também estão presentes como pequenos aglomerados dentro do parênquima (SPEIGHT et al., 1990)

Tem sido demonstrado que um aumento nos pequenos agregados de plasmócitos pode preceder os infiltrados de linfócitos focais (CLELAND-ZAMUDIO et al., 1993). A maioria dos linfócitos do infiltrado é representada por células T CD4+, que constituem 60% a 70% dos linfócitos infiltrantes, enquanto as células T CD8+ representam apenas 10% a 20% da população linfocitária (SKOPOULI et al., 1991).

Os plasmócitos presentes nas glândulas salivares dos indivíduos saudáveis produzem quase que exclusivamente anticorpos do isotipo IgA (ANDERSON et al., 1972). Nos pacientes com SS o infiltrado plasmocitário consiste de grandes quantidades de plasmócitos contendo IgG e IgM (ANDERSON et al., 1972; LANE et al., 1982; SPEIGHT et al., 1990) , com diminuição na porcentagem de células produtoras de IgA e aumento na porcentagem de plasmócitos contendo IgG (DE WILDE; KATER; et al., 1989).

Em estágios avançados da doença pode ser observada nas GSMs dos pacientes com SS a formação de estruturas linfóides que se assemelham a centros germinativos (CG). Estes CGs em glândulas salivares menores são formados por grandes agregados de células B, células T e densas populações de células proliferativas próximas a células dendríticas foliculares. A presença de CG ectópico tem sido documentada em órgãos não linfóides em muitas doenças autoimunes, sugerindo que a formação destas estruturas linfóides em órgão não linfóide tenha uma participação na patogênese de doença autoimune como a SS e AR (XANTHOU et al., 1999; AMFT et al., 2001; MUELLER et al., 2008).

2.3. Estereologia

Estereologia é a ciência que possibilita a inferência estatística de parâmetros geométricos (3-D) a partir de informações amostradas espacialmente (2-D). Utilizando métodos estereológicos, parâmetros tais como o volume (GUNDERSEN; JENSEN, 1987; CRUZ-ORIVE, 1997), a área superficial (BADDELEY et al., 1986) e o comprimento de curvas

(CRUZ-ORIVE, 1991) podem ser estimados de uma forma livre de qualquer erro sistemático (i.e. viés) referente à estratégia de amostragem e sem a necessidade de qualquer referência quanto à forma da estrutura a ser investigada. Com um determinado número de medidas ou cortes, não excessivas, é possível obter medidas precisas da estrutura de interesse. Em outras palavras é um instrumento de quantificação espacial de elementos singulares contidos em um determinado espaço. É capaz de medir o espaço considerado (espécime ou órgão) e quantificar (numericamente) os elementos constitutivos aí presente (partículas, células, micro-organismos ou quaisquer constituintes unitário). Obtém-se o quantitativo por volume total (somatório), e o quantitativo relativo ou densidade (contagem de elementos divididos por unidade de volume). A densidade de volume presume distribuição uniforme dos elementos. Caso não seja essa a realidade, usa-se o artifício da contagem em áreas compartimentadas aleatoriamente em duas dimensões chamadas de “perfis”. Partindo-se de um ponto inicial ao acaso, as medidas podem ser constantes a intervalos lineares ou angulares. Uma nova teoria estatística foi desenvolvida para prever a precisão das quantidades obtidas por esta estratégia de amostragem sistemática (GUNDERSEN; JENSEN, 1987; CRUZ-ORIVE, 1997).

O maior problema da amostragem e do seccionamento de tecidos e órgãos é a perda da dimensão (o que irá invariavelmente refletir em perda de informação); um objeto 3D (ex. pulmão) torna-se 2D em área (ex. seção histológica do pulmão), uma superfície (2D) torna-se uma linha (1D, ex. vaso), uma linha (1D) torna-se um ponto (0D) e um número (ponto 0D, ex. mastócito) é perdido. Uma abordagem estereológica resolve esse problema.

As glândulas salivares humanas tem sido alvo dos estudos estereológicos há longo tempo envolvendo diversos tratamentos experimentais como a ação do envelhecimento (SCOTT, 1977; DRUMMOND; CHISHOLM, 1984; SCOTT et al., 1987; ADI et al., 1994; MOREIRA et al., 2006; SØRENSEN et al., 2014), diabetes (LILLIU et al., 2014) e doenças autoimunes, inclusive SS (SPEIGHT et al., 1989; HISCOCK et al., 2006). A presença de infiltrados linfocitários na GSM é uma das mais notáveis características morfológicas da SS e sua quantificação estereológica tem sido investigada (MÜLLER, 1980; DE WILDE; VOOYS; et al., 1989). A presença de plasmócitos no infiltrado das GSMs em pacientes com SS tem sido relatada (YAROM et al., 2007).

Bonaventura Cavalieri (1598–1647) apresentou uma equação conhecida como princípio de Cavalieri, que representa a forma mais elegante de determinação de volume de qualquer estrutura, independentemente de sua forma ou complexidade a partir de seções seriais do objeto/órgão.

O exemplo clássico de amostragem sistemática 1-dimensional (D) é a estimativa de volume segundo o princípio de Cavalieri, onde o conteúdo da área A_i de n planos seccionais de distâncias fixas d de um objeto k são estimadas de acordo com a equação:

$$V = d \sum_{i=1}^n A_i$$

Na prática, a estimativa de volume pelo princípio de Cavalieri é resolvida sobrepondo-se uma sonda transparente (*grid*) contendo pontos precisamente desenhados sobre as fatias ou seções de um objeto (ou órgão) previamente obtidas por *SURS* (*systematic uniform random sampling*), *IUR* (*isotropic uniform random*) ou *VUR* (*vertical uniform random*). A única exigência é que a primeira seção seja obtida ao acaso sendo as demais, consequência dessa primeira seção. Reescrevendo a equação, temos:

$$V_t = \sum_{i=1}^n P_i \times (a/p) \times T_s, \quad \text{onde } V_t \text{ é o volume total a ser obtido, } \sum_{i=1}^n P_i \text{ é o número total}$$

de eventos (pontos) que incidem sobre a área da seção ou fatia, a/p é a área associada a cada ponto do grid e T_s é a distância entre as fatias ou seções seriais (UNDERWOOD, 1970; GUNDERSEN et al., 1988; HOWARD; REED, 2005; MOUTON, 2011).

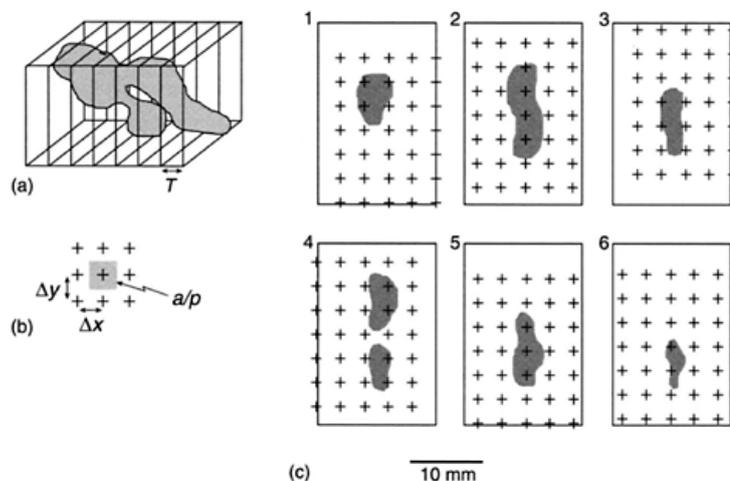


Figura 1 – Princípio de Cavalieri, sobreposição de uma sonda transparente (*grid*) contendo pontos precisamente desenhados sobre as fatias ou seções de um objeto (ou órgão) previamente obtidas por *SURS* (*systematic uniform random sampling*), *IUR* (*isotropic uniform random*) ou *VUR* (*vertical uniform random*).

3 – JUSTIFICATIVA

A síndrome de Sjögren apresenta sintomas comuns a outras patologias autoimunes, portanto a avaliação histológica é de fundamental importância para a definição diagnóstica e consta dos critérios de classificação adotados internacionalmente como os do Colégio Americano de Reumatologia (SHIBOSKI et al., 2012). A análise histológica semi-quantitativa de amostras de glândulas salivares menores processadas em parafina e coradas com hematoxilina - eosina (escores de focos; 50 linfócitos/4 mm²) é o método consensual usado de rotina para o diagnóstico e início do tratamento do paciente. Do ponto de vista experimental, contudo, tal metodologia é suscetível a erro, visto que se baseia em uma área extremamente restrita de tecido a ser analisado (HOWARD; REED, 2010), tem o potencial de gerar resultados com baixa reprodutibilidade, precisão e acurácia, como os resultados encontrados por SOTO-ROJAS & KRAUS (2002) em uma revisão realizada no período de 1983 a 1996, quando se avaliou a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo em biópsias de uma população normal o autor encontrou resultados falso-negativos oscilando entre 18% a 40% e resultados de biópsias positivas em 6 a 9%.

Como tentativa de minimizar esse viés o presente trabalho analisa a necessidade de se padronizar medidas morfométricas quantitativas em biópsias de GSMs na SS. Propõe-se o uso de ferramentas estereológicas livres de viés sistemáticos capazes, portanto, de garantir precisão e acurácia nas medidas morfométricas. Mesmo sendo um dos elementos chave para o diagnóstico da SS, ressalta-se que os aspectos morfológicos da SS vão além dos focos linfocitários, e afetam outros componentes das glândulas tais como ductos, ácinos e tecido conjuntivo, cujas informações quantitativas ainda são escassas e se computadas podem ter importante impacto no diagnóstico da síndrome.

4 - OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Avaliar possíveis vantagens da técnica de quantificação estereológica de biópsias de glândula salivar menor em pacientes com suspeita de Síndrome de Sjögren, quando comparada a métodos histopatológicos convencionais.

4.2. Objetivos Específicos

- a) Verificar precisão e acurácia da quantificação estereológica;
- b) Correlacionar os achados estereológicos com os histopatológicos convencionais de glândula salivar menor para o diagnóstico da Síndrome de Sjögren.
- c) Comparar os achados linfocitários da estereologia com os da histopatologia na classificação de pacientes com SS.
- d) Verificar se alterações estruturais em parênquima e estroma por estereologia, agregam valor à contagem de focos linfocitários no diagnóstico da Síndrome de Sjögren.

5 - MATERIAIS E MÉTODOS

5.1.1 Aspectos Éticos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas sob Número: 388.023 em 04/09/2013 (ANEXO 1).

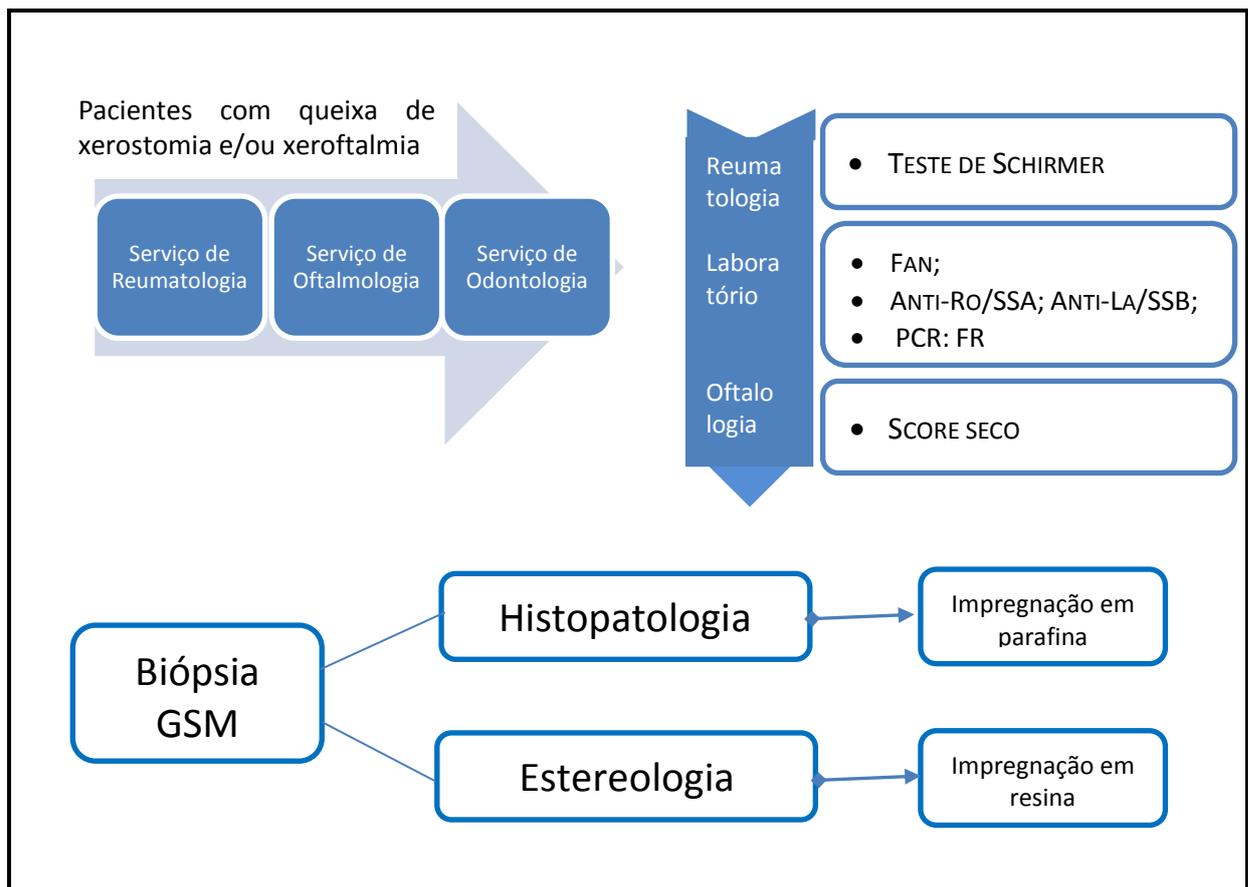
5.1.2 População estudada

- Pacientes com suspeita de síndrome de Sjögren, atendidos nos serviços de Reumatologia e Oftalmologia do Ambulatório Araújo Lima (AAL) e do serviço de estomatologia da Faculdade de Odontologia (FAO) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

5.1.3 Desenho experimental

- Trata-se de um estudo descritivo, transversal e prospectivo, inserido na Grande Áreas do Conhecimento (CNPq): Grande Área 4. Ciências da Saúde.

Quadro 1 – Desenho experimental da sequência de encaminhamento dos pacientes ao longo da pesquisa.



5.1.3 Critérios de Inclusão

- Pacientes com queixa de xeroftalmia e/ou xerostomia de qualquer sexo, idade e ancestralidade, atendidos no período de setembro de 2013 a junho de 2014.
- Foram aceitos pacientes portadores de alguma doença autoimune e em tratamento.

5.1.4 Critérios de Exclusão

- Pacientes que se submeteram a:
 - Radioterapia anterior de cabeça e pescoço
 - Infecção por Hepatite C
 - Infecção por vírus do HIV/AIDS
 - Linfoma preexistente
 - Sarcoidose
 - Amiloidose
 - Doença enxerto versus hospedeiro
 - Uso de drogas anticolonérgicas

5.1.5 Tamanho amostral

• O tamanho amostral dependeu do número de amostras de conveniência obtida no período de 10 meses de pacientes com queixa de xeroftalmia e/ou xerostomia e que concordaram com a realização da quantificação estereológica mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (ANEXO 2). Foram amostrados 10 pacientes neste estudo.

5.2 - Metodologia

Trata-se de um estudo em pacientes com suspeita de SS, atendidos nos Serviços de Reumatologia, Oftalmologia e Odontologia da Universidade Federal do Amazonas. Foram realizados avaliação clínica, escore seco de córnea e conjuntiva, pesquisa de autoanticorpos (anti-Ro, anti-La, FAN, Fator Reumatóide), sialometria e biópsia de glândulas salivares menores, analisados por histopatologia convencional e estereologia.

5.2.1 Avaliação clínica no Serviço de Reumatologia

Pacientes encaminhados à reumatologia e oftalmologia do Ambulatório Araújo Lima com queixa de xerostomia e/ou xeroftalmia, foram avaliados com anamnese e exame físico, questionamentos sobre as queixas e teste de Schirmer, visando o enquadramento nos critérios diagnósticos para a SS do American College of Rheumatology (ANEXO 3) quadro adaptado de Shiboski et al., 2012. Quando a suspeita era de SS associada à artrite reumatoide ou lúpus eritematoso sistêmico, foram aplicados os respectivos critérios. Nos pacientes com suspeita da doença aplicou-se o questionário validado internacionalmente (SSDAI – Systemic Sjogren Disease Activity Index) (ANEXO 4). Os pacientes ficaram em acompanhamento rotineiro no ambulatório, com consultas agendadas periodicamente.

5.2.2 Avaliação no Serviço de Oftalmologia

Após avaliação na Reumatologia, pacientes com suspeita de SS foram submetidos a avaliação ocular, que consta de exame oftalmológico geral e pontuação no escore seco à biomicroscopia com lâmpada de fenda com corantes fluoresceína e verde de lisamina, conforme padronizado internacionalmente (ANEXO 3).

5.2.3 Avaliação oral na Clínica de Odontologia

Para avaliação das manifestações orais foi considerada a presença de xerostomia, consistência salivar, dificuldade funcional na fala e deglutição, candidíase, tumefação na parótida, alterações na língua como fissuras e atrofia papilar, alterações da mucosa como edema, eritema, úlcera e pseudomembrana (ANEXO 5).

Todos os pacientes foram submetidos a testes como fluxo salivar estimulado (FSE) e em repouso (FSR) e foram realizadas biópsias de glândulas salivares.

Para a realização da sialometria é possível determinar o valor do fluxo salivar, medindo tanto o volume quanto o peso da saliva coletada. O método da expectoração ou “método do cuspe” é um método geralmente utilizado para medição do fluxo salivar (SANTOS et al., 2007).

Para a avaliação do fluxo salivar o paciente foi instruído a evitar comer, beber ou praticar atividades físicas até pelo menos uma hora antes do exame. Na avaliação do fluxo salivar em repouso (FSR), o paciente foi instruído a ficar com a cabeça posicionada no

encosto da cadeira odontológica por 6 minutos. A partir do primeiro minuto, permanecendo imóvel e retendo a saliva na cavidade bucal, sem degluti-la. A amostra do primeiro minuto foi dispensada e, a partir do segundo minuto foi coletada em um copo plástico (de café) até o fim dos 6 minutos. No momento seguinte, a amostra coletada foi pesada em uma balança de alta precisão, determinando um valor de fluxo utilizando a fórmula de miligrama equivalente a mililitro por minuto. Esse valor foi dividido por 5 para se obter o fluxo em mililitro por minuto. Os valores foram interpretados da seguinte forma: fluxo normal, maior ou igual a 0,2 ml/min; baixo fluxo, maior que 0,1 e menor que 0,2 ml/min; hipossalivação, menor ou igual a 0,1 ml/min (SOARES et al., 2008).

O fluxo salivar estimulado (FSE) diferiu do primeiro no momento em que o paciente foi orientado a mastigar uma borracha de parafina para a estimulação da produção salivar, seguiu o teste igualmente ao anterior, dispensou-se a primeira amostra e coletou as seguintes em um copo de café que foi pesado em balança de alta precisão. Os valores foram interpretados da seguinte forma: fluxo normal de 1,0 a 3,0ml/min; baixo fluxo, de 0,7 a 1,0 ml/min; hipossalivação, menos de 0,7ml/min (LOPES et al., 2009).

5.2.4 Exames Laboratoriais

O Fator anti nuclear (FAN), a proteína C Reativa (PCR), e as doenças infecciosas (HIV, HBsAg, anti-HCV) foram realizados no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Getúlio Vargas da Universidade Federal do Amazonas.

