

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

JÉSSICA BARROSO BARBOSA

**CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA DE BIÓPSIA DE GLÂNDULA SALIVAR
MENOR COMO FATOR DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO DE PACIENTES
COM SÍNDROME DE SJÖGREN**

MANAUS

2021

JÉSSICA BARROSO BARBOSA

CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA DE BIÓPSIA DE GLÂNDULA SALIVAR
MENOR COMO FATOR DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO DE PACIENTES
COM SÍNDROME DE SJÖGREN

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Odontologia da Universidade Federal
do Amazonas como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre em
Odontologia.

Orientadora: Prof^a. Dra. Tatiana Nayara Libório Kimura

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Juliana Vianna Pereira

MANAUS
2021

Ficha Catalográfica

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

B238c Barbosa, Jéssica Barroso
Caracterização histológica de biópsia de glândula salivar menor
como fator diagnóstico e prognóstico de pacientes com Síndrome
de Sjögren / Jéssica Barroso Barbosa . 2021
80 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Tatiana Nayara Libório-Kimura
Coorientadora: Juliana Vianna Pereira
Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Federal
do Amazonas.

1. Síndrome de Sjögren. 2. Glândula salivar menor. 3.
Sialoadenite linfocítica focal. 4. Centros germinativos. 5. Lesão
linfoepitelial. I. Libório-Kimura, Tatiana Nayara. II. Universidade
Federal do Amazonas III. Título

JÉSSICA BARROSO BARBOSA

**CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA DE BIÓPSIA DE GLÂNDULA SALIVAR
MENOR COMO FATOR DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO DE PACIENTES
COM SÍNDROME DE SJÖGREN**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Odontologia da Universidade Federal
do Amazonas como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre em
Odontologia.

Manaus, 14 de setembro de 2021

BANCA EXAMINADORA

Presidente: Prof.^a Dr.^a. Tatiana Nayara Libório Kimura
Universidade Federal do Amazonas

Membro: Prof. Dr. Luiz Carlos de Lima Ferreira
Universidade Federal do Amazonas

Membro: Prof.^a. Dr.^a. Valéria Valim Cristo
Universidade Federal do Espírito Santo

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me dar sabedoria e discernimento na hora da dúvida e pela oportunidade de dar mais um passo na minha vida acadêmica.

A minha família. Meu pai, Francisco Barbosa, que sem o apoio, conselhos e ajuda eu não teria conseguido chegar até aqui. É o alicerce e a força para continuar, tudo que eu me dedico e me esforço é para te honrar papai. Obrigada sempre por ser meu pai e minha mãe e nunca medir esforços para me ver feliz. Meu companheiro, Kelison, que caminha do meu lado a mais de 6 anos, sempre me apoiando em todas as minhas empreitadas, me mostrando caminhos e soluções, se orgulhando de mim e torcendo para que o melhor aconteça, obrigada por todo o apoio e por não desistir de mim nos meus piores momentos.

A minha orientadora, professora Tatiana Nayara Libório Kimura pelos ensinamentos, paciência e sua dedicação no que faz, sempre mostrando o caminho das pedras com gentileza e nos incentivando a buscar sempre sermos melhores e fugir do trivial.

Aos colaboradores, professora Juliana Vianna pela orientação e dedicação, professor Yan Nogueira pela ajuda imprescindível durante a elaboração da estatística desse estudo, graduanda Clara Natário por todo o suporte nos últimos meses e ter literalmente metido a mão na massa comigo, sua ajuda foi essencial, muito obrigada.

Aos meus colegas, mestrandos da turma de 2019 por todos os momentos compartilhados em disciplinas, clínicas e estágios docentes, foi bom dividir com vocês.

A Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Faculdade de Odontologia (FAO) e ao Programa de Pós-graduação em Odontologia (PPGO) por todo suporte e dedicação necessários para nos tornar mestres.

Ao Departamento de Patologia e Medicina Legal (DPML/UFAM) por permitir que essa pesquisa fosse realizada, além de todo o auxílio para isso acontecer.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo e por todo apoio ao programa.

RESUMO

A Síndrome de Sjögren (SS) é uma doença autoimune crônica sistêmica, onde a Biópsia de Glândula Salivar Menor (BGSM) desempenha um papel fundamental nos critérios de classificação da doença. Este trabalho teve como objetivo realizar uma caracterização histológica de glândulas salivares menores (GSM) com histologia positiva para SS utilizando as recomendações de Fisher et al. (2017) além de comparar as análises histopatológicas convencional e digital. Em um período de 10 anos, 123 pacientes com laudos suspeitos para SS foram localizados no Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Amazonas (DPML/UFAM). Destes, 50 foram selecionados por apresentarem laudo da rotina com biópsia positiva para SS. Após aplicação dos critérios de elegibilidade, 32 casos foram incluídos para serem avaliadas microscopicamente aplicando os critérios de 2017. A concordância intra-observador das análises tanto pelo método convencional quanto pelo método digital foram realizadas por meio de Coeficiente de Confiabilidade Intraclasse (CCI) utilizando variáveis contínuas de número de focos, área de parênquima glandular e score focal (SF) ≥ 1 nas diferentes técnicas. Adicionalmente foi realizada caracterização histológica exclusivamente qualitativa. Houve concordância diagnóstica entre os laudos histopatológicos positivos do arquivo e avaliação histopatológica nesta pesquisa em 75% (n=24) da amostra, sendo estes os que seguiram as etapas posteriores. Na análise convencional, a média do número de focos foi de 8,5 focos (± 4), com ICC de 0,835, a área glandular apresentou média de 19,5 mm² ($\pm 10,7$), com ICC de 0,966, e o SF médio de 2,04 ($\pm 1,05$). Já no método digital, as variáveis mensuradas foram a área glandular, que obteve média de 12,4 mm² ($\pm 6,8$), com ICC de 0,976 e o SF que obteve média de 3,2 ($\pm 1,5$). Quando comparados os SF obtidos em cada método verificou-se um ICC de 0,769, evidenciando diferentes resultados de SF em cada método de avaliação, não variando, porém, o diagnóstico. Entre as características adicionais tivemos presença de fibrose (95,83%), infiltração adiposa (45,83%), dilatação ductal (95,83%), atrofia acinar (100%) e ainda lesão linfoepitelial (LESA) (33,33%) e centro germinativo (CG) (4,16%) importantes para o prognóstico da lesão. Foi possível concluir neste trabalho que a BGSM em pacientes com suspeita de SS é de extrema importância em função de suas implicações diagnósticas e prognósticas, no entanto etapas de sua avaliação podem estar sujeitas a subjetividade em menor ou maior grau, sobretudo em relação a contagem de focos linfocitários. Sugere-se que a LESA e CG, apresentem baixa prevalência em GSM de pacientes com SS, podendo ser relatados de forma inconsistente. A análise digital apresenta o SF frequentemente superestimado em relação ao obtido pelo método convencional, o que poderia repercutir em divergências prognósticas, mas não diagnósticas.

Palavras-chave: Síndrome de Sjögren. Glândula salivar menor. Sialoadenite linfocítica focal. Centro germinativo. Lesão linfoepitelial.