Amostras de soro da maioria dos participantes foram analisadas quanto à presença de anticorpos contra constituintes celulares pelo método da imunofluorescência indireta utilizando lâminas contendo células HEp-2, de acordo com as recomendações do fabricante (Viro-Immun, Alemanha), utilizando a diluição de 1:80 como triagem. As análises foram feitas por observadores experientes, sem conhecimento prévio do diagnóstico dos pacientes, em microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse E400), no aumento de 400x, e os padrões de fluorescência foram classificados de acordo com as recomendações do 3º Consenso Brasileiro para a Pesquisa de Auto anticorpos contra Constituintes Celulares - FAN HEp-2. As amostras foram classificadas como positivas quando apresentavam uma intensidade de fluorescência igual ou superior à do controle positivo de reatividade mínima (1+/4+), em qualquer compartimento celular (núcleo, nucléolo, citoplasma ou aparelho

mitótico). Amostras positivas na triagem foram diluídas sucessivamente em salina fosfatada tamponada (PBS) até o título de 1:2560, sendo considerado o título final aquele em que ainda era possível identificar um padrão morfológico bem definido e de intensidade mínima de fluorescência.

O PCR, foi realizado no aparelho automatizado Integra 400 plus marca Roche, pelo método turbidimétrico. O teste baseia-se na aglutinação das partículas de látex recobertas com anticorpos anti-PCR humana quando misturadas com soro de pacientes contendo PCR. A concentração de PCR na amostra é diretamente proporcional à aglutinação obtida, que é medida por turbidimetria (grau de turbidez).

Os exames para HIV, HBsAg e Anti-HCV foram realizadas no equipamento totalmente automatizado Architect i4000 marca Abbott, pelo método da quimioluminescência, teste imunológico baseado na emissão de energia luminosa a partir de uma reação química. As instruções do fabricante foram seguidas em todos os testes.

Os testes de Fator Reumatoide, e dos auto anticorpos anti-Ro e anti-La foram realizados em diferentes laboratórios da rede particular, por não disponibilizarmos estes exames no período do trabalho.

5.2.5 Coleta e biopsia da Glândula Salivar Menor (GSM)

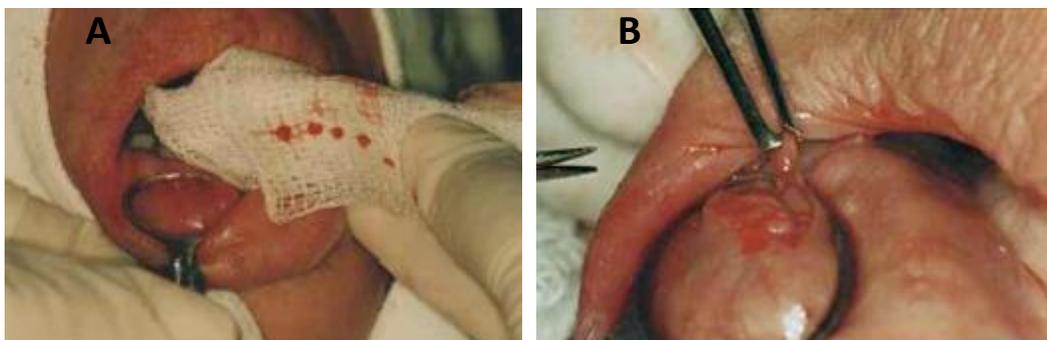


Figura 2. A. Localização da incisão para a dissecção da GSM. B. Retiradas das GSMs e individualizadas na gaze para processamento histológico. Imagens obtidas do site www.surgicalcosmetic.org.br

Foi utilizada a técnica em que uma incisão horizontal pequena abaixo do vermelhão do lábio inferior é realizada, utilizando Lidocaína a 2%, e foram retiradas de 3 a 5 glândulas salivares menores para análise e diagnóstico, conforme procedimento padrão. Este material

foi processado por meio de duas técnicas: **i)** uma das glândulas removidas foi imediatamente fixada por imersão em solução de glutaraldeído a 2,5% + solução tampão de fosfato de Na⁺ (pH 7,4; osmolaridade, aproximadamente 300mOsmol) e enviada ao Laboratório de Microscopia Quantitativa (LaMiq) da UFAM, Manaus, AM sob orientação do Prof^o Oscar Tadeu Ferreira da Costa, para as avaliações morfométricas e **ii)** o restante do material foi fixado em formol 10% e enviado ao Serviço de Patologia Cirúrgica do Departamento de Patologia e Medicina Legal (DPML) da UFAM.

5.2.6 Processamento histológico

O material enviado ao LaMiq foi desidratado em concentrações crescentes de etanol (70 e 96%) e emblocadas em resina histológica a base de hidroxietil-metacrilato (Technovit 7100[®], Külzer-Heraues, Alemanha). Seções seriais de 4µm equidistantes 25-100µm uma das outras foram obtidas a cada avanço na navalha sobre o bloco de resina no micrótomo (Leica RM 2145 microtome). Cada glândula foi representada por 6 a 13 seções, de acordo com o volume da glândula. Cada seção foi identificada quanto a sua sequência de corte e coradas com eosina e hematoxilina de Harrys. Brevemente, as seções foram mergulhadas por 1 min em eosina e 1 hora em hematoxilina de Harrys a 60° C (hematoxilina cristalizada, 1g; álcool absoluto, 10ml; sulfato de alumínio e amônio ou sulfato de alumínio e potássio, 20g; água destilada, 200ml; óxido de mercúrio (vermelho), 0,5g). Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada e montadas em Entellan, que é um meio de montagem permanente que fixa a lamínula na lâminas para microscopia. A eosina foi preparada como segue: eosina, 2g; dicromato de potássio, 1g; solução aquosa saturada de ácido pícrico, 20mL; álcool absoluto, 20 mL, água destilada, 160mL.

5.2.7 Orientação da biópsia e quantificação estereológica

A Figura 3 resume as etapas usadas para a orientação da biópsia antes da inclusão e a análise quantitativa efetuada. O objetivo desta etapa foi gerar aleatoriedade na orientação espacial das seções a serem obtidas. Ao girar ao acaso e de forma uniforme e sistemática as seções usando uma guia padronizada (*orientator*) introduziu-se isotropia nas seções, isto é, cada seção de biópsia é representativa do todo e tem o potencial para análise morfométrica livre de viés. O *orientator* é um procedimento estereológico para criar seções IUR (*isotropic*

uniform random). O procedimento começa por seleccionar um par de ângulos de um modo que a direcção descrita pelo par seja uniforme e ao acaso. Uma vez os ângulos escolhidos, uma técnica de corte é usada para seccionar o espécime em seções perpendiculares àquela direcção. Dessa forma cada biópsia incluída em resina foi levada ao micrótomo e a cada movimento deste uma seção IUR foi gerada. Diferente das seções rotineiras de um laboratório histológico, as seções IUR tem o potencial matemático e estatístico para a avaliação morfométrica.

5.2.8 Densidade de volume na GSM

A densidade de volume (%) dos componentes na GSM foi obtida pelo sistema de contagem de pontos (HOWARD; REED, 2010). Para tal, em uma primeira etapa, cada seção foi visualizada em sua totalidade e fotografada em baixo aumento (Leica EZ4D Estereomicroscópio Digital System, 8x). Em seguida, um sistema teste de contagem contendo linhas horizontais e verticais (quadrantes) foi sobreposto as imagens individuais para a seleção do campo de vista a ser analisado posteriormente. O programa de análise de imagens ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) foi utilizado nesta etapa através da técnica de amostragem sistemática uniforme ao acaso, SURS (*systematic uniform random sampling*), para a seleção dos campos de vista. Brevemente, o número total de quadrantes na GSM foi contado e em seguida esse valor foi dividido pelo número de campos de vista a ser analisado nessa seção histológica. No presente estudo, de 30 a 40 campos/seção foram selecionados para análise. Essa abordagem permite à seleção de campos de vista de forma aleatória e evita a interferência do observador, é eficiente e minimiza o viés nos resultados (GUNDERSEN; ØSTERBY, 1981). Os campos amostrados foram fotografados em maior aumento (objetiva PLAN 20x/0,4; ocular GSWH 10x/22) para posterior análise por meio de um fotomicroscópio Olympus BX-41 equipado com uma câmara digital Nikon Coolpix-5400 (Japão) para captura das imagens. Na etapa seguinte, cada imagem foi quantificada quanto à porcentagem de: ácino, fibrose, ducto estriado, ducto intercalar, vaso, linfócitos, plasmócitos e infiltrados linfoplasmocíticos. O programa de análise de imagens (módulo estereologia) IMOD 4.5 (KREMER et al., 1996) foi utilizado nesta etapa. Para tal, um sistema teste de contagem contendo pontos foi sobreposto a cada imagem para permitir a quantificação das estruturas citadas

anteriormente. A porcentagem de volume ocupado por cada componente em relação ao espaço de referência (parênquima + estroma = biópsia) foi calculado como:

$$Vv(\text{componente, espaço de referência}) = \frac{\sum_{i=1}^m P_{comp}}{\sum_{i=1}^m P_{ref}}$$

Onde Vv é a densidade de volume (volume fracional ou densidade relativa) de determinado componente, P_{comp} é a somatória de pontos que tocam determinado componente (ácino, fibrose, ducto estriado, ducto intercalar, vaso, linfócitos, plasmócitos e infiltrados linfoplasmocitário), e P_{ref} é a somatória de pontos que tocam o espaço de referência (biópsia).

5.2.9 Volume da GSM

A coleção de seções de biópsias de cada paciente (6 a 13 seções) foi utilizada para a determinação do volume da GSM. Através desta técnica pontos matematicamente distribuídos sobre um grid são sobrepostos sobre cada seção fotografada em baixo aumento (Leica EZ4D Estereomicroscópio Digital System, 8x). O volume total da GSM foi calculado como: $V_t = \sum_{i=1}^n P_i(a/p) * T_s$, onde $p \sum_{i=1}^n P_i$ é o número total de pontos sobre GSM, a/p é a área representada por cada ponto e T_s é a distância entre as seções seriais. Um coeficiente de erro de 5% e desvio de 15% foram considerados aceitáveis (GUNDERSEN; JENSEN, 1987).

5.2.10 Número de perfis celulares

Uma quantificação 2-D foi empregada para a determinação do número de perfis de linfócitos e plasmócitos. Como procedido anteriormente para a determinação da densidade de volume, a amostragem SURS de campos de vista foi efetuada e em cada campo selecionado foi disposto um sistema teste contendo uma moldura com linhas de inclusão e linhas de exclusão que serviram de referencial para a contagem de número de perfis. Os perfis de linfócitos (Q_{linf}) ou plasmócitos (Q_{plasm}) foram contados somente se eles estiverem no interior da moldura (área = A_f) e não tocassem a linha de exclusão e os resultados foram expressos como número de perfis/4mm² e calculados como:

$$Q_{mc} = \sum Q_{linf} \text{ ou } Q_{plasm} / \left(\sum ncv \cdot A_m \right)$$

Onde: $\sum Qmc$ é o número de perfis de linfócitos ou plasmócitos; $\sum ncv$ é o somatório de campos de vista analisados e Am é área da moldura.

5.2.11 Análise estatística

Os dados estereológicos foram avaliados para cada paciente e o estimador da variância foi determinado usando o coeficiente de erro (C.E.) para cada parâmetro. A precisão da estimativa do volume de referência segundo Cavalieri foi determinada de acordo

com (HOWARD; REED, 2010):

$$CE(\sum P) = \frac{\sqrt{\text{var } P}}{\sum P}$$

A $\text{var } P$ depende do “noise” (acurácia do sistema teste) e a variância da soma das áreas ($\text{var}_{\Sigma \text{area}}$): $\text{var } P = \text{noise} + \text{var}_{\Sigma \text{area}}$ (GUNDERSEN; JENSEN, 1987; HOWARD; REED, 2010).

Todos os valores foram apresentados como média \pm erro padrão da média. Os resultados foram analisados por meio de ANOVA (análise de variância one-way). Nos casos em que a diferença entre os grupos é indicada, o teste-t paramétrico de múltiplas comparações de Tukey foi utilizado para comparar os valores médios entre os grupos testados. Para avaliar a correlação entre os dois métodos aplicou-se o coeficiente de correlação de Pearson. O limite de confiança estabelecido para os testes foi de 5%.

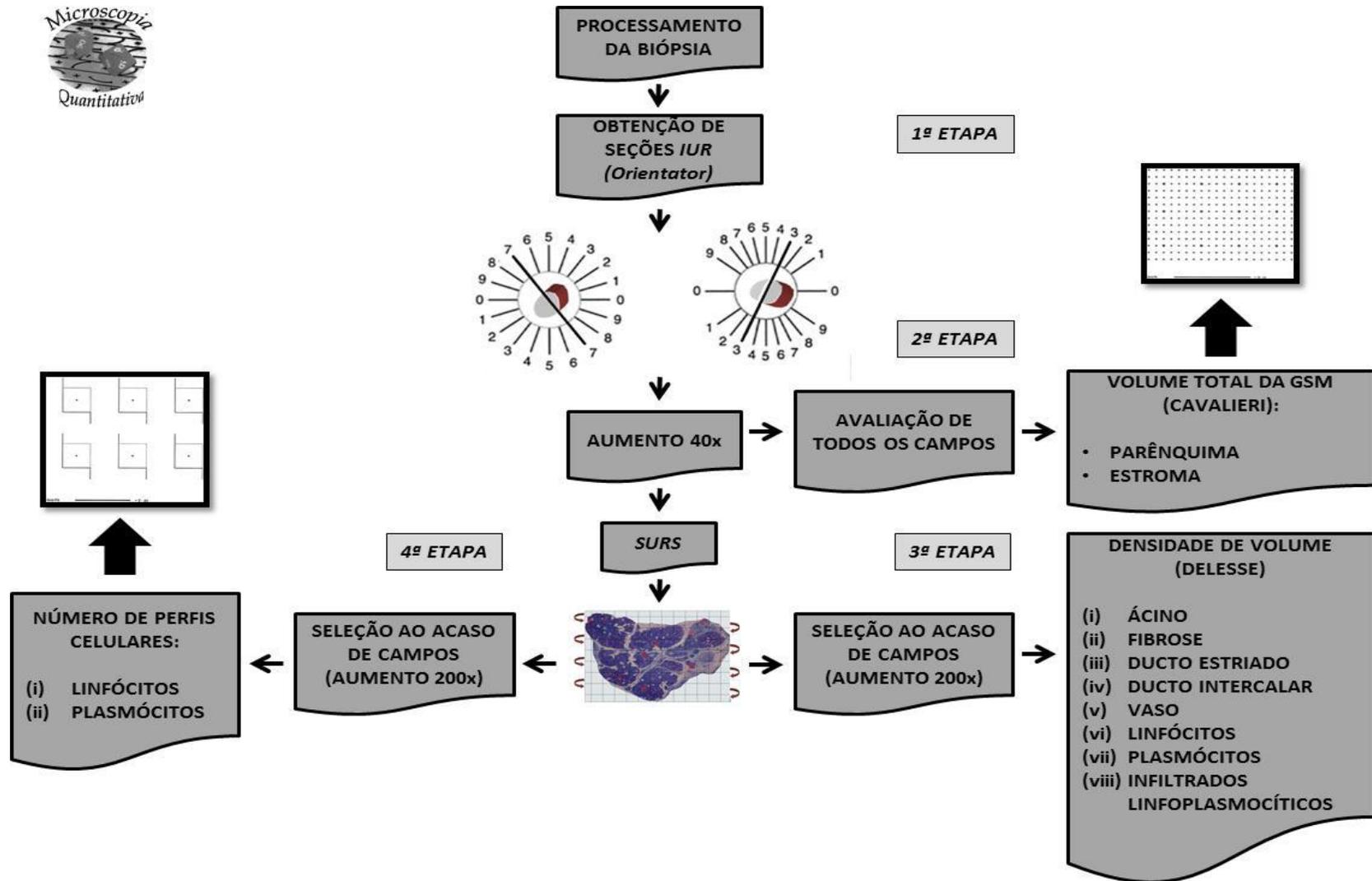


Figura 3. Etapas envolvidas na orientação e quantificação das biópsias avaliadas no presente estudo. Na 1ª. Etapa a biópsia fixada em Glutaraldeído e orientada através do orientator que permite a obtenção de seções isotrópicas uniforme e aleatória (IUR - Isotropic uniform random) livres de viés. Dois relógios com orientações determinadas orientam essa etapa. Na 2ª etapa o volume total da glândula salivar menor (GSM) é determinado pelo método de Cavalieri. Na 3ª etapa, após uma amostragem de campos sistemáticos e aleatórios (SURS – systematic uniform random sampling), a porcentagem de componentes internos a GSM é determinada pelo método de Delesse. Na 4ª etapa os mesmos campos fotografados são usados para a contagem de perfis celulares. Em ambas as contagens o tipo de grid empregado na quantificação é apresentado. O sistema teste de pontos é empregado para a determinação de volume e densidade de volume. O sistema teste de molduras com linhas de inclusão (pontilhadas) e exclusão (compactas) é empregado para a determinação do número de perfis de estruturas.

6 - RESULTADOS

6.1 Avaliação clínica

No período deste estudo foi possível amostrar 10 pacientes com suspeita de SS, com queixa de xeroftalmia e xerostomia, de acordo com os critérios de inclusão postulados.

Pela dificuldade de se obter glândulas salivares de pacientes controles dividiram-se os pacientes em dois grupos usando os critérios propostos pelo Colégio Americano de Reumatologia de 2012; (i) portadores da Síndrome de Sjögren (SS) e (ii) não portadores da síndrome (Não SS), como apresentados na tabela 4.

Todos os pacientes estudados foram do sexo feminino com idades variando entre 33 a 60 anos (Média 44,2 e mediana 42), porém com frequência maior na faixa etária dos 40 anos (n=3). Entre os 10 pacientes, 6 apresentavam artrite reumatoide (AR), 1 lúpus eritematoso sistêmico (LES), 1 esclerose sistêmica (ES), 1 eritema pigmentar fixo (EPFx) e 1 apresentava fibromialgia (FM) associada a osteoartrite (AO). Em relação ao histórico familiar, 7 pacientes apresentavam doença autoimune e três declararam não ter histórico familiar. Entre as comorbidades associada apenas 1 apresentou diabetes do tipo II (Tabela 1).

Nos dados oftalmológicos o teste de Schirmer demonstrou que a paciente 01 apresenta a menor produção de lágrimas tanto no olho esquerdo (OE) quanto no olho direito (OD), a paciente 06 apresentou uma quantidade de lágrima menor apenas no OD em relação ao OE. Os outros 6 pacientes apresentaram uma produção de lágrima entre 6 a 30 mm/5min, o que confere normalidade. Os pacientes 02 e 10 não tiveram os resultados informados (Tabela 2).

Em relação à determinação do score seco apenas os pacientes 06 e 09 apresentaram escore ≥ 3 graus indicando dano epitelial em ambos os olhos, os demais pacientes não apresentaram tal alteração e o paciente 04 não teve os dados informados para esse critério (Tabela 2).

Os dados bucais para sialometria em fluxo salivar sem estímulo indicou alteração nos pacientes 3, 4 e 5 com resultados de fluxo salivar baixo, entre 0,12 a 0,16 mL/min de salivação, os demais pacientes apresentaram fluxo salivar dentro da faixa estipulado para o teste. Em relação ao teste de fluxo salivar estimulado somente o paciente 4 apresentou hipossalivação (0,21 mL/min), os demais pacientes apresentaram o fluxo salivar dentro dos

parâmetros para o teste. O paciente 1, não teve a sialometria informada tanto no fluxo salivar em repouso quanto no fluxo salivar estimulado (Tabela 2).

Tabela 1. Aspectos gerais, dados clínicos, história familiar e dados dos pacientes que se encaixam (SS) e não se encaixam (Não SS) nos critérios propostos pelo Colégio Americano de Reumatologia de 2012.

	Dados pessoais			Dados clínicos		Comorbidade
	PACIENTE	SEXO	IDADE	Doença Presente	História familiar	
Não - SS	1	F	60	AR	SIM	DIABETES TIPO II
	2	F	58	AR	NÃO	
	4	F	42	AR	NÃO	
	9	F	47	FM; OA	SIM	
SS	3	F	34	LES	NÃO	
	5	F	42	AR	SIM	
	6	F	42	AR + ES	SIM	
	7	F	39	EPFX	SIM	
	8	F	33	AR	SIM	
	10	F	45	AR	SIM	

Legenda: AR= artrite reumatóide; FM= Fibromialgia; OA= Osteoartrite; LES= Lupus eritematoso sistêmico; ES= Esclerodermia sistêmica; EPFx= Eritema pigmentar fixo.

Em relação aos dados laboratoriais para o fator antinuclear (FAN), cinco pacientes apresentaram positividade, sendo que só três tiveram a titulação acima de 1:320 confirmados, porém o paciente 3 teve uma titulação baixa (1:160) e a paciente 10 não teve a titulação informada, dois pacientes apresentaram negatividade nos resultados. Quanto a presença do anticorpo anti-Ro, cinco pacientes apresentaram o teste positivo (POS), três negativos (NEG) e dois não informado (NI). Para o anticorpo anti-La, somente um paciente apresentou positividade (3), cinco dos pacientes apresentaram negatividade para o teste, e para dois o teste foi inconclusivo (5 e 7) e três pacientes não informaram os resultados do teste (Tabela 2).

O teste de fator reumatoide (FR) realizado não revelou positividade para nenhum dos pacientes deste estudo e quatro entre os pacientes não informaram o resultado. A proteína C Reativa (PCR) esteve presente em quatro dos pacientes estudados, dois pacientes foram não reativos para este teste e quatro não informaram os seus resultados. Nos testes para

doenças infecciosas (HIV, HCV e HBsAg) nenhum dos pacientes apresentaram positividade, o paciente 10 não informou os resultados para HIV, HCV e HBsAg, para o teste de HBsAg os pacientes 1, 2 e 4 não informaram os resultados deste teste (Tabela 2).

Os achados histopatológicos, corados pela HE convencional, quanto ao estado estrutural da arquitetura acinar observou-se que estavam alterados em todos os pacientes estudados. Em relação à presença ou ausência de alterações na GSM, observou-se que todos os pacientes apresentaram a presença de tecido adiposo e fibrose. De forma diferente a ectasia dos ductos só não foi observada em um dos pacientes (1), estando presente nos demais (Tabela 3).

A maior relação entre a presença de plasmócitos e linfócitos no campo microscópico analisados foi de ++/++, representando similaridade numérica entre as duas células (até 50%) no foco leucocitário, Em cinco dos pacientes ocorreram a predominância de linfócitos (+++), representando a ocorrência acima de 50% de linfócitos no foco leucocitário, a predominância de plasmócitos (+++) foi visualizada apenas no paciente 4 (Tabela 3).

O maior número de foco encontrado foi no paciente 10 com 3 focos linfocitários, enquanto que o maior escore focal encontrado foi no paciente 7 (1,6) e a variação da área glandular foi entre 6 a 9 mm². O centro germinativo não foi visualizado em nenhum dos pacientes estudados (Tabela 3).

Os focos linfocitários foram localizados predominantemente na região perivascular (6 dos pacientes) seguida da região periductal (5 dos pacientes) e na região periacinar os focos foram localizados apenas em 3 dos pacientes estudados. O paciente 6 apresentou foco linfocitário nas três regiões citadas (Tabela 3). As imagens representativas dos achados histopatológicos estão apresentadas nas Figuras 4-7.

A tabela 4 é o resumo dos nossos achados para interpretação dos critérios internacionais para o diagnóstico da SS e a figura 8 apresenta a versão gráfica evidenciando dois grupos diferentes, SS e não-SS. Como esperado, os grupos avaliados se segregam, embora um paciente de cada grupo se distancie do aglomerado, ainda assim compartilha os critérios que o definem em seu respectivo grupo.

Tabela 2. Dados Oftalmológicos (Schimer e Score seco), bucais (sialometria) e laboratoriais dos pacientes que se encaixam (SS) e não se encaixam (Não SS) nos critérios propostos pelo Colégio Americano de Reumatologia de 2012.

	DADOS OFTALMOLÓGICOS					DADOS BUCAIS		DADOS LABORATORIAIS							
	Paciente	SCHIRMER (mm/5min)		SCORE SECO		SIALOMETRIA (mL/min)		FAN	ANTI-RO	ANTI-LA	FR	PCR	HIV	HCV	HBSaG
		OD	OE	OD	OE	REPOUSO	ESTIMULADO								
Não - SS	1	0	5	0	0	NI	NI	NEG	NEG	NEG	NI	NI	NEG	NEG	NI
	2	NI	NI	0	0	0,70	1,70	NEG	NEG	NEG	NI	NI	NEG	NEG	NI
	4	10	10	NI	NI	0,16	0,21	NI	NI	NI	NI	NI	NEG	NEG	NI
	9	30	30	4	4	0,30	0,94	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SS	3	35	30	0	0	0,12	1,10	REA (NÚCLEO) Título 1:160	POS	POS	NEG	POS	NEG	NEG	NEG
	5	9	9	1	2	0,15	1,53	REA (NÚCLEO) Título 1:1280	POS	INC	NEG	POS	NEG	NEG	NEG
	6	2	14	5	5	0,21	1,54	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG
	7	28	28	0	0	0,46	1,75	REA (NÚCLEO) Título 1:5120	POS	INC	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	8	20	20	0	0	0,40	1,57	REA (NÚCLEO) Título 1:640	POS	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG
	10	NI	NI	0	0	0,46	1,75	REA	POS	NI	NI	NI	NI	NI	NI

VALORES DE REFERÊNCIA: SCHIRMER = Normal > 5 mm/5min; SCORE SECO= 0 - Normal, 1 ou 2 Artefato ou coloração tardia (+8min), 3 ou mais - Anormal; SIALOMETRIA= REPOUSO (Fluxo normal: > 0,2 ml/min; Baixo fluxo: > 0,1 <0,2 ml/min; Hipossalivação: < 0,1ml/min) e ESTIMULADO (Fluxo normal: 1,0 A 3,0 ml/min; Baixo fluxo: 0,7 A 1,0 ml/min; Hipossalivação: < 0,7 ml/min); FAN= título acima de 1:320. NI = Não informado. INC = Inconclusivo. NEG = Negativo. REA = Reagente.

Tabela 3. Dados histopatológicos da glândula salivar menor (GSM) como ferramenta no diagnóstico da SS mostrando o estado da arquitetura glandular em pacientes que se encaixam (SS) e não se encaixam (Não SS) nos critérios propostos pelo Colégio Americano de Reumatologia de 2012.

DADOS HISTOLÓGICOS (PATOLOGIA)																		
PACIENTE	ARQUITETURA ACINAR		Tecido Adiposo		Fibrose		Ectasia dos Ductos		CG		Infiltrado Inflamatório (1, 2 ou 3 cruces)		Foco/Quant	Score Focal	Área (mm ²)	Localização Foco		
	Preservada	Alterada	P	A	P	A	P	A	P	A	Linfócitos	Plasmócitos				Periductal	Perivascular	Periacinar
Não - SS	1	X	X	X				X	X	0	0	-	-	-	-	-	-	
	2		X	X	X	X			X	+++	+	1	1,3	3	X	X	-	
	4		X	X	X	X			X	+	+++	0	-	-	-	-	-	
	9		X	X	X	X			X	++	++	sem foco	-	-	-	-	-	
SS	3		X	X	X	X			X	++	++	1	1,0	4	-	X	-	
	5		X	X	X	X			X	++	++	2	1,0	8	X	-	X	
	6		X	X	X	X			X	+++	+	1	1,0	3	X	X	X	
	7		X	X	X	X			X	+++	++	2	1,6	5	X	X	-	
	8		X	X	X	X			X	+++	++	2	1,3	6	X	X	-	
	10		X	X	X	X			X	+++	+	3	1,3	9	-	X	X	

LEGENDA: Centro germinativo (CG), o grau de infiltrado inflamatório (+ = até 25%; ++ de 25% a 50% e +++ >50%). P = presença; A = ausência.
Score focal = (total de foco/área total) x 4

Tabela 4. Critérios segundo a ACR 2012 aplicados a pacientes que se encaixam (SS) e não se encaixam (Não SS) nos critérios propostos pelo Colégio Americano de Reumatologia de 2012.

Critério ACR 2012							
		Score seco		Dados laboratoriais			Histopatológicos
	Pacientes	OD	OE	FAN	Anti-Ro	Anti-La	Score focal
Não – SS	1	Não	Não	NÃO	NÃO	NÃO	-
	2	Não	Não	NÃO	NÃO	NÃO	1,3
	4	Não	Não	NÃO	NÃO	NÃO	-
	9	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	-
SS	3	Não	Não	NÃO	SIM	SIM	1,0
	5	Não	Não	SIM	SIM	NÃO	1,0
	6	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	1,0
	7	Não	Não	SIM	SIM	NÃO	1,6
	8	Não	Não	SIM	SIM	NÃO	1,3
	10	Não	Não	SIM	SIM	NÃO	1,3



Figura 4. Estruturas observadas da Glândula Salivara Menor, aumento 100x. Arquitetura acinar alterada (AC), ectasia dos ductos (D), Fibrose em tecido conjuntivo (F) e vasos (V) em pacientes com suspeita de Síndrome de Sjögren. Coloração Eosina 1% com Hematoxilina de Harris.

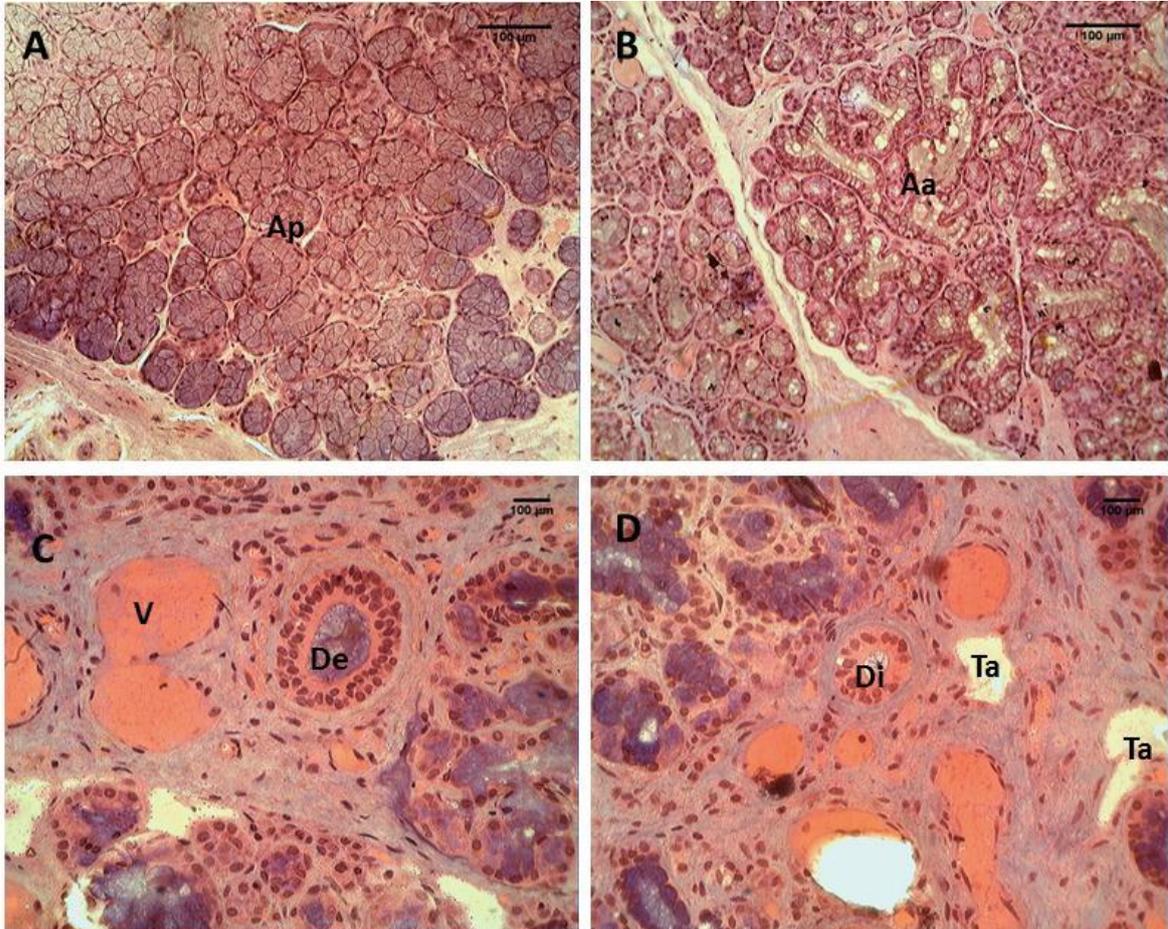


Figura 5. A) Ácino preservado (Ap) 200x; B) Ácino alterado 200x (Aa); C) Vaso (V) e ducto estriado (De) 400x; D) Ducto intercalar (Di) e Tecido adiposo (Ta) 400x, em pacientes com suspeita de Síndrome de Sjögren. Coloração Eosina 1% com Hematoxilina de Harris.

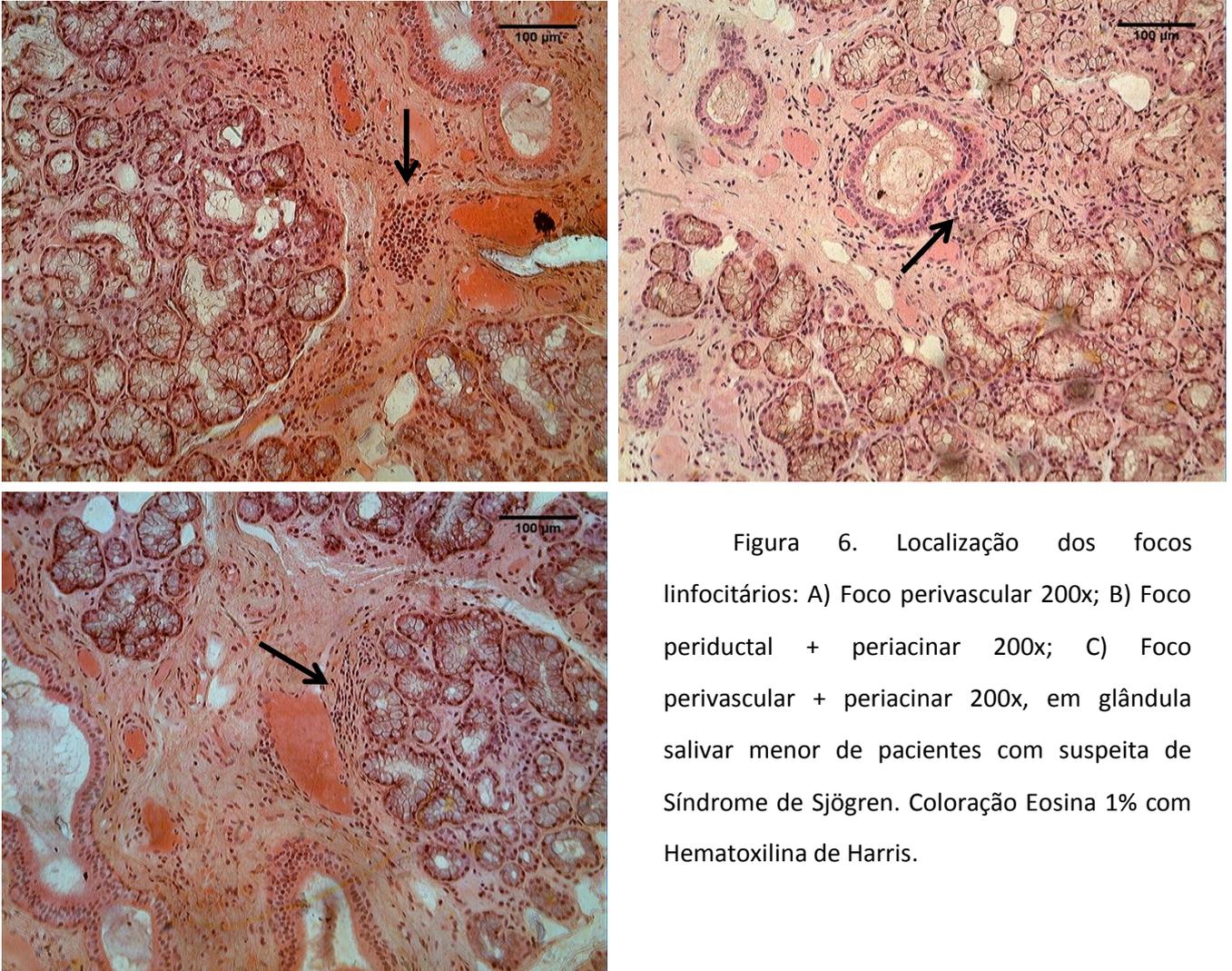


Figura 6. Localização dos focos linfocitários: A) Foco perivascular 200x; B) Foco periductal + periacinar 200x; C) Foco perivascular + periacinar 200x, em glândula salivar menor de pacientes com suspeita de Síndrome de Sjögren. Coloração Eosina 1% com Hematoxilina de Harris.

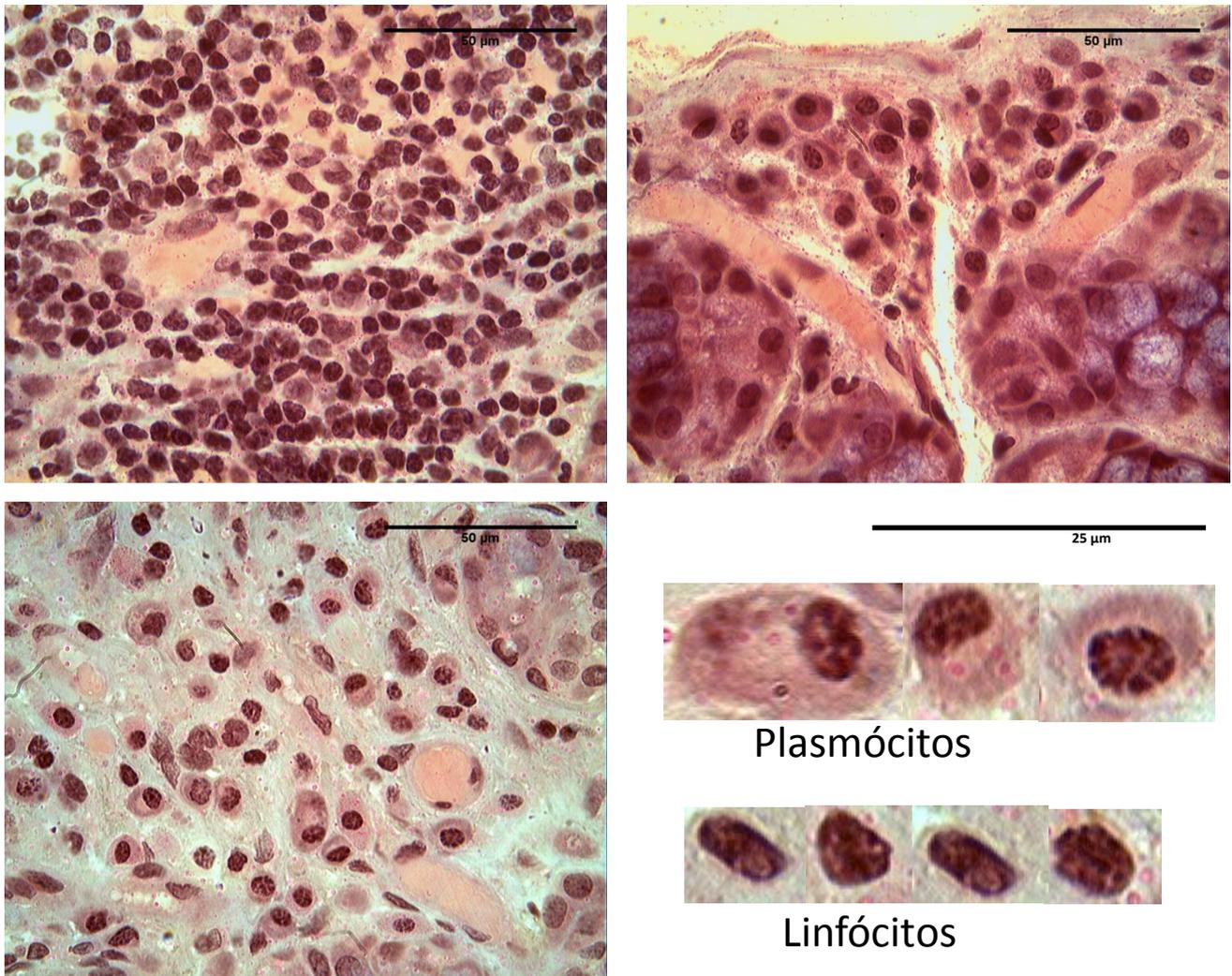


Figura 7. Tipos de infiltrado inflamatório: A) Foco linfocitário; B) Foco plasmocitário; C) Foco linfoplasmocitário; D) Plasmócitos e Linfócitos, todos no aumento de 1000x, em glândula salivar menor de pacientes com suspeita de Síndrome de Sjögren. Coloração Eosina 1% com Hematoxilina de Harris.