ABSTRACT

Sjögren's Syndrome (SS) is a chronic systemic autoimmune disease, where a Minor Salivary Gland Biopsy (BGSM) plays a key role in the disease classification criteria. This study aimed to perform a histological characterization of minor salivary glands (GSM) with positive histology for SS using the recommendations of Fisher et al. (2017) in addition to comparing conventional and digital histopathological analyses. Over a period of 10 years, 123 patients with reports suspected of having SS were kept at the Department of Pathology and Forensic Medicine at the Federal University of Amazonas (DPML / UFAM). Of these, 50 were selected for presenting a routine report with a positive biopsy for SS. After applying the eligibility criteria, 32 cases were included to be evaluated microscopically applying the 2017 criteria. The intra-observer agreement of the analyzes both by the conventional method and by the digital method were transferred by means of Intraclass Reliability Coefficient (ICC) using continuous variables number of foci, glandular parenchyma area and focus score (FS) ≥ 1 in the different techniques. Additionally, exclusively qualitative histological characterization was performed. There was diagnostic agreement between the positive histopathological reports of the file and the histopathological evaluation in this research in 75% (n = 24) of the sample. In the conventional analysis, the mean number of foci was 8.5 foci (± 4), with an ICC of 0.835, a glandular area with an average of 19.5 mm² (± 10.7), with an ICC of 0.966, and the mean SF of 2.04 (± 1.05). In the digital method, the variables measured were the glandular area, which had an average of 12.4 mm² (± 6.8), with an ICC of 0.976 and the SF, which had an average of 3.2 ($\pm 1, 5$). When comparing the FS chosen in each method, there was an ICC of 0.769, evidencing different FS results in each evaluation method, but the diagnosis did not vary. Among the characteristics, it has the presence of fibrosis (95.83%), adipose infiltration (45.83%), ductal dilatation (95.83%), acinar atrophy (100%) and lymphoepithelial lesion (LESA) (33.33 %) and germinal center (CG) (4.16%) important for the prognosis of the lesion. It was possible to conclude in this study that the BGSM in patients with suspected SS is extremely important due to its diagnostic and prognostic conclusions, however stages of its assessment may be related to subjectivity to a greater or lesser degree, especially in relation to the count of foci lymphocytes. It is suggested that an LESA and CG have a low prevalence in GSM of patients with SS, and may be inconsistently reported. The digital analysis presents the FS frequently overestimated in relation to the conventional method, which could have repercussions in prognosis, but not the diagnosis.

Keywords: Sjogren's Syndrome. Minor salivary gland. Focal Lymphocytic sialadenitis. Diagnosis. Germinal centers. Lymphoepithelial lesions.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Fluxograma de etapas da pesquisa..... 35
- Figura 2** - Todos os submenus que o comando Measurements possui e podem ser usados para medir imagens.....38

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Quantidade de pastas-arquivo e número total de laudos pertencentes ao arquivo do DPML/FM/UFAM, organizadas por ano de pesquisa.....35
- Tabela 2** - Critérios de classificação histológica para Síndrome de Sjögren de acordo com Fisher et al., 2017.....36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACR/EULAR	Colégio Americano de Reumatologia/ Liga Européia contra o Reumatismo
AR	Artrite Reumatóide
AECG	<i>American European Consensus Group</i>
BGSM	Biópsia de glândula salivar menor
CCI	Coeficiente de Confiabilidade Intraclasse
CEP	Comitê de Ética e Pesquisa com Seres Humanos
CG	Centros Germinativos
DIA	Análise Digital de Imagens
DPML	Departamento de Patologia e Medicina Legal
FDC	Células Dendríticas Foliculares
FLS	Sialoadenite Linfocítica focal
FM	Fibromialgia
SCC	Ceratoconjuntivite seca
SLE	Lupus Eritematoso Sistêmico
SF	<i>Score Focal</i>
GS	Glândula Salivar
GSM	Glândula Salivar Menor
HE	Hematoxilina-eosina
LESA	Lesão Linfoepitelial
LNH	Linfoma não-Hodgkin
LSG	Glândula Salivar Labial
MALT	Linfoma da Zona Marginal da Mucosa Associada ao Tecido Linfóide
MESA	Sialadenite Mioepitelial
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
NSCS	Sialadenite Crônica Não Específica
SCO	Escore de Coloração Ocular
SCS	Sialadenite Esclerosante Crônica

SICCA	Associação Internacional de Aliança Colaborativa de Sjogren
SS	Síndrome de Sjogren
SSp	Síndrome de Sjogren Primária
SSs	Síndrome de Sjogren Secundária
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
WSI	Imagem de Lâmina Inteira

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
3. OBJETIVOS.....	32
3.1 Objetivo geral.....	32
3.2 Objetivos específicos.....	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4.1 Desenho do estudo.....	33
4.2 Localização e amostragem.....	33
4.3 Participantes da pesquisa.....	33
4.4 Critérios de inclusão.....	33
4.5 Critérios de exclusão.....	34
4.6 Aspectos éticos.....	34
4.7 Detalhamento do estudo.....	34
4.7.1 Seleção da amostra e casuística.....	34
4.7.2 Fluxograma das atividades e detalhamento das análises.....	35
4.7.3 Análise histológica pelo meio convencional.....	37
4.7.4 Análise histológica pelo meio digital.....	38
4.8 Confiabilidade Intra-observador e Análise estatística.....	39
5. ARTIGO.....	40
6. CONCLUSÃO.....	69
REFERÊNCIAS.....	70
APÊNDICE A.....	74
APÊNDICE B.....	75
APÊNDICE C.....	77
APÊNDICE D.....	78
ANEXO A.....	80

1. INTRODUÇÃO

A Síndrome de Sjögren (SS) foi clínica e histologicamente descrita pelo oftalmologista sueco Henry Sjögren em 1933 (BARONE et al., 2015). É uma doença autoimune crônica multisistêmica com envolvimento de glândulas salivares e lacrimais. A doença causa, na maioria dos casos xerostomia e xeroftalmia, podendo ser primária (SSp) e secundária (SSs), a depender da presença de doença autoimune associada do tecido conjuntivo, podendo provocar manifestações sistêmicas em múltiplos órgãos. Tal condição tem uma notável predileção pelo sexo feminino, e é mais comumente encontrada entre a 4ª e 5ª décadas de vida.

A alteração fisiopatológica observada nas doenças autoimunes, como a SS, é a eliminação da função protetora dos epitélios. Um corpo considerável de evidências sugere que a perda de homeostase nas células epiteliais das glândulas salivares e lacrimais desempenha um papel importante na iniciação e progressão da SS. Ocorre uma inflamação crônica mediada por células T que leva à proliferação de células B produtoras de autoanticorpos, resultando em uma atrofia glandular global e deficiência na função (DANIELS; WHITCHER, 1994; DINESCU et al., 2017). Existem tratamentos que podem melhorar os sintomas e prevenir complicações da SS, mas é uma enfermidade ainda sem cura (SHIBOSKI et al., 2017; RASMUSSEN et al., 2014; VITALI et al., 2002; BARRERA et al., 2013; ALJANOBI et al., 2017).

A biópsia de glândula salivar menor (BGSM) é usada na classificação de SS primária desempenhando um papel fundamental no critério de classificação mais atual proposto Colégio Americano de Reumatologia / Liga Europeia contra o Reumatismo (ACR / EULAR) (SHIBOSKI et al, 2017). Em contrapartida, o tecido obtido e a interpretação histológica podem ser algumas vezes subjetivos e variáveis. (FISHER et al., 2017; DINESCU et al., 2017), reforçando a necessidade de uma análise criteriosa e por profissionais experientes.

A literatura acerca da histopatologia de SS demonstra que a característica anatomopatológica desta síndrome é a sialadenite linfocítica focal (FLS), definida como agregados múltiplos e densos de 50 ou mais linfócitos nas glândulas exócrinas em localizações perivasculares ou periductais e localizados

adjacentes a ácinos mucosos de aparência normal na glândula, lóbulos sem dilatação do ducto ou fibrose. O score focal (SF) calcula o número de agregados linfocitários por área de 4 mm² de tecido glandular. Um SF \geq 1, ou seja, um ou mais focos de 50 ou mais células por área de 4 mm² de tecido glandular é considerado o parâmetro histológico para o diagnóstico de SS, porém não deve ser analisada isoladamente para o estabelecimento do diagnóstico final da doença. (SOTO-ROJAS; KRAUS, 2002; DANIELS, 1984; DANIELS et al., 2011).