6.2 Avaliação estereológica da GSM

A Tabela 5 apresenta a estimativa dos volumes absolutos do material biológico avaliado (biópsia) para cada paciente, bem como o coeficiente de erro (CE) observado devido à técnica empregada (contagem de pontos) e devido à imprecisão obtenção das seções seriais (microtomia). Nesta análise a GSM foi quantificada quanto ao volume absoluto de parênquima e estroma. A maior biópsia avaliada apresentou um volume de $11,93 \text{ mm}^3$ (paciente 10), enquanto a menor teve um volume de $3,54 \text{ mm}^3$ (paciente 1). Em consequência desses volumes a biópsia de maior volume também apresentou o maior volume de parênquima ($7,91 \text{ mm}^3$), contudo o maior volume de estroma foi de $5,05 \text{ mm}^3$ (paciente 7). Os valores mínimos concentraram-se no paciente 1 e foram de $0,46 \text{ mm}^3$ (parênquima) e $3,08 \text{ mm}^3$ (estroma).

Quando os dados do volume glandular segundo o princípio de Cavalieri são reunidos em seus respectivos grupos (Grupo Não-SS e Grupo SS) e comparados, não foram observadas alterações significativas (Figura 9). A Figura 10 apresenta os valores médios do CE para toda a análise. Em todas as avaliações realizadas o coeficiente de erro (CE) (medida do nível de imprecisão na análise) permaneceu abaixo de 5% computando o erro devido à contagem de pontos e ao seccionamento devido à microtomia. A obtenção das seções seriais contribuiu para a maior fonte de erro da análise, enquanto que a aplicação da contagem de pontos nas seções histológicas teve um efeito negligenciável. A média do CE total da análise permaneceu pouco acima de 3%. A capacidade do observador em diferenciar os dois grandes componentes da GSM, parênquima e estroma, foi afetada em menos que 1,5%. A figura 11 apresenta o efeito do número de seções utilizadas em relação ao volume da GSM. No presente estudo, 8 a 13 seções equidistantes foram suficientes para uma determinação precisa. Para o paciente 5, 6 seções foram suficientes para se observar uma estabilização no volume glandular. Enquanto que a avaliação de poucas seções (< 8) resulta em elevada imprecisão na determinação do volume da GSM. Acima de 10 seções torna-se um trabalho ineficiente visto que após o platô da curva estabilizar não há necessidade de mais seções.

A Figura 12 apresenta a quantificação dos componentes estruturais da GSM em densidade de volume de seus componentes (princípio de Delesse, Vol%). A densidade de linfócitos teve um aumento significativo no Grupo SS ($p = 0,033$), uma diferença de 4,4%. O

aparente aumento nos plasmócitos não foi significativo. Os demais parâmetros analisados não apresentaram alteração significativa. Se analisados quanto a sua prevalência na GSM, alguns componentes sofreram modificações. A fibrose foi o achado morfológico mais prevalente em ambos os grupos analisados (36,90% e 35,04%, respectivamente Grupo Não-SS e SS) seguido pela porcentagem de ácinos (28,43% e 29,94%, respectivamente). Com exceção dos ductos intercalares e estriados que mantiveram a mesma contribuição entre os dois grupos, os agregados linfoplasmocitários, plasmócitos e linfócitos foram mais proeminentes no Grupo SS, enquanto que os vasos decresceram em contribuição (Tabela 6).

As contagens de perfis de linfócitos, plasmócitos e total linfoplasmocitário estão apresentados na Figura 13. Foi observado um aumento significativo no número de perfis de linfócitos ($p = 0,025$) e no número de infiltrados linfoplasmocitários (linfócitos + plasmócitos, $p = 0,038$) no Grupo SS.

Os resultados dos scores focais linfocitários efetuados independentemente por especialistas na patologia e na estereologia sobre as seções histológicas das biópsias da GSM estão comparados na tabela 7 e para avaliar a correlação entre eles, aplicou-se o coeficiente de correlação de Pearson. Não houve correlação entre as duas contagens (coeficiente de correlação = 0,628; $p = 0,0521$; $n = 10$). A demonstração gráfica das diferenças nessas avaliações é apresentada na Figura 14.

Os dados de número de perfis de linfócitos e plasmócitos foram relacionados com o escore estereológico para uma visualização do padrão de comportamento dessas variáveis em um gráfico de correlação tripla (Figura 15). O Grupo Não-SS caracteriza-se por apresentar baixo número de linfócitos e plasmócitos que corresponde a um baixo escore estereológico. O Grupo SS compartilha características opostas.

Tabela 5. Análise morfométrica (volume de Cavalieri, mm^3) das GSMs dos pacientes (biópsias) sugestivos de síndrome de Sjogren avaliados neste estudo. As regiões parenquimais e estromais foram separadas na contagem. Para cada região foi determinado o erro devido à contagem de pontos e a microtomia. O total representa a contribuição dos dois componentes e não representa a soma direta dos mesmos. O volume absoluto dos componentes é apresentado como mm^3 .

PACIENTES																
	GRUPO Não-SS						GRUPO SS						Média total			
	1	2	4	9	Média	Mediana	5	3	6	7	8	10		Média	Mediana	
PARÊNQUIMA																
Erro devido à contagem de pontos	3,6	1,7	0,79	0,63	1,68	1,23	1,06	1,24	1,79	0,78	1,03	0,58	1,08	1,05	1,32	
Erro devido à microtomia	3,2	3,6	2,88	2,11	2,94	3,02	2,00	3,43	2,67	3,61	4,76	1,45	2,99	3,05	2,97	
Total	4,8	4,0	2,99	2,20	3,50	3,48	2,26	3,64	3,21	3,69	4,87	1,56	3,21	3,43	3,32	
Volume (mm^3)	0,5	1,5	6,18	3,51	2,91	2,51	3,11	2,85	1,89	5,31	1,98	7,91	3,84	2,98		
ESTROMA																
Erro devido à contagem de pontos	0,9	0,9	0,98	0,73	0,87	0,88	0,93	0,66	1,14	0,8	0,96	0,95	0,91	0,94	0,89	
Erro devido à microtomia	2,1	3,2	3,02	1,57	2,48	2,58	2,19	2,24	1,94	2,93	2,26	2,11	2,28	2,22	2,36	
Total	2,3	3,3	3,17	1,73	2,63	2,74	2,37	2,34	2,25	3,03	2,45	2,32	2,46	2,36	2,53	
Volume (mm^3)	3,1	3,5	4,68	2,90	3,55	3,30	3,70	6,58	3,48	5,05	2,18	4,03	4,17	3,87		
Volume total da biópsia (mm^3)	3,5	5	10,9	6,4	6,45	5,71	6,82	9,43	5,38	10,37	4,16	11,93	8,02	8,13		

Tabela 6 Análise morfológica das GSMs quanto a Densidade de Volume dos Componentes (princípio de Delesse Vol %)

Grupo	Densidade de Volume dos Componentes da GSM (Vol %)								
	Ácino	Fibrose	Ducto estriado	Ducto intercalar	Vaso	Adipócito	Linfócito	Plasmócito	Linfoplasmocítico
Não-SS	13,91	41,72	9,69	0,00	3,28	30,00	0,00	1,41	1,41
	36,08	37,39	7,71	0,26	2,75	13,59	1,96	0,26	2,22
	41,20	28,17	7,07	0,43	5,05	3,56	3,08	11,44	14,52
	22,52	40,33	7,29	1,57	6,71	6,29	3,10	12,19	15,29
Média	28,43	36,90	7,94	0,57	4,45	13,36	2,03	6,33	8,36
Erro padrão	6,24	3,05	0,60	0,35	0,90	5,94	0,73	3,18	3,79
SS	31,80	33,41	6,83	1,17	5,22	4,78	5,27	11,51	16,78
	20,89	53,71	2,61	0,30	1,66	12,23	3,26	5,34	8,61
	41,75	28,97	2,60	0,95	4,26	3,55	4,34	13,58	17,92
	42,95	29,25	6,65	0,16	3,45	4,25	4,49	8,81	13,30
	23,27	24,28	8,66	3,64	5,52	1,32	9,28	24,03	33,31
	18,96	40,64	11,69	2,65	1,90	4,93	10,56	8,66	19,22
Média	29,94	35,04	6,51	1,48	3,67	5,18	6,20	11,99	18,19
Erro padrão	4,32	4,35	1,44	0,56	0,67	1,51	1,22	2,66	3,40

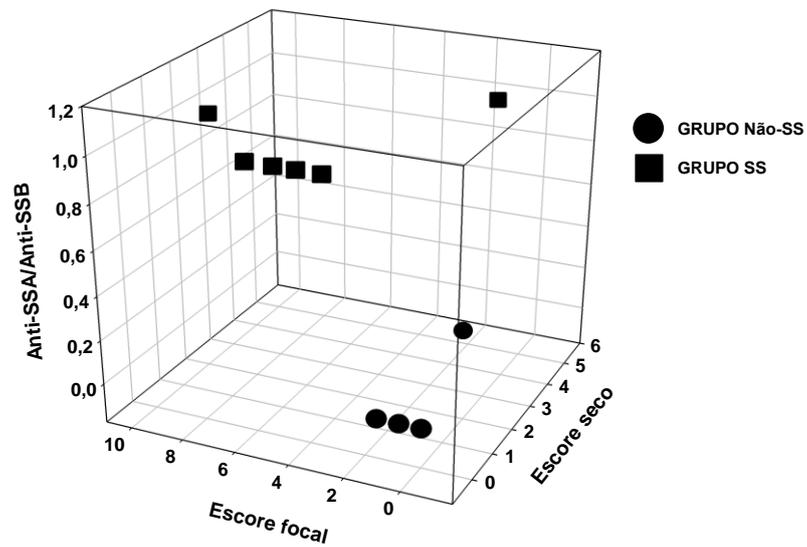


Figura 8. Comportamento do Grupo Não-SS e Grupo SS em relação ao escore seco, escore focal e avaliação de anticorpos observado no presente estudo. Observar a segregação distinta entre o Grupo Não-SS e Grupo SS.

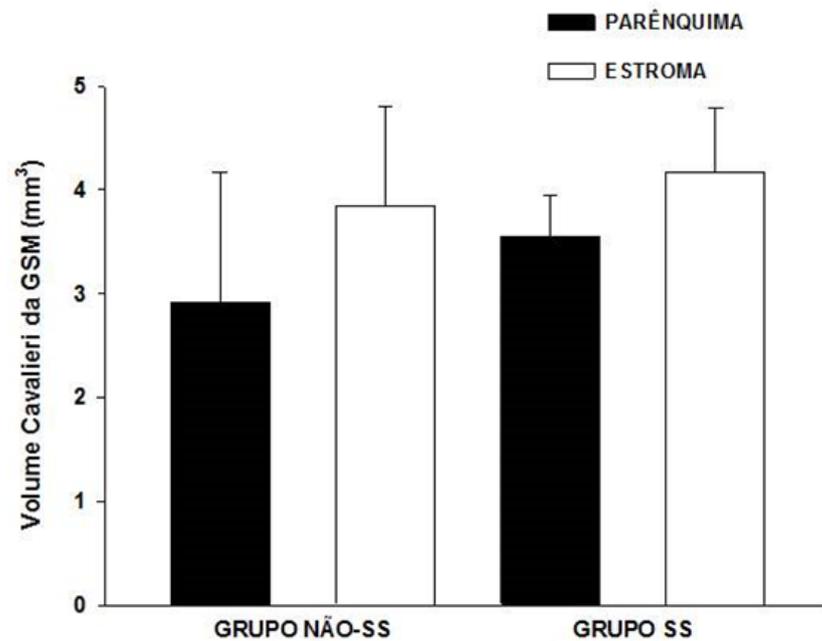


Figura 9. Estimativa do volume da GSM segundo Cavalieri. A GSM foi analisada em sua porção parenquimal e estromal.

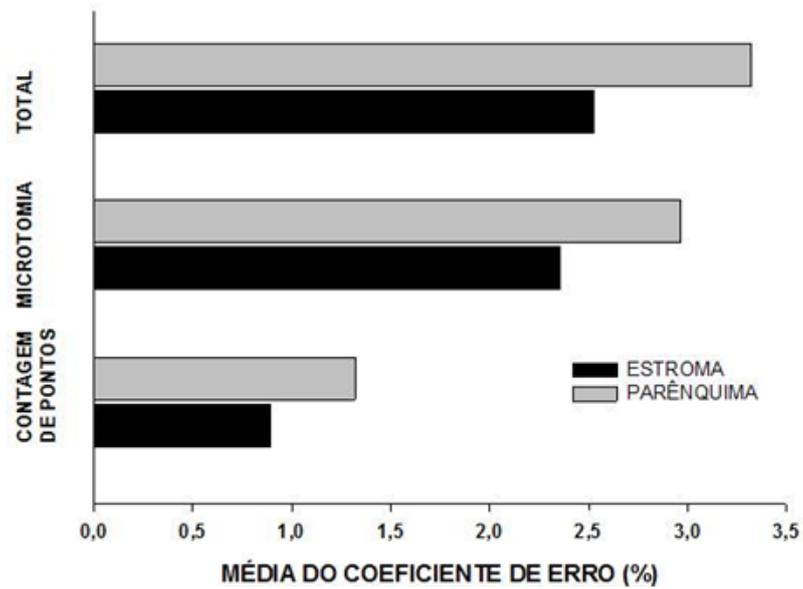


Figura 10. Estimativa do coeficiente de erro da avaliação do volume pelo método de Cavalieri.

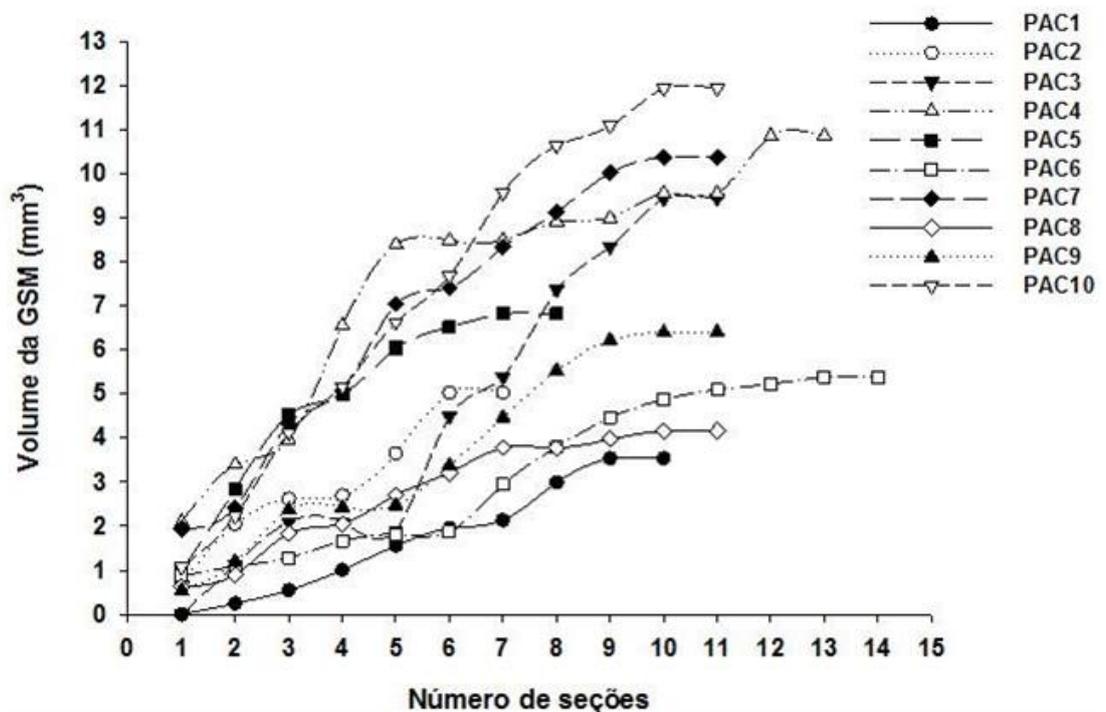


Figura 11. Efeito do número de seções utilizadas em relação ao volume da GSM. Notar a estabilidade dos dados do volume da GSM após a 6ª seção utilizada.

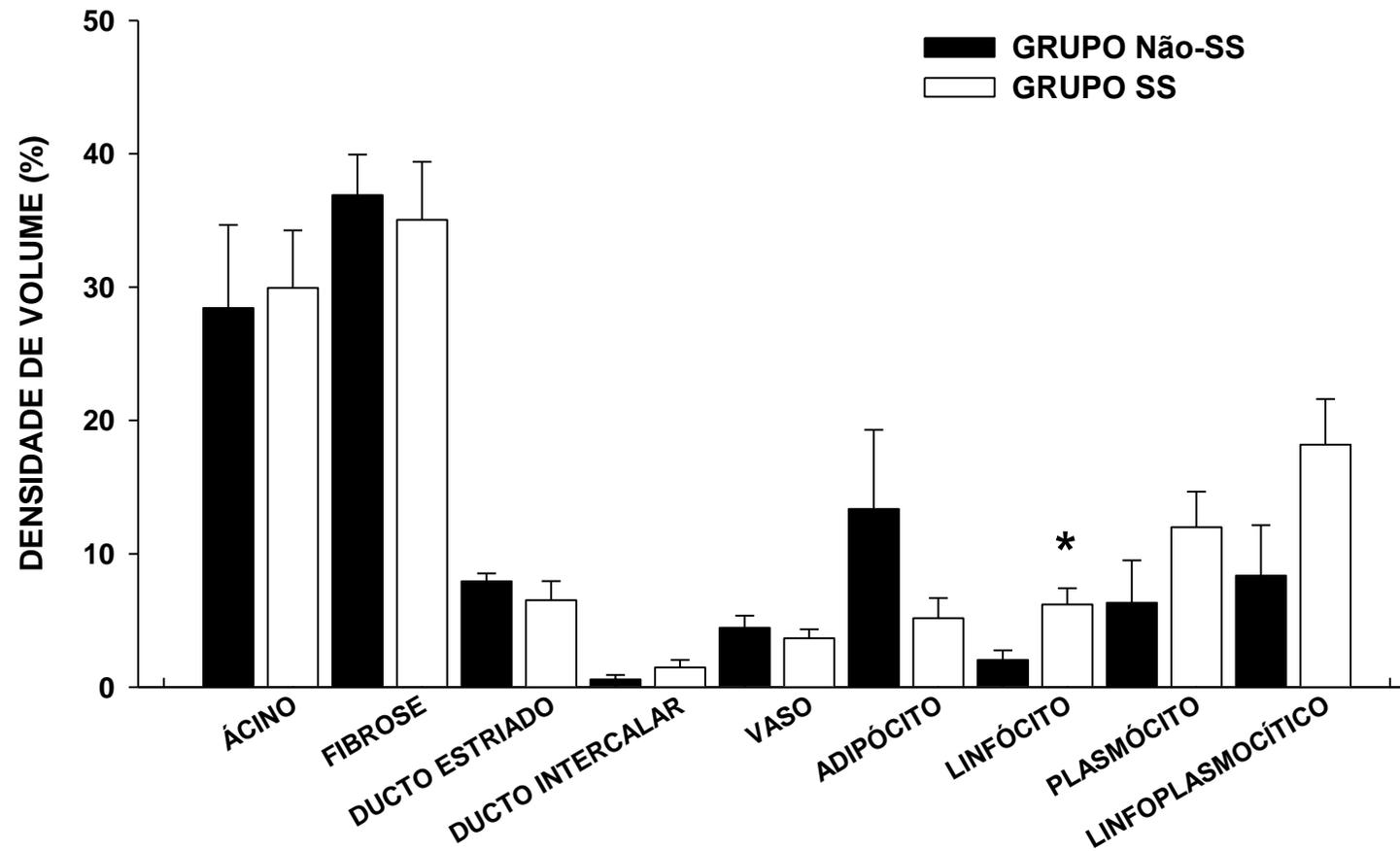


Figura 12. Análise morfométrica (densidade de volume) dos componentes estruturais que compõem a GSM dos pacientes do Grupo Não-SS e Grupo SS. As seguintes variáveis foram quantificadas em cada grupo: ácino, fibrose, ducto estriado, ducto intercalar, vasos, adipócito, linfócito, plasmócitos e linfoplasmócitos. * indica diferença significativa ($p < 0,05$).