Na sialoadenite crônica inespecífica (NSCS), por vezes, as glândulas podem apresentar agregados linfocíticos semelhantes a focos, mas nesse caso, predominando também atrofia acinar, fibrose e ductos dilatados (COSTA, 2015). Tais características de NSCS (atrofia, fibrose, dilatação do ducto e inflamação difusa) e reposição gordurosa relacionada à idade do tecido da glândula salivar são achados comuns, especialmente em populações mais idosas.

Em contrapartida, é possível existir a presença de focos linfocíticos positivos no contexto da sialoadenite linfocítica focal, próximos também à tecido glandular alterado/anormal, e é preconizado que estes devem ser incluídos no cálculo do SF, desde que também adjacentes a parênquima normal em sua maioria, para evitar introdução de viés (FISHER et al., 2017, WICHETA et al., 2019).

Apesar de sua presença global, a SSp é muitas vezes mal diagnosticada e sua patogênese e biologia pouco estudadas, levando à carência de terapias capazes de modificar, amenizar ou retardar a doença. As glândulas salivares dos pacientes com SSp não são apenas uma “janela” diagnóstica para a doença, mas também são capazes de fornecer dados inestimáveis sobre a evolução da patologia, na estratificação dos pacientes e potencialmente capaz de informar sobre a resposta ao tratamento (LUCCHESI et al., 2020).

Em função da introdução de critérios e padronização mais recentes para o diagnóstico histopatológicos de SS (Fisher et al., 2017), justifica-se um estudo baseado na aplicação destes novos parâmetros, a fim de padronizar os laudos dos serviços, buscando a melhora no diagnóstico e prognóstico. Avaliando também outras alterações que ocorrem no parênquima glandular em ácinos e ductos, além de presença de fibrose, infiltração adiposa, centros germinativos (CG) e lesões linfoepiteliais (LESA), já que estes dois últimos tem também implicações prognósticas.

Nesse contexto, uma nova técnica vem surgindo progressivamente para auxiliar na investigação diagnóstica e caracterização de glândulas salivares menores (GSM) de pacientes com suspeita de SS. Essa ferramenta envolve análise de imagem através de um *software*, já utilizada em inúmeros processos diagnósticos do âmbito da patologia. Até o momento não há ampla literatura sobre este tipo de análise histopatológica digital de GSM para a análise de SS, deixando margem para questionamentos a respeito de sua aplicação, como vantagens, desvantagens e diferenças entre esta técnica e a técnica convencional de rotina.

Levando em consideração os desafios diagnósticos que a SS apresenta, propõe-se neste estudo a realização de uma caracterização histológica baseada na aplicação dos parâmetros preconizados por Fisher et al. (2017), buscando a melhora no diagnóstico e sinalização do prognóstico, avaliando também possíveis alterações no parênquima glandular que afeta ácinos e ductos, com repercussão na aparição de fibrose, infiltração adiposa, CG e LESAs, e além disso comparar duas técnicas de análise histológica distintas para SS.

A caracterização histológica de GSM é relevante para o processo de padronização de uma análise histopatológica confiável e com capacidade de reprodutibilidade entre patologistas. Este estudo fornece uma notável contribuição entre os que se propuseram a comparar diferentes metodologias de análise histopatológica de GSM, sendo importante para fomentar entre patologistas uma discussão embasada acerca do tema.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Características gerais

A SS é uma doença autoimune caracterizada por hipofunção das glândulas salivares e lacrimais. Pode ser classificada como forma primária (SSp) quando os sintomas são limitados a um efeito local nas glândulas salivares e lacrimais ou forma secundária (SSs), quando há envolvimento sistêmico. Clinicamente, é evidenciado por sintomas como boca e olhos secos, devido a função glandular alterada. A SS tem uma prevalência variando de 0,2% a 2,7% dependendo de como o estudo é guiado. A idade média do início da ocorrência da doença é entre a 4ª e a 5ª década de vida. A SS é caracterizada por uma proporção de 9: 1 de mulheres / homens, e quase todas as pacientes mulheres com SS estão no período pós-menopausa (STEWART et al., 2008; DINESCU et al., 2017; IWASA et al., 2015).

A SS é considerada a segunda doença autoimune reumática mais comum, afetando entre 0,05% e 0,4% da população mundial. No Brasil, um estudo demonstrou que a prevalência de SS em uma região metropolitana do país foi de 0,17%. Este foi o primeiro trabalho de cunho epidemiológico acerca do tema nacionalmente. Até o momento, não há estudo publicado sobre a prevalência da doença na região norte do Brasil, onde este trabalho foi realizado (VALIM et al., 2013; GIOVELLI et al., 2015).

Apesar de ser relativamente comum, ainda é raramente diagnosticada devido a uma apresentação pleomórfica com várias combinações de sintomas sicca relatados pelo paciente que varia de casos leves de sicca, fadiga e confusão com fibromialgia (FM) a casos sistêmicos graves, como artrite reumatoide (AR) e lúpus eritematoso sistêmico (SLE). Diversas manifestações extraglandulares também estão associadas à SS. Estes incluem: mal-estar, artralguas, mialgias, nevralgias, fenômeno de Raynaud, doença pulmonar intersticial, acidose tubular renal, linfoma, linfadenopatia, vasculite, neuropatia sensorial e citopenias. Ele também tem um amplo diagnóstico diferencial, incluindo infecção por hepatite C e HIV, síndrome hiper IgG4, sarcoidose e linfoma. Essas características fazem o estabelecimento de um diagnóstico

definitivo de SS difícil e afeta o planejamento adequado e a implementação do tratamento (GIOVELLI et al., 2015; WICHETA et al., 2019).

A SS costuma ser difícil de diagnosticar, pois as manifestações clínicas e laboratoriais variam amplamente. Nenhum dos marcadores de laboratório é sensível e específico. Vários conjuntos de critérios de classificação foram desenvolvidos nas últimas décadas. Todos esses conjuntos combinam achados clínicos, testes sorológicos e uma avaliação histológica do envolvimento das glândulas salivares (GUELLEC et al., 2013).

O diagnóstico das manifestações glandulares da SSp costuma ser complexo e multidisciplinar. Requer conhecimentos específicos nas áreas de oftalmologia, imunologia, patologia e imagem, o que torna obrigatório o reumatologista a trabalhar com profissionais dessas diferentes áreas para melhorar a precisão e o diagnóstico precoce (PEREIRA et al., 2014; TREVISANI et al., 2019).

A origem da hipossalivação na síndrome auto-imune da SSp permaneceram um enigma por muitos anos. Sabemos que as taxas de fluxo salivar variam amplamente entre os indivíduos saudáveis e estão sujeitas a variações fisiológicas além de serem afetadas por muitos medicamentos comumente prescritos e por outras doenças. A presença de focos linfocitários nas glândulas salivares (GS) de pacientes com SSp foi bem documentada e supunha-se que representasse os agentes causadores da hipossalivação na SSp. Recentemente, no entanto, vários estudos têm mostrado claramente que a correlação entre o fluxo salivar e o grau de inflamação é fraca e que a hipossalivação começa substancialmente antes do desenvolvimento de infiltração linfocítica e focos imunes nas GS, e que os dois não podem ser correlacionados. As células epiteliais intrinsecamente ativadas causam uma redução na produção de saliva e no conteúdo de mucina salivar (DANIELS; WHITCHER, 1994; WANG et al., 2018; PRINGLE, et al., 2019).

Além disso, a xerostomia está associada a um aumento da taxa de doenças dentárias, diminuição da percepção do paladar e dificuldade para engolir e falar. A hipossalivação na SSp não está correlacionada com a presença de focos imunes. Essa ativação desregulada das células epiteliais, resultando

em produção prolongada de citocinas pró-inflamatórias é suficiente para preparar as glândulas salivares para o desenvolvimento de um ambiente imune inflamatório semelhante a SSp (DANIELS; WHITCHER, 1994; WICHETA et al., 2017; WANG et al., 2018).

O olho seco afeta 85-98% dos pacientes com SSp, principalmente devido à diminuição da secreção basal das lágrimas. O envolvimento ocular geralmente leva à ceratoconjuntivite seca (SCC), caracterizada por irritação crônica e alterações anormais no epitélio da córnea e da conjuntiva. Sinais e sintomas incluem vermelhidão nos olhos, coceira, sensação de ardor, sensação de queimação ou corpo estranho e sensibilidade à luz. Aproximadamente metade (43%) dos pacientes com SS relatam ter essas queixas por mais de 5 anos, um quarto apresenta vermelhidão nos olhos pelo menos metade do tempo e 25% não conseguem produzir lágrimas. Os sintomas oculares são dolorosos e podem causar ressecamento da córnea e formação de cicatrizes (WICHETA et al., 2017; TREVISANI et al., 2019).

Várias doenças autoimunes, como artrite reumatoide ou SS, ocorrem em mulheres na pós-menopausa. Hormônios esteróides sexuais, como estrógenos, podem influenciar o aparecimento ou desenvolvimento de doenças autoimunes por meio de um mecanismo desconhecido. A deficiência de estrogênio na pós-menopausa pode provocar uma quebra da tolerância imunológica e induzindo assim a doença autoimune (IWASA et al., 2015).

2.2 Classificação

Durante a última década, os critérios de classificação mais utilizados foram os critérios do *American European Consensus Group* (AECG) de 2002, que se mostraram úteis na pesquisa e na prática clínica e foram os mais amplamente aceitos. No entanto, com o tempo, alguns testes de avaliação incluídos nesses critérios foram substituídos por outros por causa de efeitos adversos ou falta de sensibilidade e especificidade diagnósticas. Em 2012, após um estudo observacional patrocinado pelo *National Institutes of Health* (NIH) novos critérios de classificação desenvolvidos dentro do registro da SICCA (Associação Internacional de Aliança Clínica Colaborativa de Sjögren) foram publicados após aprovação provisória pela *American College of Rheumatology*

(ACR). Esses critérios foram elaborados para a entrada em ensaios clínicos e a população-alvo desenvolvimento e validação consistiram em indivíduos com sinais e sintomas sugestivos de SS. Entretanto, esses critérios não foram universalmente aceitos porque não incluíam testes para avaliar a boca seca. Em 2016, o Grupo de Trabalho dos Critérios Internacionais de Síndrome de Sjogren (ACR / EULAR) formulou novos critérios para o SSp que são universalmente aceitos e serviram de base para inúmeros estudos (FISHER et al., 2017; VAN GINKEL et al., 2019; TREVISANI et al., 2019).

O sistema de classificação proposto pelo AECG enumera 6 critérios diagnósticos, dos quais 4 precisam ser atendidos para estabelecer um diagnóstico de SS. Dos 4 critérios, pelo menos 1 deve ser um resultado positivo de BGSM ou um resultado sorológico positivo. Os esquemas revisados para diagnóstico proposto pelo ACR incluem apenas achados objetivos, incluindo resultado de BGSM positivo, resultado sorológico positivo e achados oculares positivos. Assim, um resultado positivo de BGSM é um achado particularmente importante em pacientes com SS auto anticorpo negativo (WICHETA et al., 2017).

Embora os exames sorológicos não sejam específicos para SSp, os anticorpos anti-Ro / SSA e anti-LA / SSB são frequentemente detectados em aproximadamente 50-90% e 25-60% dos pacientes, respectivamente (em função da técnica de detecção usada e das características de população analisada) e representam um dos principais critérios de classificação, os anticorpos anti-SS relacionados ao antígeno A positivos possuem especificidade, 87,5%; sensibilidade, 46,7%; valor preditivo positivo, 43,8%; negativo valor preditivo, 88,7% %) (WICHETA et al., 2017; TREVISANI et al., 2019).

Esses autoanticorpos também estão associados a uma maior frequência de manifestações sistêmicas e a uma maior extensão de infiltração linfocítica nas glândulas salivares. Embora os autoanticorpos anti-La / SSB foram excluídos dos critérios de classificação mais recentes, porque um estudo recente mostrou que esse anticorpo sozinho (ou seja, sem anti-Ro / SSA) não está associado ao fenótipo SSp não sejam marcadores específicos, eles são mais frequentemente associados ao SSp em comparação com outras doenças autoimunes sistêmicas.

Esse achado é relevante na prática clínica, pois esses anticorpos em combinação com as características clínicas e os resultados dos exames laboratoriais podem contribuir para distinguir entre a SSp e outras doenças autoimunes (TREVISANI et al., 2019).

Manifestações extra-glandulares, que incluem vasculite periférica neuropatia, acidose tubular renal ou púrpura, infiltrado pulmonar, doença linfoproliferativa e / ou anormalidades imunológicas, estão presentes em um subconjunto de pacientes e comumente entre aqueles com altos níveis de auto-anticorpos anti-Ro e anti-La (RASMUSSEN et al., 2014).

2.3 Biópsia (diagnóstico)

Recomendações internacionais foram publicadas para padronizar o exame histopatológico de amostras de BGSM em ensaios clínicos; no entanto, eles também são úteis para orientar e padronizar a prática clínica. Por muitos anos, a BGSM foi considerada uma consideração importante entre outros parâmetros para ajudar a confirmar o diagnóstico de SS. O procedimento BGSM tem sido considerada uma técnica adjunta diagnóstica com alta especificidade para SS, com poucas complicações pós-cirúrgicas e é relativamente simples e pode ser executado com anestesia local em regime ambulatorial, é realizada no lábio inferior e uma incisão horizontal de 1,5 a 2,0 cm é feita na mucosa labial clinicamente normal, paralela à borda vermelha e lateral à linha média. Recomenda-se a coleta de pelo menos 4-6 glândulas ou 8 mm² de tecido glandular. As amostras devem ser armazenadas em formaldeído a 10% tamponado para coloração com hematoxilina-eosina (HE). Colorações especiais para análise de fibrose, análise imuno-histoquímica e coloração por imunofluorescência não são necessárias em uma investigação diagnóstica morfológica de rotina. A imuno-histoquímica é necessária em pacientes com suspeita de linfoma associado à doença relacionada à IgG4 (STEWART et al., 2008; PEREIRA et al., 2014; WICHETA et al., 2017; TREVISANI et al., 2019).

A principal complicação do BGSM é a dormência labial, mas a complicação neurológica permanente provocada pela técnica de incisão linear ocorre apenas em 1,4% dos pacientes. Boas conexões entre reumatologistas,

patologistas e profissionais fazendo biópsia podem minimizar os riscos e otimizar a qualidade e o tamanho do material. De acordo com os critérios do ACR / EULAR de 2016 deve ser obrigatoriamente realizada para pacientes com teste negativo para o anticorpo anti-Ro / SSA, para avaliar o papel do BGSM no diagnóstico positivo da SS, foi evidenciado que a sensibilidade (80,0%) e a especificidade (87,5%) deste método são altas > 80% na maioria dos estudos. O valor preditivo positivo (VPP) foi de 57,1% e o valor preditivo negativo (VPN) foi de 95,5% (GIOVELLI et al., 2015; WICHETA et al., 2017; CARUBBI et al., 2018; TREVISANI et al., 2019).