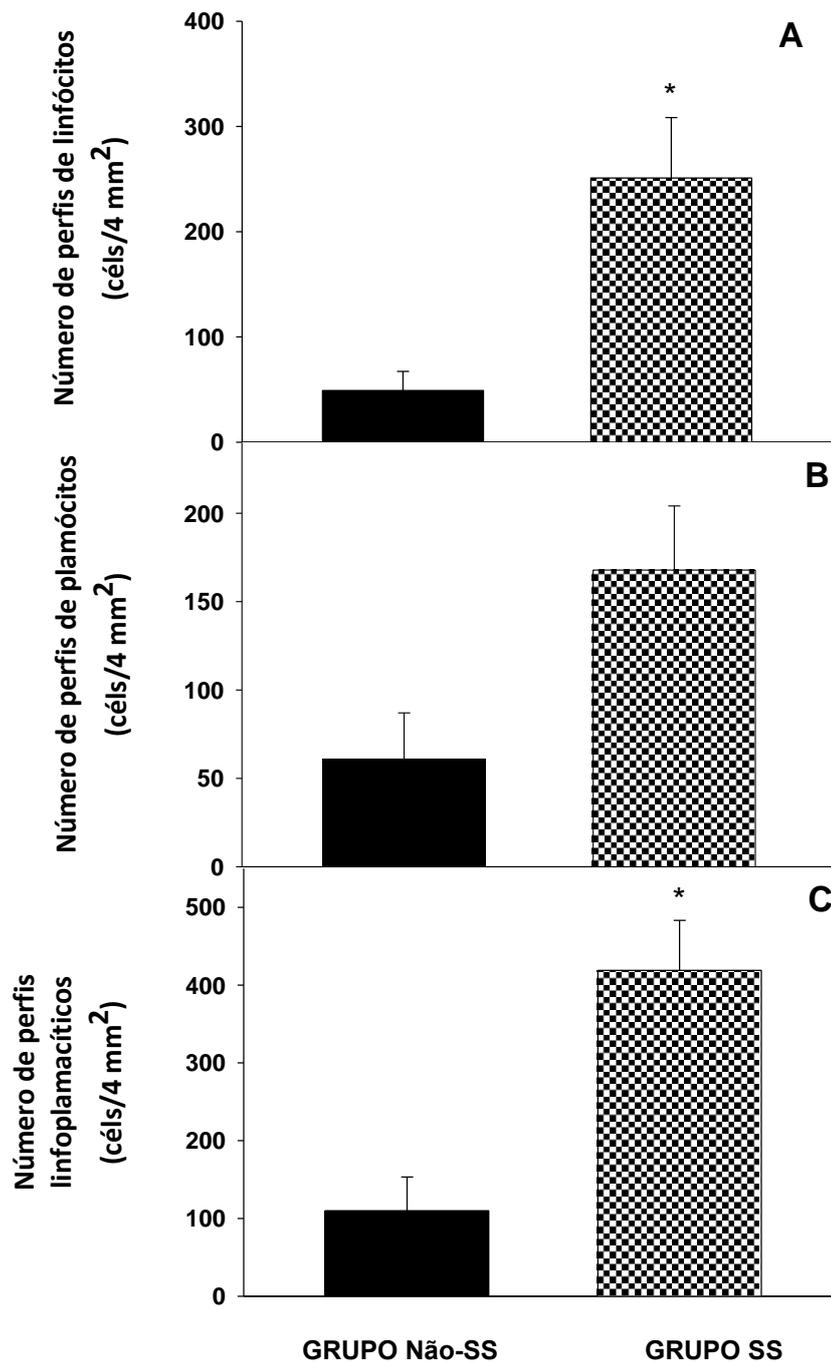


Figura 13. Contagem de perfis de linfócitos (A), plasmócitos (B) e total linfoplasmocítico (C). O total linfoplasmocitário representa o somatório de A e B. Um grid quadrático com linhas de inclusão e exclusão foi utilizado nessa quantificação. * Indica diferença significativa em relação ao Grupo Não-SS.

Tabela 7. Comparação entre o score focal de linfócitos efetuados por especialistas na patologia e na estereologia sobre as seções histológicas das biópsias da GSM.

	Paciente	Score Focal	
		Patologia	Estereologia
Não-SS	1	-	0,01
	2	1,30	0,84
	4	0,00	1,57
	9	sem foco	1,50
SS	3	1,00	3,50
	5	1,00	1,19
	6	1,00	4,38
	7	1,60	5,23
	8	1,33	6,24
	10	1,33	9,57

OBS: Score focal = (total de foco/área total) x 4

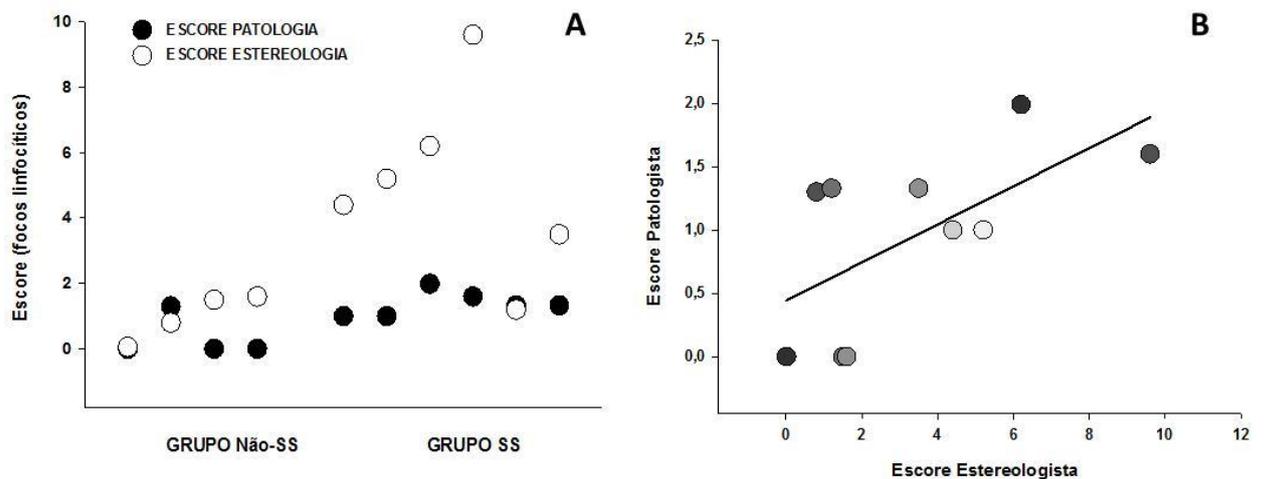


Figura 14. A. Distribuição dos escores da contagem de focos linfocitários pelo patologista e pelo estereologista sobre as mesmas seções das GSM dos pacientes do Grupo Não-SS e Grupo SS. **B.** Regressão linear utilizando os dados anteriores. $y = 0,150x + 0,443$; $R^2 = 0,39$.

Tabela 8. Número e média de perfis de linfócitos, plasmócitos e a soma linfoplasmocitária, além do score focal de linfócitos e plasmócitos pelo método estereológico da GSM.

	Paciente	NÚMEROS (Perfis/4 mm ²)			Score Focal	
		Linfócitos	Plasmócitos	Linfoplasmocitário	Linfócitos	Plasmócitos
Não-SS	1	0,67	2,68	26,12	0,01	0,05
	2	42,04	35,74	77,72	0,84	0,71
	4	78,72	82,32	160,92	1,57	1,65
	9	74,96	122,42	197,23	1,50	2,45
	Média	49,10	60,79	115,50	0,98	1,22
SS	3	174,93	273,79	436,08	3,50	5,48
	5	59,56	52,20	568,31	1,19	1,04
	6	219,12	260,96	111,68	4,38	5,22
	7	261,53	174,88	308,88	5,23	3,50
	8	312,16	155,12	479,71	6,24	3,10
	10	478,68	90,06	448,38	9,57	1,80
Média	251,00	167,83	392,17	5,02	3,36	

OBS: Score focal = (total de foco/área total) x 4

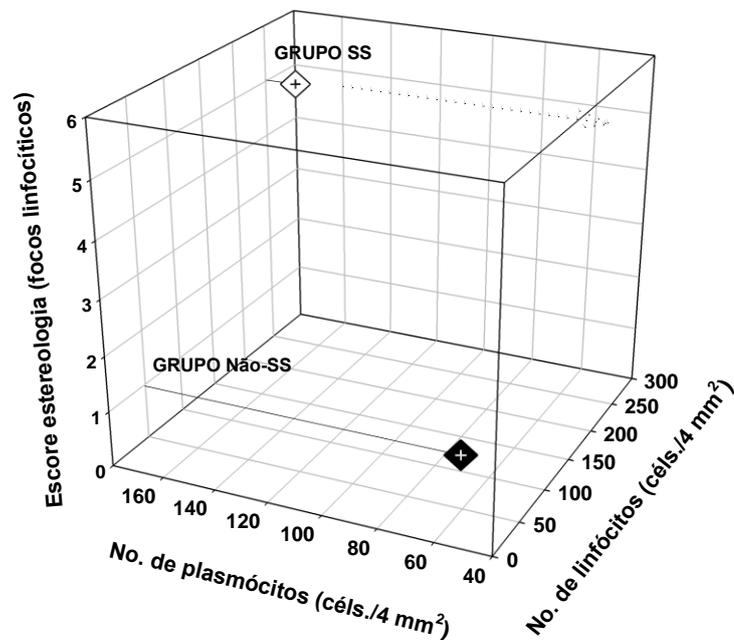


Figura 15. Comportamento do Grupo Não-SS e Grupo SS em relação a suas respectivas avaliações quantitativas de linfócitos e plasmócitos. Os símbolos indicam a média dos valores para cada grupo. A seta pontilhada representa uma possível posição do Grupo SS caso mantivesse um número de plasmócitos reduzido.

7 - Discussão

Neste estudo foram avaliados 10 pacientes com suspeita de SS, os quais foram divididos em dois grupos, os pacientes que se encaixam (SS) e não se encaixam (não SS) nos critérios propostos pelo Colégio Americano de Reumatologia de 2012 (SS).

Estereologia quantitativa diz respeito a uma área especializada de análise de imagem microscópica em que as medições de objetos podem ser obtidas com precisão por meio de passos racionalizados da amostragem combinada com a reconstrução matemática (FELIX; MCGUIRE, 1981; MAYHEW, 1991). Estereologia é derivada do grego e significa “estudo de objetos em 3D”. No presente, quase três dezenas de ferramentas estereológicas estão disponíveis para investigar o volume, a área superficial, o comprimento, a conectividade e o número de qualquer estrutura (macro ou microscópica) em qualquer corpo (mineral ou biológico) com inferências sobre a variância das medidas (coeficiente de erro), algo impensável em uma análise semi-quantitativa (MANDARIM-DE-LACERDA, 2003b; MATTFELDT, 2006). Em nosso estudo apenas três ferramentas foram empregadas para a determinação do volume das GSMs (princípio de Cavalieri), densidade de volume dos componentes internos das GSMs (princípio de Delesse) e contagem de perfis de linfócitos e plasmócitos (contagem 2D). Como ponto positivo de nosso estudo podemos salientar o potencial da estereologia em (i) detectar as diferenças sutis (porém significativas) em linfócitos entre os dois grupos analisados e (ii) manter o coeficiente de erro dentro da margem aceitável de 5%. Ainda, comprovamos a eficiência da análise estereológica ao mostrar a oscilação nos valores de volume da GSM conforme o número de seções histológicas empregadas. Usando corretamente a estereologia pode-se realizar estudos quantitativos com pouco esforço: eficiência em estereologia significa contar uma amostra de cortes mínima (pouco trabalho), gastando pouco (para preparar os cortes para análise), mas com boa acurácia (MANDARIM-DE-LACERDA, 2003a). Menos seções analisadas, menor precisão e acurácia. Uma análise matemática aprofundada desse tema foi brilhantemente apresentada por GUNDERSEN; ØSTERBY (1981). A maior questão envolvendo a análise de seções histológicas únicas ou replicas de seções muito próximas é exatamente a falta de representatividade em relação ao órgão ou biópsia como um todo. Para o diagnóstico histopatológico na área médica e biológica a estereologia pode ser implementada à rotina do laboratório patológico e vários artigos têm mostrado a amplitude e diversidade dessas possibilidades (ELIAS; HYDE, 1983; GUNDERSEN et al., 1988; MANDARIM-DE-LACERDA, 2003b). Contudo, é racional que se separe o objetivo da análise em uma (i) morfometria de grupo e (ii) uma morfometria diagnóstica. O primeiro caso envolve a análise de vários pacientes em um estudo prospectivo ou retrospectivo. O segundo caso envolve a investigação de um único paciente (biópsia) como comumente observado em um laboratório de patologia, a rapidez na análise e diagnóstico é muitas vezes um fator decisivo para a aplicação da

correta terapêutica ao paciente. Contudo, inúmeras evidências indicam que as análises semi-quantitativas apresentam baixa reprodutibilidade que reduzem o valor clínico do diagnóstico, e que esse tipo de classificação subjetiva deve ser substituído por uma quantificação objetiva (SØRENSEN, 1995; LADEKARL, 1998; MARCOS et al., 2012). Em ambos os casos, uma série de ferramentas investigativas envolvendo a análise de imagens computadorizadas e estereologia estão disponíveis para contribuir no diagnóstico e são cada vez mais recomendadas pelos editoriais científicos (COLLAN, 1985).

Apesar de oito apresentarem uma doença autoimune associada, como estão apresentadas na tabela 1, o que deve ser levado em consideração nas análises neste trabalho, enquadrando-se como as afecções sistêmicas inflamatórias crônicas e imunomediadas classificando a síndrome como SSsec.

Nossos pacientes não apresentaram manifestações clínicas severas da SS. Apenas dois apresentaram escore seco ocular maior que 3, e apenas 2 apresentaram hipossalivação na sialometria. Essas características, de alguma forma, podem embasar o fato das glândulas salivares menores não apresentarem alterações parenquimatosas severas, destrutivas, em ácinos e ductos; e apresentarem escores focais linfoplasmocitários baixos; não apresentaram centro germinativos ((BEROUKAS; HISCOCK; et al., 2002; GRULKOWSKI et al., 2014b).

Podemos considerar que nossos pacientes ou tinham uma SS de pouco tempo de evolução; ou um “back-ground” genético brando; ou alterações funcionais sem dano estrutural, como a presença de anticorpos anti-receptor muscarínicos, que impede a ativação colinérgica da célula e secreção aquosa pela aquaporina 5 (AQP 5), com conseqüente sintomas secos.

Estudos recentes sugerem que síndrome *sicca* é devido a uma inibição funcional da neurotransmissão autônoma nas glândulas lacrimais e salivares em vez da infiltração e destruição do tecido glandular por linfócitos T, devido a baixa correlação entre grau de destruição glandular e grau de disfunção (JONSSON et al., 2003). É provável que esta inibição esteja relacionada a um defeito ou inibição da liberação de acetilcolina pelos nervos parassimpáticos, aumentando a taxa de metabolismo desse neurotransmissor na fenda sináptica, possivelmente um defeito relacionado ao receptor de acetilcolina muscarínico M3 posjuncional (menor número ou menor atividade) (BEROUKAS; GOODFELLOW; et al., 2002). A ativação dos receptores muscarínicos resulta na síntese de IP3 e conseqüente aumento de Ca^{++} citosólico a partir dos estoques retículo endoteliais. A onda de Ca^{++} citosólico ativa proteínas Ca^{++} -dependentes e canais iônicos como o de K^+ e Cl^- e culmina na translocação e exposição de vesículas intracelulares contendo aquaporina 5 (AQP5) na membrana plasmática. Esses eventos permitem ocorrer a excreção de água (BEROUKAS; GOODFELLOW; et al.,

2002; EWERT et al., 2010). Na SS, os receptores M3 não são ativados ou não são funcionais ou não estão eficientemente ligados aos mecanismos intracelulares de sinalização.

Vários fatores podem contribuir para prejudicar o fluxo salivar incluindo as citocinas pró-inflamatórias como interleucina-1 (IL1) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que podem inibir tanto a secreção salivar em repouso como a estimulada (DELPORTE; STEINFELD, 2006). Em pacientes com SS a presença de autoanticorpos como anti-muscarínicos (M3R) pode impedir a secreção salivar normal em resposta a estimulação neuronal (BACMAN et al., 1996), baseado nesta teoria foi observado em 2 dos nossos pacientes com SS, um fluxo salivar em repouso baixo, o que pode ser explicado pela presença desse anticorpo anti-muscarínico, no entanto não foi feita a pesquisa deste anticorpo abrindo novas perspectivas de estudo para o diagnóstico da síndrome.

Segundo (SZABO et al., 2014)), a gravidade da SS está relacionada à extensão e disposição do grau de infiltrado inflamatório na região periductal. Usando marcadores celulares T_{FH} (CD84, DP-1 e BCL-6) foi possível visualizar a predominância de estruturas bem organizadas com maior número de foco nesta região. As manifestações sistêmicas foram desenvolvidas mais tarde no curso da doença apenas em pacientes com infiltrados inflamatório altamente estruturado na presença de células T_{FH}. Os autores sugerem que as células T_{FH} em GSM no início da doença pode prever a evolução clínica mais grave na SSp. Em nosso trabalho não foram encontrados pacientes com infiltrado inflamatório altamente estruturado, com a presença CG, ainda que sendo classificados como SSsec. Provavelmente devido estarem em tratamento para a doença autoimune associada o que pode ter influenciado nossos achados.

Encontramos alterações apenas moderadas em ácinos, ductos e estroma. Vale ressaltar que não realizamos estudo estereológico de GSM de um grupo controle de indivíduos normais pareados por sexo e idade, o que nos teria permitido avaliar de forma quantitativa e com rigor estatístico o grau de alterações iniciais associados à SS.

No presente estudo notou-se um número elevado de plasmócitos no grupo SS corroborando com os achados de (VASCONCELOS II, 2015) que encontrou em 80% das amostras estudadas (n=16) um notável número de plasmócitos, apesar da predominância populacional de linfócitos. A presença razoável de plasmócitos também foi descrita por (LANE et al., 1982) e (SPEIGHT et al., 1990) e relacionaram esses achados, ou seja, as grandes quantidades de plasmócitos como precursores de imunoglobulinas de IgG e IgM. Além disso, o número de plasmócitos evidencia a presença de células B, uma vez que sua ocorrência só acontece com a ativação desta célula. Apesar da importância do linfócito T como parte importante do perfil inflamatório na SS, sabe-se que as células B e plasmócitos também participam do processo de ativação das citocinas e proteínas pró-inflamatórias.