Em 1968, Chisholm e Mason introduziram um sistema de graduação de BGSM com cinco graus, baseado na presença de infiltração linfocítica difusa e / ou focos linfocíticos, com um foco definido como um agregado de pelo menos 50 linfócitos, com arquitetura normal (grau 0), infiltrado leve e moderado (graus 1 e 2, respectivamente), presença de 1 foco (grau 3) e mais de 1 foco em 4 mm² (grau 4). Todos os agregados foram levados em consideração, qualquer que seja o aspecto do parênquima glandular adjacente. O resultado foi expresso como focos por 4 mm² de tecido. Greenspan e Daniels (1974) subsequentemente adicionaram o conceito de FS, com o foco como o número de focos por 4 mm² de tecido de aparência normal. A presença de focos adjacentes a ácinos mucosos aparentemente normais define FLS, em oposição à NSCS, em que as glândulas podem apresentar agregados linfocíticos, mas também apresentar atrofia acinar, fibrose e ductos dilatados. Outros sistemas de graduação foram sugeridos posteriormente, gerando debate sobre o melhor método histológico para avaliar BGSM (GREENSPAN et al., 1974; DANIELS; WHITCHER, 1994; COSTA et al., 2015; COSTA et al., 2016; CARUBBI et al., 2018).

O diagnóstico da SSp pleiteia a presença de uma combinação de critérios tanto subjetivos como objetivos, tendo a biópsia de glândula salivar um peso considerável nessa análise. Sua importância é dada pela especificidade da doença, fornecendo informações sobre a natureza e a extensão do processo da síndrome. A característica histopatológica da SSp é a FLS nas glândulas exócrinas que deve incluir um ou mais agregados densos de ≥ 50 linfócitos, geralmente com uma distribuição periductal ou perivascular, dentro de 4 mm² de tecido glandular [FS ≥ 1]. O FLS foi descrito há 50 anos, foi incluído como critério

de diagnóstico pela primeira vez em 1975 e foi incluído em todos os critérios de classificação desde então. Inicialmente, os agregados linfocitários são encontrados ao redor dos ductos salivares, mas à medida que a doença progride, ela se estende por todo o parênquima glandular, levando à atrofia e perda das células acinares (DINESCU et al., 2017; ALUNNO et al., 2018; VAN GINKEL et al., 2019; TREVISANI et al., 2019).

O FLS é característica mais característica da SS na BGSM, caracterizada por agregados densos de linfócitos localizados em sítios periductal e perivascular adjacentes a ácinos salivares normais. No entanto, características de NSCS (atrofia, fibrose, dilatação do ducto e inflamação difusa) e reposição gordurosa relacionada à idade do tecido da glândula salivar são achados comuns, especialmente em populações mais idosas. Os focos linfocíticos positivos podem, portanto, encostar no tecido glandular anormal. Se tais alterações estiverem presentes, elas devem ser anotadas e classificadas no relatório de patologia. No entanto, se FLS for identificado, todos os focos devem ser incluídos no numerador do FS, mesmo aqueles adjacentes a ácinos anormais, e deve-se incluir também toda a área da superfície glandular no denominador, incluindo áreas anormais, para evitar enviesar a interpretação (CARUBBI et al., 2018; WICHETA et al., 2019).

Embora a SICCA tenha delineado um protocolo detalhado sobre a preparação e interpretação da amostra histopatológica do BGSM, o processo de classificação permanece complicado pelo ambiente dinâmico do parênquima glandular inflamado e variabilidade na interpretação. Problemas comuns durante a avaliação incluem: falta de aplicação de critérios de classificação estritos pelo patologista, avaliação de áreas de focos confluentes consistindo em muito mais de 50 linfócitos e confusão entre sialadenite linfocítica focal verdadeira (associada com SS) e áreas de NSCS ou sialadenite esclerosante crônica adequado (WICHETA et al., 2019).

Existem fatores que podem complicar a avaliação do SF. Estes incluíram: disparidade no volume do tecido e número de lóbulos submetidos, decisões sobre focos confluentes com muitos mais de 50 linfócitos, dificuldade de avaliação do parênquima glandular que estava atrófico ou fibrótico e avaliação

de glândulas com alterações inflamatórias periductais significativas mais consistentes com sialadenite. Muitos estudos consideram esses achados como as principais armadilhas na avaliação de MSGB em SS presumida (WICHETA et al., 2019).

A interpretação adequada das áreas de focos confluentes e como pontuá-los também pode afetar a precisão da biópsia. Alguns autores recomendam, ao invés da contagem de focos individuais, medir a área infiltrada e comparar com a área glandular total. Esta técnica pode ser auxiliada usando uma grade ocular de microscópio calibrada. Acima de um FS de 10, os focos são geralmente confluentes. Vários autores sugerem que, quando os focos confluentes ocupam uma porção significativa da glândula, um SF “teto” de 12 deve ser aplicado sem tentar contar os focos individuais (GREENSPAN et al., 1974; DANIELS; WHITCHER, 1994; CARUBBI et al., 2018; WICHETA et al., 2019).

Uma característica essencial do FLS é a presença de ácinos mucosos de aspecto habitual nos lóbulos das glândulas adjacentes, sem sialectasia e contendo uma pequena proporção das células infiltrantes. Esses aspectos são importantes e devem ser levados em consideração ao diferenciar FLS de outras patologias da glândula salivar, tais como: NSCS, sialadenite esclerosante crônica (SCS), inflamação granulomatosa, hepatite C, síndrome da imunodeficiência adquirida, linfoma existente, doença do enxerto contra o hospedeiro ou sialadenose (DINESCU et al., 2017).

O foco linfocitário tem sido descrito como parte do processo de envelhecimento em indivíduos saudáveis. Também foi encontrado uma correlação entre a idade e algumas variações histológicas, como dilatação do ducto, hiperplasia epitelial, infiltração adiposa e fibrose (LLAMAS-GUTIERREZ et al., 2014).

A destruição do tecido da GS na SSp é geralmente acompanhada pelo desenvolvimento de tecido adiposo e fibrose. A deposição de gordura nas glândulas salivares é uma característica da SSp, porém é pouco compreendido. Embora os adipócitos (células adiposas) possam ocupar uma grande fração do tecido GS, pouco se sabe sobre seu significado na SSp. Ainda não se sabe se a infiltração de adipócitos é central na patogênese da SSp. No entanto, a presença

de adipócitos no local da inflamação sugere seu possível envolvimento no processo de defesa ou reparo (SKARSTEIN et al., 2016; LEEHAN et al., 2017; AQRAWI et al., 2018).

Foi mostrado que uma incidência distinta de reposição de tecido adiposo no GS de pacientes com SSp, onde adipócitos foram detectados em regiões ricas em interleucina-6 (IL-6), que é uma citocina pró-inflamatória, mas com funções antiapoptóticas e de proteção tecidual. No entanto, um estudo recente sugeriu que a infiltração gordurosa no tecido SG poderia também ser uma característica seletiva do envelhecimento e não da doença gerando dúvidas (SKARSTEIN et al., 2016; AQRAWI et al., 2018).

O estudo de Leehan et al. (2017) aponta que a reposição de gordura na GS não é uma característica distintiva da SS. Os mecanismos de direção, cronologia e natureza metabólica da infiltração gordurosa e outros aspectos da SS ainda precisam ser explorados. A heterogeneidade fundamental da SS é um aspecto confuso, tanto na pesquisa quanto no tratamento da doença. Foi demonstrado em diversos estudos que a pequena reposição de gordura na GS é principalmente uma característica do envelhecimento e não se associa a sinais de SS ou classificação da doença. Dessa forma a infiltração gordurosa ainda parece não ter relação com a SS. O reconhecimento histológico da presença ou extensão dessa alteração não melhora a precisão do diagnóstico. Aumento significativo da quantidade de tecido adiposo, no entanto, significa regressão proporcional do parênquima glandular que pode reduzir a produção de saliva frequentemente experimentada em pacientes idosos. Desta forma, o aumento da chance de infiltração gordurosa com o envelhecimento - pelo menos em parte - pode explicar a produção reduzida de saliva (LEEHAN et al., 2017; KATONA et al., 2017).

O metabolismo anormal de ácidos graxos essenciais e eicosanóides em pacientes com SSp leva à deposição de gordura nas glândulas salivares, que aumenta gradualmente à medida que a doença progride. Assim, Chu et al. (2020) afirma em seu estudo mais recente que a deposição de gordura nas glândulas salivares é considerada uma característica da SSp, e auxilia na diferenciação de outras causas de xerostomia. As glândulas submandibulares contêm menos

tecido adiposo em estado saudável em comparação com as glândulas parótidas (CHU et al., 2020).

A fibrose na GS ocorre tipicamente após episódios repetidos de inflamação, causando constrição de componentes secretores e levando à hipossalivação e xerostomia, como na SSp. Foi observada fibrose nas GSs de pacientes com SSp, sendo uma consequência comum de dano e inflamação dos tecidos e, além disso, um elemento da doença da SSp. Esse mecanismo ainda não está claro, mas existe uma hipótese de que mediadores fibrogênicos produzidos por células inflamatórias e epiteliais estão envolvidos, em particular fator de crescimento transformador (TGF- β 1) (SISTO et al., 2018).

A fibrose nas GS de pacientes com SSp realmente foi observada. No entanto, se essas alterações fibróticas refletem apenas o envelhecimento ou são uma característica da patologia da doença, não está claro. O estabelecimento de fibrose GS relacionada à idade em indivíduos saudáveis levou à aceitação da fibrose GS na SSp como consequência do envelhecimento e não da doença (LEEHAN et al., 2018).

2.4 Biópsia (prognóstico)

A sialadenite e a SF podem ser desafiadoras de avaliar, mesmo para patologistas experientes. Além disso, o SF não é determinado rotineiramente por todos os patologistas, fato que resulta em discrepâncias diagnósticas. Outras características histopatológicas às vezes encontradas em BGSMS incluem estruturas semelhantes a CG, que podem predizer linfoma e merecem incorporação em sistemas de classificação de gravidade para SS e critérios de monitoramento para subgrupos específicos de pacientes (COSTA et al., 2015).

A principal complicação da SS é a neoplasia hematológica. O risco aumentado de linfoma não-Hodgkin (LNH) em SSp foi descrito pela primeira vez em 1978 relacionando um risco 44 vezes maior de LNH em pacientes SSp em comparação com a população em geral. Em comparação com indivíduos saudáveis, os pacientes com SS têm um risco 10 a 50 vezes maior de linfoma, e de acordo com uma grande série de casos, 2% a 9% dos pacientes com SS desenvolvem linfoma. Na verdade, foi relatado que até 18% dos pacientes desenvolveram LNH após um longo acompanhamento, com um estudo relatando

que a mortalidade prematura em pacientes com SSp é causada exclusivamente pelo desenvolvimento de LNH. A glândula parótida é afetada na maioria dos casos e o tipo mais frequente de LNH é o linfoma da zona marginal da mucosa associada tecido linfóide (MALT) e são responsáveis por > 60% dos linfomas que surgem em pacientes com SSp. A preocupação com a transformação linfomatosa torna o diagnóstico precoce e o tratamento eficaz imperativos. Assim, o diagnóstico precoce pode resultar em tratamento adequado com medicamentos antiinflamatórios ou imunomoduladores (como o rituximabe) que podem retardar o curso da doença e limitar o envolvimento extraglandular (THEANDER et al., 2011; TINCANI et al., 2013; FRAGKIOUDAKI; MAVAGRANI; MOUTSOPOULOS, 2016; WICHETA et al., 2017; HAACKE et al., 2017).

A primeira observação de que características clínicas específicas da SSp, como aumento da glândula parótida e linfadenopatia, aumentam o risco de desenvolvimento de linfoma remonta ao final da década de 1970 (ALUNNO et al., 2018). Verificou-se que os leucócitos infiltrantes potencialmente atraídos pela ação concertada de $TNF\alpha$, IL6 e IFN2, CXCL10 e CXCL13 estavam organizados em focos imunes, localizados nos ductos estriados. Uma segunda característica da glândula salivar SSp em relação à infiltração é a presença de LESAs, nas quais as células B invadem os ductos estriados, culminando em hiperplasia das células epiteliais. As lesões linfoepiteliais, nas quais os linfócitos são encontrados entre as células epiteliais ductais, são característicos da patologia do SSp e levam a um maior risco de linfoma não-Hodgkin potencialmente fatal (WANG et al., 2018).

A infiltração linfóide associada a alterações epiteliais, denominada lesão linfoepitelial benigna (BLEL), LESA ou sialadenite mioepitelial (MESA), são caracterizadas por infiltração linfocítica de ductos e hiperplasia celular basal, resultando em epitélio multicamada. A LESA é relativamente incomum nas glândulas salivares menores mais comumente observada no tecido da parótida e deve ser incluída nos relatórios de biópsia (MASON et al., 2003; TREVISANI et al., 2019).

Originalmente, o termo BLEL era usado para descrever alterações linfoepiteliais nas principais glândulas salivares associadas ao aumento unilateral ou bilateral da glândula na ausência dos sinais clínicos da SSp (olhos

e boca secos), agora é reconhecido que as LESAs das glândulas salivares incluem um espectro de distúrbios que variam de proliferações linfóides reativas a linfomas evidentes de células B do tipo de tecido linfóide associado à mucosa. Embora essas lesões sejam mais frequentemente associadas à SSp e / ou outra doença do tecido conjuntivo, elas podem ocorrer como aumento isolado da glândula salivar em pacientes sem outra doença associada (MASON et al., 2003).

Os linfócitos B estão predominantemente localizados nos locais onde o epitélio é hiperplásico. Desta forma acredita-se fortemente que os linfócitos B intra-epiteliais estão envolvidos na proliferação das células epiteliais e na geração de LESA. Um forte apoio a essa noção também vem de estudos de SSp pacientes tratados com terapia de depleção de linfócitos B (rituximabe). Esses estudos mostraram que essa terapia resulta não apenas na depleção dos linfócitos B intra-epiteliais dos ductos, mas também concomitantemente na redução gradual de LESA (VAN GINKEL et al., 2019).

Essa proliferação desregulada e infiltração de linfócitos no tecido glandular também pode resultar na formação de estruturas semelhantes a CG encontradas no tecido linfóide secundário organizado e são detectados em 17–25% das amostras de BGSM de pacientes com SS. CG estão associadas aos anticorpos anti-Ro/SSA, hipergamaglobulinemia, aumento de glândula salivar, SF alto, manifestações extra- glandulares como nível elevado de citocinas pró-inflamatórias. Muitos desses fatores são considerados preditores de linfoma. A presença de estruturas do tipo CG deve ser descrita em relatórios de biópsia. Enquanto a coloração com HE é suficiente para detectar estruturas do tipo CG na prática clínica, manchas adicionais para linfoma de células B 6 (BCL-6), CD21 (um marcador de células dendríticas foliculares) e CD3 e CD20 (para calcular a proporção de células T / B) pode ser realizado para fins de pesquisa (LEE et al., 2016; SÈNE et al., 2018; AQRAWI et al., 2018; TREVISANI et al., 2019).

Foi histologicamente considerado CG um agregado circunscrito de pelo menos 50 células apresentando características de centroblastos, centrócitos com a presença de algumas células dendríticas foliculares (FDC) em uma de epitélio glandular normal, com baixa expressão de bcl-2 e alta reatividade de bcl-

6 (CARUBBI et al., 2014; SÈNE et al., 2018). Normalmente em um CG as células B entram na zona escura externa dessas estruturas, após estimulação de antígeno e coativação de células T, para sofrer hipermutação somática. As células entram na zona de luz, onde a afinidade das imunoglobulinas reorganizadas é testada no antígeno apresentado pelas FDC. Os FDCs apenas resgatam células B de alta afinidade da apoptose; as células que sobrevivem a essa seleção são estimuladas pelas células T a sofrer recombinação por troca de classe e diferenciação adicional em células plasmáticas produtoras de anticorpos ou células B de memória. As células B nos CG ectópicos também sofrem hipermutação somática e seleção induzida por anticorpos dos genes da região variável de suas imunoglobulinas (RISSELADA et al., 2013).