A aplicação de metodologias quantitativas como a estereologia para a avaliação das alterações na GSM relacionadas à SS tem sido comum nos estudos experimentais (SCOTT et al., 1987; DE WILDE; VOOYS; et al., 1989; LEROY et al., 1992; LUKACH et al., 2013). Como já mencionado, a infiltração mononuclear nas GSMs é uma das características da SS (PÉREZ et al., 2005). A infiltração geralmente se localiza nas regiões periacinares, perivasculares e periductais levando a uma progressiva destruição de ácinos e ductos. O principal mecanismo de morte celular envolvido é a apoptose (MANGANELLI; FIETTA, 2003; PÉREZ et al., 2005). Evidências recentes comprovam a destruição da lâmina basal das células acinares e ductais (MOLINA et al., 2006) em consequência da ação das citocinas produzidas pelos linfócitos e importantes alterações na expressão de metaloproteínases da matriz extracelular (PÉREZ et al., 2005) que atuam na remodelação do tecido glandular. Essa ideia de alteração morfológica diretamente ligada ou conduzindo à síndrome *sicca* é apenas ilusória. Na verdade, a síndrome *sicca* precede as alterações nos ácinos e ductos. Os dados mais recentes reforçam a hipótese de que a SS é uma desordem multifatorial. No presente estudo, não evidenciamos alterações quantitativas em relação a densidade de volumes dos componentes estruturais da GSM nos dois grupos, sendo apenas significativos a diferença na densidade do volume de linfócitos no grupo SS em comparação ao grupo não-SS. Nossos resultados estão de acordo com (BEROUKAS; GOODFELLOW; et al., 2002; GRULKOWSKI et al., 2014a), onde a estrutura glandular foi mantida intacta apesar da xerostomia sintomática.

A queixa de boca seca ou xerostomia, nem sempre está correlacionada com a sialometria (KORN et al., 2002) com sinais objetivos de hipossalivação. Foi difícil estabelecer uma correlação entre queixa de boca seca e sialometria, pois muitas vezes indivíduos com queixa de xerostomia apresentam sialometria dentro do valor de normalidade. Isto talvez ocorra por uma redução no fluxo de saliva que é significativa para o paciente, porém com valores ainda dentro da normalidade, ou ainda por redução na produção de mucina, uma alteração na composição qualitativa da saliva. Em contrapartida indivíduos com sialometria com fluxos bastante baixos, muitas vezes não apresentam queixas (LONGMAN et al., 2000; LIQUIDATO et al., 2002; LIMARES et al., 2005). A sialometria apesar de inespecífica é uma das principais indicações para se começar a rastrear esta doença.

Os pacientes com suspeita da SS acabam se dispersando ou desistindo antes de chegar ao diagnóstico, ou ainda desistindo no momento da biópsia, que é um procedimento invasivo e, portanto temido. Podem ocorrer complicações agudas e a médio prazo em cerca de 10% dos pacientes (SANTIAGO et al., 2012). Portanto, é necessária uma nova técnica não invasiva de exame da GSM que traga benefícios comparáveis à da biópsia. Com o intuito de evitar a biópsia (GRULKOWSKI et al., 2014b) desenvolveu o SS-OCT (Optical coherence tomography with wavelength-tunable lasers – Tomografia de coerência ótica ligada a um laser de comprimento de onda ajustáveis)

um instrumento sofisticado para análise por imagem da mucosa do lábio inferior e das GSMs, além dos descritores quantitativos da morfologia das GSMs, através da morfometria em pacientes com síndrome de Sjögren e um grupo controle. Contudo não foram encontradas diferenças estruturais quantitativas significantes na análise das GSMs nos dois grupos estudados. Da mesma forma não foi encontrada diferença estrutural na análise da GSM usando a biópsia neste trabalho. Mas conseguimos evidenciar o foco linfocitário, que é um dos critérios necessários para o diagnóstico da doença. O uso da biópsia também é valorizado em outros trabalhos (GIOVELLI, 2013).

As alterações microscópicas associadas ao diagnóstico da SS observadas em lâminas pelo uso da biópsia incluem especialmente a presença dos focos linfocitários (MASAKI; SUGAI, 2004; BARCELLOS; ANDRADE, 2005; SZABO et al., 2014). O diagnóstico elaborado pelo patologista é feito procurando diretamente o foco linfocitário e observando as estruturas glandulares, porém é feito pela observação de uma única seção e um nível. A avaliação de score focal obtido em três níveis de seções diferentes sobre biópsias da glândula salivares menores, com pelo menos 200 µm de distância, pode melhorar a acurácia diagnóstica usando os critérios de classificação de SS estabelecidos. MORBINI e colaboradores (2005), analisaram blocos das amostras recortadas em dois níveis diferentes de 200 e 400 µm da seção inicial. Considerando que um infiltrado de linfócitos tinha um diâmetro médio de 50 µm, assumiu-se que 200 µm entre as seções avaliadas foram suficientes para garantir que não haveria interposição de score focal. As seções foram cegamente examinadas pelo mesmo patologista, que registrou a área e a pontuação do foco para cada nível. Guardando as diferenças metodológicas na estereologia foi evidenciado maior número de foco (Figura 14A).

Comparando os dados estereológicos e histopatológicos em relação ao foco linfocitário, o paciente 2 foi classificado igualmente para não SS utilizando o consenso de 2012. Na estereologia este paciente não teria nem mesmo a chance de ser indicado pela presença do foco, pois o número de linfócitos foi insuficiente para compor um foco, o qual é necessário para o diagnóstico de SS, aliado à negatividade para os anticorpos anti-Ro, anti-La e FAN, adicionados à ausência de xerofthalmia, concluindo a classificação do paciente como não SS no nosso estudo. Contudo, a indicação que o paciente possa ter SS pode acontecer quando usado os resultados da patologia, pois apresentou grande porcentagem de infiltrado inflamatório (+++) e um score focal de 1,3. A conclusão seria apenas indicação de provável SS quando associados a dados clínicos e laboratoriais. Desta forma este trabalho veio unir os vários parâmetros multidisciplinares possibilitando a utilização dos critérios de 2012 para elucidação do diagnóstico da SS.

Do ponto de vista da morfologia da GSM, nosso estudo detectou a presença de focos linfocitário no tecido glandular e alterações qualitativas em ácinos, ductos e a presença de fibrose no

tecido conjuntivo nos dois grupos de pacientes investigados, contudo o Grupo SS compartilhou tais características e as demais que satisfazem o critério internacional para o diagnóstico de SS. Embora um número reduzido de pacientes tenha sido utilizado foi possível o alinhamento dos dados que permitiu a segregação dos pacientes em dois grupos (Não-SS e SS). É possível que os pacientes classificados Não-SS mas com pelo menos um foco de agregação linfocítica possam vir a ser classificados como SS, se repetirem os exames laboratoriais (FAN, FR, anti-Ro e anti-La) por outra técnica ou outro kit, e se fizerem a biomicroscopia da córnea/conjuntiva após algum tempo sem usar colírios lubrificantes e pilocarpina oral.

A comparação da histopatologia convencional com a estereologia demonstrou maior sensibilidade da estereologia em avaliar densidade celular (linfócitos e plasmócitos) no estroma da GSM, e, através de molduras compartimentalizadas “grid”, a disposição agregadas dessas células “perfil”. A figura 14 A demonstra claramente a maior capacidade da estereologia em captar focos linfoplasmocitários (escores focais significativamente maiores), aumentando a precisão do método comparado a histopatologia convencional. A identificação qualitativa de dano a ductos e ácinos também é favorecida, e poderá render elementos prognósticos para seguimento longitudinal de pacientes e testagem de novas abordagens terapêuticas.

A síndrome de Sjögren é uma doença autoimune de difícil caracterização e cujo diagnóstico depende da combinação de vários achados clínicos, laboratoriais e histopatológicos. Embora a etiologia da SS permaneça desconhecida, a avaliação morfométrica das GSMs complementa a análise histológica e pode fornecer informações valiosas para o entendimento da patogênese dessa enfermidade.

Nosso estudo é um trabalho pioneiro na Universidade Federal do Amazonas em pesquisa de metodologias estereológicas na SS. Sua continuidade poderá ocorrer incorporando o grupo controle normal para validar alterações sutis de parênquima e estroma em formas iniciais da doença ou em pacientes pré-diagnósticos, os quais serão seguidos longitudinalmente para observação de desenlaces tardios e clinicamente significativos. Outro elemento a ser incorporado em nossos futuros estudos é o uso de biomarcadores imunofenotípicos ou por hibridização de ácidos nucléicos, para quantificar células específicas, marcadores virais (CMV, EBV), e moléculas mediadoras de fenômenos imunopatogênicos.

8 - Conclusão

- A estereologia é um método adequado e factível para avaliação do envolvimento de GSM em pacientes suspeitos de SS.
- A estereologia é um método útil para quantificar o envolvimento de estruturas parenquimatosas (ácinos e ductos) e estroma (infiltrado inflamatório, vascularização, fibrose) em GSM de pacientes suspeitos de SS.
- Quando comparada a métodos histopatológicos convencionais demonstra maior sensibilidade para detecção de alterações estruturais em GSM de pacientes suspeitos de SS, inclusive a identificação de "foco" (agregados com mais de 50 elementos linfoplasmocitário).
- Considerando a estereologia como padrão ouro pela ausência de viés nos cortes e na seleção de área observadas, detectamos um paciente falso-positivo e dois pacientes falso-negativos quando analisados por métodos histopatológicos convencionais.
- A baixa correlação entre achados estruturais (por estereologia e métodos convencionais) e intensidade sintomática (xerostomia, xeroftalmia, sicca score, sialometria) pode ser atribuída a fatores funcionais, como bloqueio de receptores muscarínicos e da atividade de aquaporina-5.
- A avaliação longitudinal das alterações quantitativas nas GSM deve ser investigada como instrumento útil para previsão prognóstica e tomada de decisões terapêuticas em pacientes portadores de SS.
- O uso de seções serias equidistantes, acima de 6 seções, é recomendado para obtenção de precisão e acurácia nos resultados.
- Confirmamos que a estereologia é um método capaz de identificar e quantificar o foco linfocitário que é o elemento determinante para diagnosticar os pacientes com SS.

9 - Referências

- ABU-HELU, R. F.; DIMITRIOU, I. D.; KAPSOGEOGOU, E. K.; MOUTSOPOULOS, H. M.; MANOUSSAKIS, M. N. Induction of salivary gland epithelial cell injury in Sjogren's syndrome: in vitro assessment of T cell-derived cytokines and Fas protein expression. **Journal of autoimmunity**, v. 17, n. 2, p. 141-153, 2001.
- ADI, M.; CHISHOLM, D.; WATERHOUSE, J. Stereological and immunohistochemical study of development of human fetal labial salivary glands and their S-100 protein reactivity. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 23, n. 1, p. 36-40, 1994.
- AMERICAN ACADEMY OF OPHTHALMOLOGY, A. Corneal / External Disease Panel. Preferred Practice Pattern Guidelines. Dry Eye Syndrome – Limited Revision. American Academy of Ophthalmology. San Francisco: www.aao.org/ppp 2014.
- AMFT, N.; CURNOW, S. J.; SCHEEL-TOELLNER, D.; DEVADAS, A.; OATES, J.; CROCKER, J.; HAMBURGER, J.; AINSWORTH, J.; MATHEWS, J.; SALMON, M. Ectopic expression of the B cell-attracting chemokine BCA-1 (CXCL13) on endothelial cells and within lymphoid follicles contributes to the establishment of germinal center-like structures in Sjögren's syndrome. **Arthritis & Rheumatism**, v. 44, n. 11, p. 2633-2641, 2001.
- ANDERSON, L. G.; CUMMINGS, N. A.; ASOFSKY, R.; HYLTON, M. B.; TARPLEY, T. M.; TOMASI, T. B.; WOLF, R. O.; SCHALL, G. L.; TALAL, N. Salivary gland immunoglobulin and rheumatoid factor synthesis in Sjögren's syndrome: natural history and response to treatment. **The American journal of medicine**, v. 53, n. 4, p. 456-463, 1972.
- ASMUSSEN, K.; ANDERSEN, V.; BENDIXEN, G.; BENDTZEN, K.; PRAUSE, J.; THORN, J.; WIİK, A.; OXHOLM, P. Quantitative assessment of clinical disease status in primary Sjögren's syndrome. **Scandinavian journal of rheumatology**, v. 26, n. 3, p. 197-205, 1997.
- AZUMA, M.; MOTEGI, K.; AOTA, K.; HAYASHI, Y.; SATO, M. Role of cytokines in the destruction of acinar structure in Sjogren's syndrome salivary glands. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 77, n. 3, p. 269-280, 1997.
- BAAK, J. P. A.; OORT, J. The Case for Morphometry in Diagnostic Pathology. In: (Org.). **A Manual of Morphometry in Diagnostic Pathology**: Springer Berlin Heidelberg, 1983. cap. 1. p. 2-5.
- BACMAN, S.; STERIN-BORDA, L.; JOSÉ CAMUSSO, J.; ARANA, R.; HUBSCHER, O.; BORDA, E. Circulating antibodies against rat parotid gland M3 muscarinic receptors in primary Sjögren's syndrome. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 104, n. 3, p. 454-459, 1996.
- BADDELEY, A.; GUNDERSEN, H.-J. G.; CRUZ-ORIVE, L. M. Estimation of surface area from vertical sections. **Journal of microscopy**, v. 142, n. 3, p. 259-276, 1986.
- BAER, A. N.; GOURIN, C. G.; WESTRA, W. H.; COX, D. P.; GREENSPAN, J. S.; DANIELS, T. E. Rare diagnosis of IgG4-related systemic disease by lip biopsy in an international Sjögren syndrome

registry. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology**, v. 115, n. 3, p. e34-e39, 2013.

BARBOZA, M. N. C.; BARBOZA, G. N. C.; MELO, G. M. D.; SATO, E.; DANTAS, M. C. N.; DANTAS, P. E. C.; FELBERG, S. Correlação entre sinais e sintomas de olho seco em pacientes portadores de síndrome de Sjögren. **Arq Bras Oftalmol**, v. 71, n. 4, p. 547-52, 2008.

BARCELLOS, K. S. A.; ANDRADE, L. E. C. Histopatologia e imunopatologia de glândulas salivares menores de pacientes com síndrome de Sjögren (SSj). **Rev Bras Reumatol**, v. 45, n. 4, p. 215-223, 2005.

BARROS, G. C. M. **Síndrome de Sjögren**. 2010. Fernando Pessoa Porto/Portugal.

BEROUKAS, D.; GOODFELLOW, R.; HISCOCK, J.; JONSSON, R.; GORDON, T. P.; WATERMAN, S. A. Up-regulation of M3-muscarinic receptors in labial salivary gland acini in primary Sjögren's syndrome. **Laboratory Investigation**, v. 82, n. 2, p. 203-210, 2002.

BEROUKAS, D.; HISCOCK, J.; GANNON, B. J.; JONSSON, R.; GORDON, T. P.; WATERMAN, S. A. Selective down-regulation of aquaporin-1 in salivary glands in primary Sjögren's syndrome. **Laboratory Investigation**, v. 82, n. 11, p. 1547-1552, 2002.

BRITO, A.; FIGUEIRINHAS, J.; RAMOS, M.; SOARES, A.; NEVES, L.; LOBO, J.; SOUSA E FARO, L. Síndrome de Sjögren. 1994.

CLELAND-ZAMUDIO, S.; DEMUTH, M.; TRUNE, D. R. Pathology of labial salivary gland cellular aggregates in Sjögren's syndrome. **Otolaryngology--Head and Neck Surgery**, v. 108, n. 1, p. 44-50, 1993.

COLLAN, Y. Stereology and morphometry in histopathology. Principles of application. **Analytical and quantitative cytology and histology/the International Academy of Cytology [and] American Society of Cytology**, v. 7, n. 4, p. 237-241, 1985.

CRUZ-ORIVE, L. M. Estimating the length of a bounded curve in three dimensions using total vertical projections. **Journal of microscopy**, v. 163, n. 1, p. 101-113, 1991.

CRUZ-ORIVE, L. M. Stereology of single objects. **Journal of microscopy**, v. 186, n. 2, p. 93-107, 1997.

DALAVANGA, Y.; DROSOS, A.; MOUTSOPOULOS, H. Labial salivary gland immunopathology in Sjögren's syndrome. **Scandinavian journal of rheumatology. Supplement**, v. 61, p. 67-70, 1985.

DANIELS, T. E.; COX, D.; SHIBOSKI, C. H.; SCHIØDT, M.; WU, A.; LANFRANCHI, H.; UMEHARA, H.; ZHAO, Y.; CHALLACOMBE, S.; LAM, M. Y. Associations between salivary gland histopathologic diagnoses and phenotypic features of Sjögren's syndrome among 1,726 registry participants. **Arthritis & Rheumatism**, v. 63, n. 7, p. 2021-2030, 2011.

DANIELS, T. E.; WHITCHER, J. P. Association of patterns of labial salivary gland inflammation with keratoconjunctivitis sicca. **Arthritis & Rheumatism**, v. 37, n. 6, p. 869-877, 1994.

DE WILDE, P.; KATER, L.; BAAK, J.; VAN HOUWELINGEN, J.; HENÉ, R.; SLOOTWEG, P. A new and highly sensitive immunohistologic diagnostic criterion for Sjögren's syndrome. **Arthritis & Rheumatism**, v. 32, n. 10, p. 1214-1220, 1989.

DE WILDE, P.; VOOYS, G.; BAAK, J.; VAN HOUWELINGEN, J.; SLOOTWEG, P.; HENÉ, R.; KATER, L. Quantitative Immunohistologic and Histomorphometric Diagnostic Criteria for Sjögren's Syndrome. **Pathology-Research and Practice**, v. 185, n. 5, p. 778-780, 1989.

DELPORTE, C. Aquaporins in secretory glands and their role in Sjögren's syndrome. In: (Org.). **Aquaporins**: Springer, 2009. p. 185-201.

DELPORTE, C.; STEINFELD, S. Distribution and roles of aquaporins in salivary glands. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1758, n. 8, p. 1061-1070, 2006.

DRUMMOND, J.; CHISHOLM, D. A qualitative and quantitative study of the ageing human labial salivary glands. **Archives of oral biology**, v. 29, n. 2, p. 151-155, 1984.

ELIAS, H.; HYDE, D. M. **A guide to practical stereology**. S Karger Ag, 1983. v. 1. p.

EPSTEIN, J.; SCULLY, C. The role of saliva in oral health and the causes and effects of xerostomia. **Journal (Canadian Dental Association)**, v. 58, n. 3, p. 217-221, 1992.

EWERT, P.; AGUILERA, S.; ALLIENDE, C.; KWON, Y. J.; ALBORNOZ, A.; MOLINA, C.; URZÚA, U.; QUEST, A. F.; OLEA, N.; PÉREZ, P. Disruption of tight junction structure in salivary glands from Sjögren's syndrome patients is linked to proinflammatory cytokine exposure. **Arthritis & Rheumatism**, v. 62, n. 5, p. 1280-1289, 2010.

FELBERG, S.; DANTAS, P. E. C. Diagnóstico e tratamento da síndrome de Sjögren. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 69, p. 959-963, 2006a.

FELBERG, S.; DANTAS, P. E. C. Diagnóstico e tratamento da síndrome de Sjögren. **Arq. bras. oftalmol**, v. 69, n. 6, p. 959-963, 2006b.

FELIX, A.; MCGUIRE, E. J. Quantitative stereology: toxicologic pathology applications. **Toxicologic Pathology**, v. 9, n. 1, p. 21-28, 1981.

FERNANDES, J. D. **Estudo comparativo das alterações das glândulas salivares menores em doentes com queixa de xerostomia na síndrome de Sjögren e no lúpus eritematoso**. 2009. Universidade de São Paulo.

FISCHER, H. P.; EICH, W.; RUSSELL, I. J. A possible role for saliva as a diagnostic fluid in patients with chronic pain. *Seminars in arthritis and rheumatism*, 1998. Elsevier. p.348-359.

GIOVELLI, R. A. Análise histológica retrospectiva de glândula salivar menor em pacientes com síndrome seca. 2013.