Até agora, o único resultado clínico claramente associado especificamente aos CGs é o desenvolvimento de linfoma. A prevalência de LNH é fortemente aumentada em pacientes com CG, e a maioria dos pacientes com SSp com LNH apresentava CG na biópsia diagnóstica original da glândula. A prevalência de um ou mais autoanticorpos nos soros dos pacientes está relacionada a doenças mais graves (RISSELADA et al., 2013).

Como mencionado, o risco de desenvolver LNH é 16 vezes maior em pacientes com SS primária. Acredita-se que o achado de lesões semelhantes a CG dentro do BGSM seja preditivo da progressão da doença. Essas lesões são análogas às suas contrapartes de tecido linfático e são caracterizadas por agregados linfocíticos bem circunscritos contendo pelo menos 50 agregados mononucleares células e demonstrando características de organização linfóide com uma zona escura densamente compactada e uma zona clara distinta (WICHETA et al., 2019).

A maioria dos autores concorda que a detecção de GCs no BGSM é mais desafiadora do que nos nódulos linfáticos. A segregação da zona escura / clara pode ser mais difícil de avaliar e pode ser responsável pela ampla variabilidade relatada. A coloração imunohistoquímica para CD21, CD3 e CD20 pode ser usada para o cálculo das razões de células B / T em focos, bem como seu grau de segregação e pode ajudar na identificação de GCs (WICHETA et al., 2019).

No estudo de Haacke et al. (2017) foi identificado que a presença de CGs não difere entre as biópsias da glândula labial de pacientes com SSp que desenvolveram linfoma MALT parotídeo e pacientes com SSp que não desenvolveram tal linfoma. Mesmo utilizando um método mais sensível e específico através da coloração para o fator de transcrição Bcl6 associado às células B do CG. Porém, sua presença pode ser de relevância clínica para a estratificação de pacientes com SSp em relação às opções de tratamento. Atualmente, a relação entre as estruturas do tipo CG e o linfoma é assunto de intenso debate (HAACKE et al., 2017; ALUNNO et al., 2018).

Em cerca de um quarto dos pacientes com SSp é possível encontrar na glândula salivar a presença de CG nos infiltrado linfóide periductal no parênquima glandular, característica histológica dessa síndrome, refletindo a hiperatividade das células B que caracteriza a doença. A presença de CGs geralmente é associada a uma gravidade maior dos sinais clínicos da doença, refletida por um maior SF, maior presença de autoanticorpos anti-SSA / Ro e anti-SSB / La e níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias no sangue (HAACKE et al., 2017).

A causa da baixa secreção de saliva não é apenas a presença de um infiltrado linfocítico. Possivelmente, outros tipos de células envolvidas na formação de CG, como macrófagos, podem contribuir para a disfunção glandular. Recentemente, verificou-se que o número de macrófagos está associado ao aumento da destruição tecidual. Ainda não foi demonstrado se os macrófagos desempenham algum papel no débito salivar em pacientes com SSp com baixo número de linfócitos glandulares. Finalmente, mecanismos neurológicos perturbados podem estar subjacentes a sintomas de *secura*. A soropositividade dos autoanticorpos anti-RF, anti-SSA e anti-SSB foi significativamente mais comum em pacientes com CG. A prevalência de um ou mais autoanticorpos nos soros dos pacientes está relacionada a doenças mais graves (RISSELADA et al., 2013).

Os padrões de mutação aberrante encontrados no SSp sugerem que o microambiente glandular suporta a reação CG de uma maneira diferente da do tecido linfóide secundário. Em vista do papel central dos CGs na condução da ativação das células B e T, sugeriu-se que sua presença em infiltrados

glandulares de pacientes com SSp pode afetar a expressão da doença. Primeiro, o maior grau de organização linfocítica pode levar ao aumento da ruptura da arquitetura glandular, causando maior incapacidade funcional. Segundo, a formação de CG poderia aumentar a eficácia da comunicação entre linfócitos, facilitando a função linfocitária. Isso pode agravar o curso da doença pSS em vários aspectos. Por um lado, a produção de autoanticorpos poderia aumentar com a formação de mais complexos imunes, contribuindo para a ocorrência de certas manifestações extraglandulares. Terceiro, é necessária atenção especial ao desenvolvimento de LNH de células B, porque sua formação parece depender da estimulação dirigida por antígeno (RISSELADA et al., 2013)

Vários preditores já foram identificados nos pacientes com SSp que desenvolvem LNH como aumento glandular persistente, linfadenopatia, púrpura palpável, anticorpos anti-Ro / anti-La, fator reumatóide, linfopenia, declínio dos níveis de C3 ou C4, crioglobulinemia e FS ≥ 3 na biópsia da glândula labial, além da presença de CG (HAACKE et al., 2017).

Foi evidenciado que discrepâncias significativas têm sido historicamente relatadas dada a alta variação interobservador para o número de infiltrados linfocitários, isso não é surpreendente, pois as glândulas amplamente infiltradas frequentemente apresentam focos inflamatórios confluentes, deixando um alto grau de interpretação subjetiva na definição do limite espacial de cada foco inflamatório. Não apenas a interpretação do FS sofre uma variação, mas isso também ocorre na avaliação de outras características-chave da imunopatologia das glândulas salivares, como a identificação de centros germinativos ectópicos, levando a resultados contrastantes (LUCCHESI et al., 2020).

Sabemos que uma interpretação correta e completa de amostras histológicas de glândulas salivares obtidas para confirmar o diagnóstico de SSp também pode fornecer uma vasta quantidade de informações adicionais sobre o estágio da doença, sua evolução potencial e até mesmo resposta ao tratamento. No entanto, armadilhas e limitações reconhecidas há muito tempo na análise e relato de histopatológico de biópsia de glândula salivar menor, incluindo o uso de metodologia tradicional complicada descrita há mais de 50 anos, impediu

qualquer progresso significativo no campo além de seu uso diagnóstico de rotina (LUCCHESI et al., 2020).

2.5 Análise digital

Os métodos de análise da SS estão em constante evolução e o interesse pela análise digital de imagens (DIA) no campo da patologia tem aumentado constantemente nas últimas décadas. Isso tem sido impulsionado por vários fatores, incluindo o desenvolvimento de novas técnicas de detecção, maior acessibilidade do poder de computação, avanços em imagens digitais, um papel em evolução para biomarcadores e o surgimento de imagens de lâmina inteira (WSI) (CORNISH., 2020).

Embora a literatura tenha numerosos exemplos de DIA aplicados a uma variedade de biomarcadores e processos de doença, as aplicações clínicas comuns de DIA são, na verdade, bastante restritas. Os biomarcadores do câncer de mama, por exemplo, são de longe a maior aplicação clínica do DIA em patologia cirúrgica (CORNISH, 2020).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Realizar análise histomorfométrica de glândulas salivares menores com histologia positiva para Síndrome de Sjögren utilizando os novos critérios de avaliação histológica proposto por Fisher et al., 2017.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.2.1 Verificar áreas histológicas alteradas como atrofia acinar, dilatação ductal, tecido adiposo e fibrose;
- 3.2.2 Verificar a presença de lesão linfoepitelial e centros germinativos;
- 3.2.3 Comparar os meios de análise histológica convencional e digital.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um trabalho de pesquisa observacional, transversal e retrospectivo seguindo o *check list* da *Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology* (STROBE - <https://www.strobe-statement.org/index.php?id=available-checklists>) com o propósito de aplicar os critérios de Fisher et al. (2017), para avaliação histológica das glândulas salivares menores de pacientes que tiveram biópsias positivas para SS diagnosticados no laboratório do Departamento de Patologia e Medicina Legal (DPML) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) do período de janeiro de 2011 a dezembro de 2020 (10 anos).

4.2 LOCALIZAÇÃO E AMOSTRAGEM

A pesquisa foi realizada no laboratório DPML/UFAM localizado na rua Afonso Pena, número 1053, bairro Praça 14 de Janeiro na cidade de Manaus – AM.