GLEESON, M. J.; CAWSON, R. A.; BENNETT, M. H. Benign lymphoepithelial lesion: a less than benign disease. **Clinical Otolaryngology & Allied Sciences**, v. 11, n. 1, p. 47-52, 1986.

GOMES, R.; MARQUES, J. C.; ALBERS, M.; ENDO, R. M.; DANTAS, P.; FELBERG, S. Superfície ocular e hepatite C. **Arq Bras Oftalmol**, v. 74, n. 2, p. 97-101, 2011.

GOUGEROT, 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 Soc Franc Derm Syph**, v. 32, p. 376-379, 1925.

GRULKOWSKI, I.; NOWAK, J. K.; KARNOWSKI, K.; ZEBRYK, P.; PUSZCZEWICZ, M.; WALKOWIAK, J.; WOJTKOWSKI, M. Quantitative assessment of oral mucosa and labial minor salivary glands in patients with Sjögren's syndrome using swept source OCT. **Biomedical Optics Express**, v. 5, n. 1, p. 259-274, 2014a.

GRULKOWSKI, I.; NOWAK, J. K.; KARNOWSKI, K.; ZEBRYK, P.; PUSZCZEWICZ, M.; WALKOWIAK, J.; WOJTKOWSKI, M. Quantitative assessment of oral mucosa and labial minor salivary glands in patients with Sjögren's syndrome using swept source OCT. **Biomedical optics express**, v. 5, n. 1, p. 259-274, 2014b.

GUNDERSEN, H.; BENDTSEN, T. F.; KORBO, L.; MARCUSSEN, N.; MØLLER, A.; NIELSEN, K.; NYENGAARD, J.; PAKKENBERG, B.; SØRENSEN, F.; VESTERBY, A. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. **Apmis**, v. 96, n. 1-6, p. 379-394, 1988.

GUNDERSEN, H.; JENSEN, E. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction*. **Journal of microscopy**, v. 147, n. 3, p. 229-263, 1987.

GUNDERSEN, H.; ØSTERBY, R. Optimizing sampling efficiency of stereological studies in biology: or 'Do more less well!'. **Journal of microscopy**, v. 121, n. 1, p. 65-73, 1981.

HADDEN, W. On "dry mouth" or suppression of the salivary and buccal secretions. **Trans Clin Soc London**, v. 21, p. 176-179, 1888.

HASEGAWA, T.; AZLINA, A.; JAVKHLAN, P.; YAO, C.; AKAMATSU, T.; HOSOI, K. Novel phosphorylation of aquaporin-5 at its threonine 259 through cAMP signaling in salivary gland cells. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 301, n. 3, p. C667-C678, 2011.

HISCOCK, J.; BEROUKAS, D.; JONSSON, R.; GORDON, T. P.; WATERMAN, S. A. Quantitation of indirect immunofluorescence on paraffin sections with confocal microscopy. 2006.

HOUWER, A. M. Keratitis filamentosa and chronic arthritis. **Trans Ophthalmol Soc UK**, v. 47, p. 88-96, 1927.

HOWARD, C.; REED, M. **Unbiased Stereology**. 2ª. Liverpool, U.K.: QTP Publications, 2010. v. p.

HOWARD, V.; REED, M. G. **Unbiased stereology**. 2005. v. p.

JIN, J. O.; YU, Q. T Cell-Associated Cytokines in the Pathogenesis of Sjögren's Syndrome. v. S(9):11742, 2013.

JONSSON, R.; GORDON, T. P.; KONTTINEN, Y. T. Recent advances in understanding molecular mechanisms in the pathogenesis and antibody profile of Sjögren's syndrome. **Current rheumatology reports**, v. 5, n. 4, p. 311-316, 2003.

KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. Histologia e embriologia oral: texto, atlas e correlações clínicas. In: (Org.). **Histologia e embriologia oral: texto, atlas e correlações clínicas**: Medicina Panamericana Editora do Brasil Ltda, 1999. p.

KING, L. S.; KOZONO, D.; AGRE, P. From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 5, n. 9, p. 687-698, 2004.

KORN, G. P.; PUPO, D. B.; QUEDAS, A.; BUSSOLOTI FILHO, I. Correlação entre o grau de xerostomia e o resultado da sialometria em pacientes com Síndrome de Sjögren. **Rev Bras Otorrinolaringol**, v. 68, n. 5, p. 624-8, 2002.

KREMER, J. R.; MASTRONARDE, D. N.; MCINTOSH, J. R. Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD. **Journal of structural biology**, v. 116, n. 1, p. 71-76, 1996.

LADEKARL, M. Objective malignancy grading: a review emphasizing unbiased stereology applied to breast tumors. **Apmis**, v. 106, n. S79, p. 5-34, 1998.

LANE, H.; CALLIHAN, T.; JAFFE, E.; FAUCI, A.; MOUTSOPOULOS, H. Presence of intracytoplasmic IgG in the lymphocytic infiltrates of the minor salivary glands of patients with primary Sjogren's syndrome. **Clinical and experimental rheumatology**, v. 1, n. 3, p. 237-239, 1982.

LEE, M.; RUTKA, J.; SLOMOVIC, A.; MCCOMB, J.; BAILEY, D.; BOOKMAN, A. Establishing guidelines for the role of minor salivary gland biopsy in clinical practice for Sjogren's syndrome. **The Journal of rheumatology**, v. 25, n. 2, p. 247-253, 1998.

LEITE, G. J.; MAMEDE, R. C. M.; LEITE, M. G. J. Salivary flow measure: refinements to the spitting method and use of the filter paper. 2002.

LEROY, J.; PENNEC, Y.; SOULIER, C.; BERTHELOT, J.; LETOUX, G.; YOUINOU, P. Follow up study of labial salivary gland lesions in primary Sjögren's syndrome. **Ann Rheum Dis**, v. 51, n. 6, p. 777-780, 1992.

LILLIU, M. A.; SOLINAS, P.; COSSU, M.; PUXEDDU, R.; LOY, F.; ISOLA, R.; QUARTU, M.; MELIS, T.; ISOLA, M. Diabetes causes morphological changes in human submandibular gland: a morphometric study. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, 2014.

LIMARES, F. D. C.; SOLER, R. D. C.; BUSSOLOTI FILHO, I. Manifestações de linfoma na síndrome de Sjögren: existe relação. **RBORL**, v. 71, n. 3, p. 342-5, 2005.

LINDAHL, G.; HEDFORS, E.; KLARESKOG, L.; FORSUM, U. Epithelial HLA-DR expression and T lymphocyte subsets in salivary glands in Sjögren's syndrome. **Clinical and experimental immunology**, v. 61, n. 3, p. 475, 1985.

LIQUIDATO, B. M.; BUSSOLOTI FILHO, I. Avaliação da sialometria e biópsia de glândula salivar menor na classificação de pacientes com Síndrome de Sjögren. **Rev Bras Otorrinolaringol**, v. 71, n. 3, p. 346-54, 2005.

LIQUIDATO, B. M.; BUSSOLOTI FILHO, I.; CAMARGO, A. C. K.; DE CÁSSIA SOLER, R. Aspectos do diagnóstico na Síndrome de Sjögren. **Rev Bras Otorrinolaringol**, v. 68, n. 3, p. 363-7, 2002.

LIU, R.; SEIKALY, H.; JHA, N. Anatomic study of submandibular gland transfer in an attempt to prevent postradiation xerostomia. **The Journal of otolaryngology**, v. 31, n. 2, p. 76-79, 2002.

LOISEAU, P.; LEPAGE, V.; DJELAL, F.; BUSSON, M.; TAMOUZA, R.; RAFFOUX, C.; MENKES, C. J.; MEYER, O.; CHARRON, D.; GOLDBERG, D. HLA class I and class II are both associated with the genetic predisposition to primary Sjögren syndrome. **Human immunology**, v. 62, n. 7, p. 725-731, 2001.

LONGMAN, L.; MCCRACKEN, C.; HIGHAM, S.; FIELD, E. Clinical Oral Medicine: The clinical assessment of oral dryness is a significant predictor of salivary gland hypofunction. **Oral diseases**, v. 6, n. 6, p. 366-370, 2000.

LOPES, F. F.; SILVA, L. F. G.; CARVALHO, F. L.; OLIVEIRA, A. E. F. D. Estudo sobre xerostomia, fluxo salivar e enfermidades sistêmicas em mulheres na pós-menopausa. **RGO-Revista Gaúcha de Odontologia**, v. 56, n. 2, 2009.

LUKACH, L.; MALY, A.; ZINI, A.; AFRAMIAN, D. Morphometrical study of minor salivary gland in xerostomic patients with altered lipid metabolism. **Oral Dis**, 2013.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Stereological tools in biomedical research. **Anais da Academia brasileira de Ciências**, v. 75, n. 4, p. 469-486, 2003a.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Stereological tools in biomedical research. **An Acad Bras Cienc**, v. 75, n. 4, p. 469-486, 2003b.

MANGANELLI, P.; FIETTA, P. Apoptosis and Sjögren syndrome. *Seminars in arthritis and rheumatism*, 2003. Elsevier. p.49-65.

MANOUSSAKIS, M. N.; KAPSOGEORGOU, E. K. The role of intrinsic epithelial activation in the pathogenesis of Sjögren's syndrome. **Journal of autoimmunity**, v. 35, n. 3, p. 219-224, 2010.

MANTHORPE, R.; ASMUSSEN, K.; OXHOLM, P. Primary Sjogren's syndrome: diagnostic criteria, clinical features, and disease activity. **The Journal of rheumatology. Supplement**, v. 50, p. 8-11, 1997.

MARCOS, R.; MONTEIRO, R. A.; ROCHA, E. The use of design-based stereology to evaluate volumes and numbers in the liver: a review with practical guidelines. **Journal of anatomy**, v. 220, n. 4, p. 303-317, 2012.

MASAKI, Y.; SUGAI, S. Lymphoproliferative disorders in Sjögren's syndrome. **Autoimmunity Reviews**, v. 3, n. 3, p. 175-182, 2004.

MATTFELDT, T. Prediction of the variance of stereological volume estimates from systematic sections using computer-intensive methods. **Journal of microscopy**, v. 222, n. 3, p. 166-176, 2006.

MAVRAGANI, C. P.; MOUTSOPOULOS, H. M. The geoeidemiology of Sjögren's syndrome. **Autoimmunity reviews**, v. 9, n. 5, p. A305-A310, 2010.

MAYHEW, T. The new stereological methods for interpreting functional morphology from slices of cells and organs. **Experimental Physiology**, v. 76, n. 5, p. 639-665, 1991.

MIKULICZ, J. Über eine eigenartige symmetrische Erkrankung der Tränen- und Mundspeicheldrüsen. **Beitr. Chir. Fortschr. Stuttgart**, v. 610, 1892.

MOLINA, C.; ALLIENDE, C.; AGUILERA, S.; KWON, Y.-J.; LEYTON, L.; MARTÍNEZ, B.; LEYTON, C.; PÉREZ, P.; GONZÁLEZ, M. J. Basal lamina disorganisation of the acini and ducts of labial salivary glands from patients with Sjögren's syndrome: association with mononuclear cell infiltration. **Ann Rheum Dis**, v. 65, n. 2, p. 178-183, 2006.

MORAES, M.; MATOS, F. R.; COSTA, A.; SILVEIRA, É. J.; FREITAS, R. Síndrome de Sjögren: conceitos atuais e manejo das manifestações orais; Sjögren's syndrome: current concepts and management of its oral manifestations. **Brasília méd**, v. 47, n. 2, 2010.

MORBINI, P.; MANZO, A.; CAPORALI, R.; EPIS, O.; VILLA, C.; TINELLI, C.; SOLCIA, E.; MONTECUCCO, C. Multilevel examination of minor salivary gland biopsy for Sjogren's syndrome significantly improves diagnostic performance of AECG classification criteria. **Arthritis Res Ther**, v. 7, n. 2, p. R343-8, 2005.

MOREIRA, C. R.; AZEVEDO, L. R.; LAURIS, J. R. P.; TAGA, R.; DAMANTE, J. H. Quantitative age-related differences in human sublingual gland. **Archives of oral biology**, v. 51, n. 11, p. 960-966, 2006.

MORGAN, W. S.; CASTLEMAN, B. A clinicopathologic study of "Mikulicz's disease". **The American journal of pathology**, v. 29, n. 3, p. 471, 1953.

MOUTON, P. R. **Unbiased stereology: a concise guide**. JHU Press, 2011. v. p.

MOUTSOPOULOS, H.; HOOKS, J.; CHAN, C.; DALAVANGA, Y.; SKOPOULI, F.; DETRICK, B. HLA-DR expression by labial minor salivary gland tissues in Sjögren's syndrome. **Ann Rheum Dis**, v. 45, n. 8, p. 677-683, 1986.

MUELLER, A.; HOLL-ULRICH, K.; LAMPRECHT, P.; GROSS, W. Germinal centre-like structures in Wegener's granuloma: the morphological basis for autoimmunity? **Rheumatology**, v. 47, n. 8, p. 1111-1113, 2008.

MÜLLER, W. Stereology of inflammatory connective tissue infiltrates in oral mucosa. **Pathology-Research and Practice**, v. 166, n. 2, p. 271-289, 1980.

NEVILLE, B.; DD, D.; ALLEN, C. **Patologia Oral & Maxilofacial**. 3ª. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. v. p.

NEVILLE, B.; DOUGLAS, D.; ALLEN, C. **Patologia Oral & Maxilofacial**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 2009.

NISHIWAKI DANTAS, M. C. Atualização em olho seco. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v. 62, n. 1, p. 101-105, 2000.

OORT, J.; BAAK, J. P. A. Structural Morphology. In: (Org.). **A Manual of Morphometry in Diagnostic Pathology**: Springer Berlin Heidelberg, 1983. cap. 5. p. 41-46.

OXHOLM, P.; DANIELS, T.; BENDTZEN, K. Cytokine Expression in Labial Salivary Glands from Patients with Primary Sjögren's Syndrome. **Autoimmunity**, v. 12, n. 3, p. 185-191, 1992.

PARSLOW, T. G. **Medical immunology**. 10ª. New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill, 2001. v. 814 p.

PÉREZ, P.; KWON, Y. J.; ALLIENDE, C.; LEYTON, L.; AGUILERA, S.; MOLINA, C.; LABRA, C.; JULIO, M.; LEYTON, C.; GONZÁLEZ, M. J. Increased acinar damage of salivary glands of patients with Sjögren's syndrome is paralleled by simultaneous imbalance of matrix metalloproteinase 3/tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and matrix metalloproteinase 9/tissue inhibitor of metalloproteinases 1 ratios. **Arthritis & Rheumatism**, v. 52, n. 9, p. 2751-2760, 2005.

PRINCE, H. E.; HOGREFE, W. R. Evaluation of a line immunoblot assay for detection of antibodies recognizing extractable nuclear antigens. **Journal of clinical laboratory analysis**, v. 12, n. 5, p. 320-324, 1998.

RAMOS-CASALS, M.; BRITO-ZERÓN, P.; SOLANS, R. Autoimmune Diseases Study Group (GEAS) of the Spanish Society of Internal Medicine (SEMI). **Systemic involvement in primary Sjogren's syndrome evaluated by the EULAR-SS disease activity index: analysis of**, v. 921, 2013.

ROESCHER, N.; TAK, P. P.; ILLEI, G. G. Cytokines in Sjögren's syndrome. **Oral diseases**, v. 15, n. 8, p. 519-526, 2009.

SANTIAGO, M. L.; SEISDEDOS, M. R.; SALINAS, R. N. G.; SECCO, A.; CLAVERIE, L. M.; TECHERA, L.; TAKASHIMA, L.; AICARDI, P.; ROSALES, M. A. S.; KNOBEL, E. Frequency of complications and usefulness of the minor salivary gland biopsy. **Reumatología Clínica (English Edition)**, v. 8, n. 5, p. 255-258, 2012.

SANTOS, P. P. D. A.; IGLESIAS, D. P. P.; SOUZA, E. L. D.; FREITAS, R. D. A.; GALVÃO, H. C. Saliva: métodos atuais para coleta e obtenção da amostra; Saliva: current methods for collection and attainment of the sample. **Rev. Fac. Odontol. Porto Alegre**, v. 48, n. 1/3, p. 95-98, 2007.

SCOTT, J. Quantitative age changes in the histological structure of human submandibular salivary glands. **Archives of oral biology**, v. 22, n. 3, p. 221-227, 1977.

SCOTT, J.; FLOWER, E.; BURNS, J. A quantitative study of histological changes in the human parotid gland occurring with adult age. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 16, n. 10, p. 505-510, 1987.

SHIBOSKI, S.; SHIBOSKI, C.; CRISWELL, L.; BAER, A.; CHALLACOMBE, S.; LANFRANCHI, H.; SCHIØDT, M.; UMEHARA, H.; VIVINO, F.; ZHAO, Y. American College of Rheumatology classification criteria for Sjögren's syndrome: A data-driven, expert consensus approach in the Sjögren's International Collaborative Clinical Alliance Cohort. **Arthritis care & research**, v. 64, n. 4, p. 475-487, 2012.

SJÖGREN, H. S. Zur Kenntnis der Keratoconjunctivitis sicca (Keratitis filiformis bei Hypofunktion der Tränen drusen). **Acta Ophthalmol**, p. 151-162, 1933.

SKOPOULI, F.; FOX, P.; GALANOPOULOU, V.; ATKINSON, J.; JAFFE, E.; MOUTSOPOULOS, H. T cell subpopulations in the labial minor salivary gland histopathologic lesion of Sjogren's syndrome. **The Journal of rheumatology**, v. 18, n. 2, p. 210-214, 1991.

SOARES, M. S. M.; LIMA, J.; PEREIRA, S. Avaliação do fluxo salivar, xerostomia e condição psicológica em mulheres com Síndrome da Ardência Bucal. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 37, n. 4, p. 315-9, 2008.

SØRENSEN, C. E.; LARSEN, J. O.; REIBEL, J.; LAURITZEN, M.; MORTENSEN, E. L.; OSLER, M.; PEDERSEN, A. M. L. Associations between xerostomia, histopathological alterations, and autonomic innervation of labial salivary glands in men in late midlife. **Experimental gerontology**, v. 57, p. 211-217, 2014.

SØRENSEN, F. Unbiased stereologic techniques for practical use in diagnostic histopathology. **Pathologica**, v. 87, n. 3, p. 263-278, 1995.

SOTO-ROJAS, A. E.; KRAUS, A. The oral side of Sjögren syndrome. Diagnosis and treatment. A review. **Archives of medical research**, v. 33, n. 2, p. 95-106, 2002.

SPEIGHT, P.; CRUCHLEY, A.; WILLIAMS, D. Epithelial HLA-DR expression in labial salivary glands in Sjögren's syndrome and nonspecific sialadenitis. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 18, n. 3, p. 178-183, 1989.

SPEIGHT, P.; CRUCHLEY, A.; WILLIAMS, D. Quantification of plasma cells in labial salivary glands: increased expression of IgM in Sjögren's syndrome. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 19, n. 3, p. 126-130, 1990.

SZABO, K.; PAPP, G.; DEZSO, B.; ZEHER, M. The Histopathology of Labial Salivary Glands in Primary Sjögren's Syndrome: Focusing on Follicular Helper T Cells in the Inflammatory Infiltrates. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, p. 11, 2014.

TAKATA, K.; MATSUZAKI, T.; TAJIKA, Y. Aquaporins: water channel proteins of the cell membrane. **Progress in histochemistry and cytochemistry**, v. 39, n. 1, p. 1-83, 2004.

TINCANI, A.; ANDREOLI, L.; CAVAZZANA, I.; DORIA, A.; FAVERO, M.; FENINI, M.-G.; FRANCESCHINI, F.; LOJACONO, A.; NASCIMBENI, G.; SANTORO, A. Novel aspects of Sjögren's syndrome in 2012. **BMC medicine**, v. 11, n. 1, p. 93, 2013.

TZIOUFAS, A. G.; KAPSOGEORGOU, E. K.; MOUTSOPOULOS, H. M. Pathogenesis of Sjögren's syndrome: what we know and what we should learn. **Journal of autoimmunity**, v. 39, n. 1, p. 4-8, 2012.

UNDERWOOD, E. E. Quantitative stereology. 1970.

VALIM, V.; ZANDONADE, E.; PEREIRA, A. M.; DE BRITO FILHO, O. H.; SERRANO, E. V.; MUSSO, C.; GIOVELLI, R. A.; CICONELLI, R. M. Prevalência da síndrome de Sjögren primária em importante área metropolitana no Brasil. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 53, n. 1, p. 29-34, 2013.

VAN BIJSTERVELD, O. Diagnostic tests in the sicca syndrome. **Archives of Ophthalmology**, v. 82, n. 1, p. 10-14, 1969.

VASCONCELOS II, A. J. A. D. **Estudo da glândula salivar menor de pacientes com síndrome de Sjögren: Análise histopatológica, caracterização do infiltrado inflamatório e associação com o vírus Epstein-Barr e citomegalovírus**. 2015. 94.

VITALI, C.; BOMBARDIERI, S.; JONSSON, R.; MOUTSOPOULOS, H.; ALEXANDER, E.; CARSONS, S.; DANIELS, T.; FOX, P.; FOX, R.; KASSAN, S. Classification criteria for Sjögren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 61, n. 6, p. 554-558, 2002.

WENZEL, J.; GERDSEN, R.; UERLICH, M.; BAUER, R.; BIEBER, T.; BOEHM, I. Antibodies targeting extractable nuclear antigens: historical development and current knowledge. **British Journal of Dermatology**, v. 145, n. 6, p. 859-867, 2001.

XANTHOU, G.; TAPINOS, N.; POLIHRONIS, M.; NEZIS, I.; MARGARITIS, L.; MOUTSOPOULOS, H. CD4 cytotoxic and dendritic cells in the immunopathologic lesion of Sjögren's syndrome. **Clinical and experimental immunology**, v. 118, p. 154-163, 1999.

YAMAMOTO, K. Pathogenesis of Sjögren's syndrome. **Autoimmunity reviews**, v. 2, n. 1, p. 13-18, 2003.

YAROM, N.; DAYAN, D.; BUCHNER, A.; VERED, M. Immunoprofile of focal lymphocytic infiltration in minor salivary glands of healthy individuals. **Oral Dis**, v. 13, n. 3, p. 274-278, 2007.

10. Anexos

ANEXO 1 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa/HUGV.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO ESTEREOLÓGICA DA GLÂNDULA SALIVAR MENOR DE PACIENTES COM SÍNDROME DE SJÖGREN.

Pesquisador: CACILDA SATOMI YANO MALLMANN

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 14966713.0.0000.5020

Instituição Proponente: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DO AMAZONAS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 388.023

Data da Relatoria: 04/09/2013

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

MANAUS, 09 de Setembro de 2013

Assinador por:
Ana Paula Pessoa de Oliveira
(Coordenador)

ANEXO 2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

 <p>UFAM</p>	<p>UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e aplicada</p>	
--	--	---

Equipe de Pesquisa: Cacilda Satomi Yano Mallmann (Mestranda Orientanda), Dr. Luiz Fernando de Souza Passos (Orientador); Dr. Oscar Tadeu Ferreira da Costa (Co-Orientador), Dra Tatiana Nayara Libório dos Santos (Co-Orientadora), Antonio Jorge de Vasconcelos II (Mestrando Colaborador), Nikeila Chacon de Oliveira Conde (Colaboradora) e Jessica de Almeida Hayden (PIBIC).

Programa de pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada: Av. General Rodrigo Otávio Jordão Ramos, 300 Campus Universitário – Setor Sul, Bloco H. Fone (092) 3305-4035 **email:** imunologia@ufam.edu.br . ou Cacilda: (092) 3305-4750 **email:** cacildasatomi@yahoo.com.br

Comitê de Ética em Pesquisa - CEP/UFAM, Rua Terezina, 4950, Adrianópolis, Manaus-AM, Telefone:3305-5130; Fax: (92) 3305-5130; **e-mail:** cep@ufam.edu.br

Local da coleta de dados: Ambulatório da Faculdade de Odontologia da UFAM.

Nº Ficha: _____

Convidamos o (a) Sr (a) para participar da Pesquisa **Avaliação estereológica da glândula salivar menor de pacientes com Síndrome de Sjögren**, sob a responsabilidade da pesquisadora Cacilda Satomi Yano Mallmann, a qual pretende avaliar as alterações presentes na sua boca que podem estar relacionadas à secura que você apresenta na boca ou outras situações que pretendemos descobrir. Esse conhecimento poderá nos ajudar a melhorar a condição de saúde da sua boca, na redução das consequências da sua doença e na melhoria da sua qualidade de vida.

Sua participação é voluntária e se dará por meio de uma análise da sua boca para identificação e descrição dos sintomas. Para isso, examinaremos sua boca, seu lábios, sua língua, sua gengiva, sua bochecha e o céu da sua boca, além dos seus dentes. Se você possuir alguma alteração na boca ou possuir suspeita de ter uma alteração maior relacionada à sua doença, nós tiraremos um fragmento da sua mucosa atrás do seu lábio inferior (biópsia) para analisar e verificar a gravidade da sua doença ou então para confirmar se você tem essa doença que estamos suspeitando.

Rubrica

Os riscos decorrentes de sua participação na pesquisa são os mesmos de qualquer outro tipo de cirurgia, pois a biópsia é um procedimento cirúrgico de pequeno porte que somente é feita se houver indicação. Portanto, o risco é muito pequeno, caso você tenha alguma alteração sistêmica que dificulte sua cicatrização. Tomaremos todos os cuidados de lhe perguntar sobre todo seu estado de saúde geral para garantir o sucesso desse procedimento. Se você aceitar participar, estará contribuindo para avanços na área da saúde, os quais ocorrem através de estudos como este.

Se depois de consentir em sua participação o (a) Sr (a) desistir de continuar participando, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem nenhum prejuízo a sua pessoa. O (a) Sr (a) não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhuma remuneração. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em sigilo. Para qualquer outra informação, o (a) Sr (a) poderá entrar em contato com o pesquisador no Hospital Universitário Getúlio Vargas no endereço Rua Thomás de Vila Nova (antiga Apurinã), 300 – Praça 14 de Janeiro, pelo telefone (92) 3305-4749, ou poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/UFAM, na Rua Teresina, 4950, Adrianópolis, Manaus-AM, telefone/fax: (92) 3305-5130.

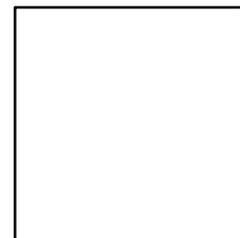
Consentimento Pós-Informação

Eu, _____, fui informado sobre o que o pesquisador quer fazer e porque precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

Data: ____/____/2013

Assinatura do participante

Assinatura do pesquisador



Impressão do dedo polegar
Caso não saiba assinar

ANEXO 3 Questionário de saúde Avaliação estereológica da glândula salivar menor em pacientes com suspeita de Síndrome de Sjögren

IDENTIFICAÇÃO

Número do registro na FAO: _____

Número do registro no estudo: _____

Nome: _____

Sexo: _____ Raça: _____ Data de entrada: _____

Data e local de Nascimento: _____ Idade: _____

Endereço: _____

Telefone: _____ Celular: _____

Doença auto-imune presente: _____

História familiar de doença auto-imune: _____

Protocolo de tratamento: _____

QUESTIONARIO DE SAUDE

1. Já tomou anestesia para tratar os dentes? () SIM () NÃO
2. Caso afirmativo houve reação adversa? () SIM () NÃO
3. Já extraiu algum dente? () SIM () NÃO
4. Ocorreu algum acidente durante ou após a extração? () SIM () NÃO
5. Costuma sangrar excessivamente quando extrai um dente ou é machucado? () SIM () NÃO
6. Possui dificuldade de cicatrização? () SIM () NÃO
7. Tem hematomas com frequência? () SIM () NÃO
8. Está fazendo uso de algum medicamento atualmente? () SIM () NÃO
9. Se positivo, quais? _____
10. Teve alguma reação com medicamentos ou alimentos? () SIM () NÃO
11. Se positivo, quais? _____
12. Você tem asma? () SIM () NÃO
13. Se positivo, a última crise foi quando? _____
14. Você ou algum membro de sua família tem diabetes? () SIM () NÃO
15. Se positivo, quem? _____
16. Você costuma urinar mais de 7x ao dia? () SIM () NÃO
17. Sente sede a maior parte do tempo? () SIM () NÃO

18. Você já teve casos de linfomas pré-existentes, doença de enxerto versus hospedeiro e sarcoidose? () SIM () NÃO
19. Você está fazendo uso de anti-hipertensivos? () SIM () NÃO
20. Você já foi submetidos a radiação ou quimioterapia para tratamento de câncer de cabeça e pescoço? () SIM () NÃO
21. Você esta grávida? () SIM () NÃO
22. O paciente necessita de acompanhamento medico? () SIM () NÃO
23. POR QUE? _____

DADOS DA DOENÇA:

- 1.() Você tem olho seco, diariamente, persistentemente, há mais de 3 meses?
- 2.() Você tem a sensação recorrente de areia nos olhos?
- 3.() Você necessita do uso de lágrima artificial mais de 3 vezes ao dia?
- 4.() Você tem sensação de boca seca, diariamente, há mais de três meses?
- 5.() Você tem inchaço das glândulas salivares, recorrente ou persistente, enquanto adulto?
- 6.() Você frequentemente ingere líquidos para facilitar a deglutição, principalmente de alimentos secos?

CONDIÇÃO DA DOENÇA:

Doença Auto-imune Isolada () Qual? _____

SSj Confirmada () Por que? _____

SSj Suspeita () Por que? _____

EXAMES OBJETIVOS:

1- GERAL

- Constituição física: _____
- Edemas e tumefações visíveis: _____
- Sinais vitais

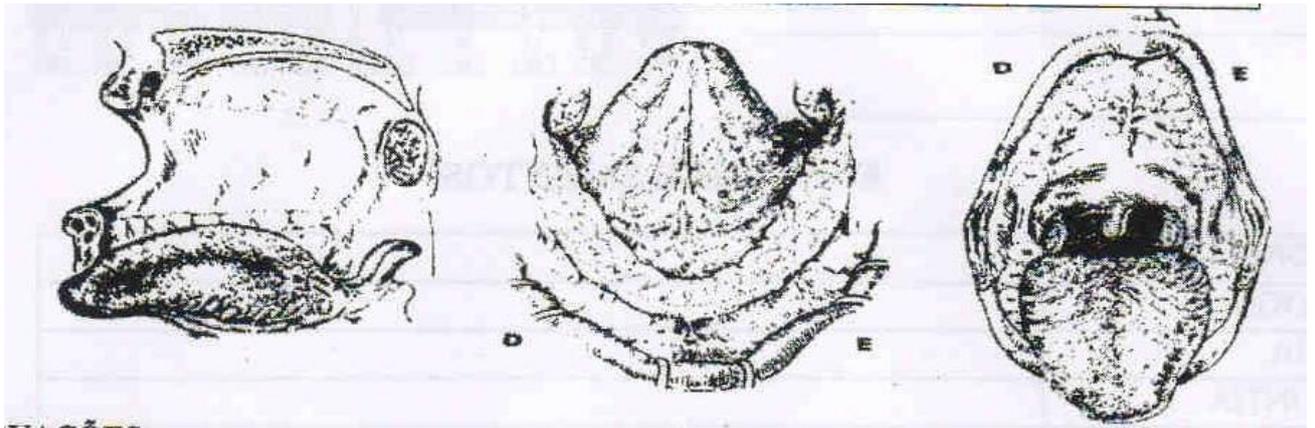
Data	Temperatura	Pressão arterial	Respiração	Pulso
/ /	°C	mm Hg	resp/min	bat/min
/ /	°C	mm Hg	resp/min	bat/min
/ /	°C	mm Hg	resp/min	bat/min
/ /	°C	mm Hg	resp/min	bat/min
/ /	°C	mm Hg	resp/min	bat/min

2- BUCO-FACIAL

- Inspeção e palpação extra-oral: _____

Inspeção e palpação intra-oral

1.	Lábio	3.	Língua	5.	Palato duro	7.	Orofaringe
2.	Mucosas	4.	Assoalho	6.	Palato mole	8.	Gengiva



DESCRIÇÃO DO ASPECTO INTRA-ORAL DAS LESÕES ORAIS:

ASPECTO DA SALIVA: _____

OBSERVAÇÕES: _____

EXAMES COMPLEMENTARES:

Fluxo salivar não estimulado: () _____

Fluxo salivar estimulado: () _____

Biópsia: () _____

Outros: () _____

Teste de Schirmer: () Positivo () Negativo – Resultado Específico: _____

Presença de Anticorpos: () Anti-Ro (SS-A) () Anti-La (SS-B)

Presença de Virus: () EBV () CMV () Parvovirus

ANEXO 4 - Questionário Oftalmo-Reumato

UNIVERSIDADE FEDERAL DE AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA
AMBULATÓRIO OFTALMO-REUMATO

Nome: _____

Idade: _____ Naturalidade: _____

Profissão: _____ Sexo: _____

Anamnese (__/__/__)

Queixa Principal: _____

Historia da Doença Atual:

- | | | |
|---|--|---|
| <input type="checkbox"/> Ardência | <input type="checkbox"/> Fotofobia | <input type="checkbox"/> Hiperemia ocular |
| <input type="checkbox"/> Lacrimejamento | <input type="checkbox"/> Sensação de Areia | <input type="checkbox"/> Olho Seco |
| <input type="checkbox"/> Prurido | <input type="checkbox"/> BAV | <input type="checkbox"/> Outros |

Historia Patologica Pgressa:

Doença Reumática Não Sim Qual? _____

HAS Não Sim

Diabetes Não Sim

Outras _____

Medicações em uso: _____

História Familiar: _____

Revisão Sistêmica: _____

Exame Físico:

Schimmer OD _____ OE _____ / BUT OD _____ OE _____ / PIO OD _____ OE _____

Biomicroscopia: _____

Fundoscopia: OD: S/ Alt Alterações _____

OE: S/ Alts Alterações _____

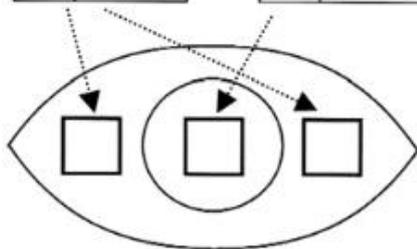
Hipótese Diagnóstica: _____

Conduta: _____

SICCA Ocular Staining Score

Right Eye

Lissamine Green (conjunctiva only)		Fluorescein (cornea only)	
Grade	Dots	Grade	Dots
0	0-9	0	0
1	10-32	1	1-5
2	33-100	2	6-30
3	>100	3	>30

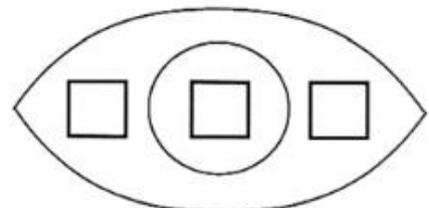


- +1 - patches of confluent staining
- +1 - staining in pupillary area
- +1 - one or more filaments

--	--

Left Eye

Lissamine Green (conjunctiva only)		Fluorescein (cornea only)	
Grade	Dots	Grade	Dots
0	0-9	0	0
1	10-32	1	1-5
2	33-100	2	6-30
3	>100	3	>30



- +1 - patches of confluent staining
- +1 - staining in pupillary area
- +1 - one or more filaments

--	--

ANEXO 5 Critério para diagnóstico da SS (versão revisada pelo Consenso Americano Europeu – AECG-2002)

- 1) Sintomas oculares: resposta positiva a pelo menos uma das questões a seguir:
 - a) Você tem apresentado sensação diária e persistente de olho seco há mais de 3 meses?
 - b) Você tem apresentado sensação de areia ou corpo estranho nos olhos?
 - c) Você necessita de usar colírio substituto de lágrima mais que 3 vezes ao dia?
- 2) Sintomas orais: resposta positiva pelo menos a umas das questões a seguir:
 - a) Você tem apresentado sensação diária de boca seca há mais de 3 meses?
 - b) Você tem apresentado aumento decorrente ou persistente de glândulas salivares após a idade adulta?
 - c) Você necessita de beber líquidos para ajudar a deglutir alimentos mais secos?
- 3) Sinais oculares: resultado positivo pelo menos a um dos testes a seguir:
 - a) Schirmer 1 \leq 5 mm em 5 minutos
 - b) Rosa bengala $>$ 4 de acordo com os escores de Bijsterveld
- 4) Histopatologia de glândulas salivares menores: escore \geq 1 foco/4 mm² de infiltrado linfoplasmocitário (1 foco é o aglomerado de 50 ou mais linfócitos ou plasmócitos).
- 5) Envolvimento de glândulas salivares: resultado positivo em pelo menos um dos exames a seguir:
 - a) Fluxo salivar não-estimulado \leq 1,5 ml/15 minutos
 - b) Sialografia de parótida mostrando sialectasias difusas, sem evidência de obstrução dos ductos maiores.
 - c) Cintilografia salivar com atraso na captação, redução e na concentração e/ou atraso na secreção do traçador.
- 6) Auto-anticorpos: presença dos anticorpos séricos a seguir:
 - a) Anti-SS-A/Ro ou anti-SS-B/La, ou ambos.

Diagnóstico

- Síndrome de Sjögren primária:
Presença de 4 itens positivos em 6, desde que o item 4 ou item 6 seja positivo.
- Síndrome de Sjögren secundária: excluir o item 6 para essa avaliação

Resposta positiva aos itens 1 ou 2 + duas respostas positivas entre os itens 3 e 5.

Critério de Exclusão

- Radioterapia anterior de cabeça e pescoço
- Infecção por Hepatite C
- AIDS
- Linfoma Preexistente
- Sarcoidose
- Doença enxerto-versus-hospedeiro
- Uso de drogas anticolinérgicas

ANEXO 6 Critérios de Classificação da Síndrome de Sjögren propostos pelo Colégio Americano de Reumatologia em 2012 (SHIBOSKI et al., 2012).

Estes critérios se aplicam a indivíduos com sinais/sintomas que podem ser sugestivos de SS.

São classificados como Síndrome de Sjögren, pacientes que apresentarem pelo menos 2 entre os 3 seguintes critérios objetivos:

1. Presença de anti-SSA-Ro e/ou anti-SSB-La ou (fator reumatoide positivo e ANA título $\geq 1:320$).
2. Sialadenite linfocítica focal com presença de focus/score ≥ 1 focus/ 4 mm²
3. Ceratoconjuntivite seca com escore de coloração ocular com ≥ 3 (válido para pacientes que não estejam em uso de colírio para glaucoma e não tenham sido submetido à cirurgia em córnea ou estética de pálpebras nos últimos 5 anos).

Os seguintes diagnósticos devem ser excluídos:

- História de radioterapia de cabeça e pescoço
- Hepatite C
- Síndrome de Imunodeficiência adquirida
- Sarcoidose
- Amiloidose
- Doença de enxerto versus hospedeiro
- Síndrome de Hiper IgG4

ANEXO 7 Tabela com a descrição da equipe participante do projeto de pesquisa.

NOME	FORMAÇÃO	TÍTULO	ÓRGÃO	ATIVIDADE
Cacilda Satomi Yano Mallmann	Bioquímica	Especialista	UFAM	Mestranda
Luiz Fernando de Souza Passos	Médico	Doutor	UFAM	Orientador
Oscar Tadeu Ferreira da Costa	Biólogo	Doutor	UFAM	Co-orientador
Tatiana N. Libório dos Santos	Cirurgiã-Dentista	Doutora	UFAM	Co-orientadora
Nikeila Chacon de Oliveira Conde	Cirurgiã-Dentista	Doutora	UFAM	Colaboradora
Rafael Pereira	Médico	Residente	UFAM	Colaborador
Antonio Jorge de Vasconcelos II	Cirurgião-Dentista	Especialista	UFAM	Colaborador
Jéssica Bruna Corrêa Lindoso	PIBIC	Acadêmica	UFAM	Colaboradora
		FAO		