O estudo utilizou como fonte para coleta os dados disponíveis nos arquivos:

- Livro de registro de exames histopatológicos da Patologia Oral (cabeça e pescoço);
- Laudos histopatológicos arquivados;

4.3 PARTICIPANTES DA PESQUISA

O estudo teve como fonte de informações documentos de registro de pacientes com suspeita de SS presentes nos arquivos do DPML/UFAM.

4.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Laudos com suspeita de SS;
- Laudos com o diagnóstico histopatológico positivo para SS (compatível/sugestivo com o que se observa na SS);
- Pacientes de qualquer sexo, idade e etnia;
- Lâminas viáveis.

4.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Blocos em parafina em mal estado de conservação ou com material insuficiente, nos casos que necessitarem de recorte de material;
- Área glandular menor que 8 mm² (Fisher, 2017).

4.6 ASPECTOS ÉTICOS

O trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP) da Universidade Federal do Amazonas e foi aprovado com o número CAAE 21385419.9.0000.5020

4.7 DETALHAMENTO DO ESTUDO

4.7.1 Seleção da amostra e casuística

A amostragem foi por conveniência composta por pacientes que obedeceram aos critérios de inclusão e exclusão, dentro do período proposto. Obtivemos um total de 123 casos suspeitos de SS ao longo dos 10 anos, dos quais 50 apresentaram histologia positiva (TABELA 1). A coleta de dados e sua análise foram divididas em 3 etapas:

- Levantamento do total de laudos histopatológicos arquivados;
- Entre o total dos laudos, quantificar aqueles com suspeita de SS;
- Análise histomorfométrica das glândulas salivares menores correspondentes aos laudos positivos na histologia para SS.

Para a análise dos laudos histopatológicos fez-se necessário a busca ativa em pastas disponíveis no arquivo do DPML/UFAM. Visando organizar e planejar o desenvolvimento da pesquisa foi realizado, previamente, o levantamento da quantidade de pastas-arquivo disponíveis por ano (TABELA 1). A partir do número de pastas-arquivo pode-se obter o quantitativo de laudos a serem analisados. Foi alcançado um total de 31.228 laudos, que representa todo o material recebido pelo DPML/UFAM durante o período de tempo atribuído à pesquisa e estão inclusas nas mais diversas localidades anatômicas, contendo 123 casos com suspeita de SS (TABELA 1).

Tabela 1: Quantidade de pastas-arquivo e número total de laudos pertencentes ao arquivo do DPML/FM/UFAM, organizadas por ano de pesquisa.

Ano	Número De Pastas	Total De Laudos
2020	9	1.687
2019	18	3.663
2018	19	4.117
2017	17	3.387
2016	11	2.637
2015	17	4.058
2014	14	3.451
2013	11	2.801
2012	12	2.841
2011	11	2.586
TOTAL	139	31.228

4.7.2 Fluxograma de atividades e detalhamento das análises

A coleta de dados foi orientada pelo fluxograma abaixo:

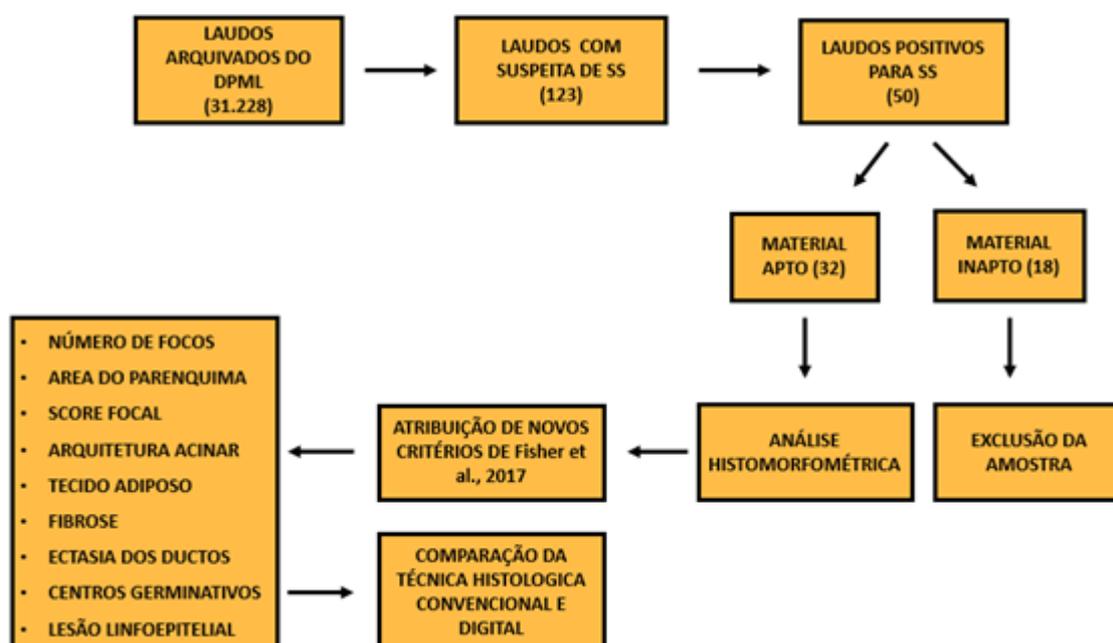


Figura 1: Fluxograma de etapas da pesquisa.

Dos 123 laudos encaminhados por suspeita de SS, foram selecionados somente aqueles que apresentaram diagnóstico histopatológico positivo para SS (n=50). Foi analisada a qualidade das lâminas do arquivo referente aos laudos de biópsia dos pacientes selecionados. As lâminas que se encontravam aptas para avaliação foram utilizadas, as que se apresentaram inaptas foram descartadas e seus respectivos blocos de tecido arquivados foram rastreados para avaliar a possibilidade de confecção de novas lâminas. Após esta análise, 32 lâminas foram encaminhadas para a etapa de avaliação segundo critérios histológicos (Tabela 2), restando 24 casos para a análise de dados clínicos e finalmente avaliação histológica segundo objetivos.

Tabela 2: Critérios de classificação histológica para Síndrome de Sjögren tendo como base Fisher et al., 2017.

CRITÉRIOS HISTOLÓGICOS
1. Sialoadenite linfocítica focal
2. Presença de focos linfocitários com 50 linfócitos ou mais adjacentes a ácinos preservados
3. Mensuração da área glandular de no mínimo 8mm ²
4. Score focal maior ou igual a 1
5. Avaliação de alteração acinar
6. Avaliação de alteração ductal
7. Avaliação da presença de fibrose
8. Avaliação de presença de infiltração adiposa
9. Avaliação da presença de centros germinativos
10. Avaliação da presença de lesão linfoepitelial

Quanto aos dados clínicos, foram coletadas as seguintes informações dos laudos/fichas de requisição de biópsia: idade, sexo, raça, presença de xerostomia e/ou xeroftalmia, dados sorológicos, oftalmológicos e diagnóstico

histológico final de todos os laudos com suspeita de SS. A coleta de dados ocorreu em um período de 8 meses. Os casos encontrados foram registrados em uma tabela no *software* Excel (Microsoft Office 2016 ®) que foi desenvolvida pelos pesquisadores exclusivamente para a realização deste estudo. Os dados foram coletados e analisados, podendo ser verificados nos apêndices A e B. As lâminas foram analisadas pelo método convencional e digital:

4.7.3 Análise Histológica pelo meio convencional

As 24 lâminas foram analisadas em um aparelho microscópio óptico da marca Opticam tipo 0600R, as glândulas salivares menores tiveram seu diâmetro medido através do uso de uma régua metálica milimetrada, de forma manual, apoiando a régua sobre a lâmina, essa mensuração foi realizada em dois momentos pelo mesmo observador (análise intra-observador), estando este previamente calibrado por um Patologista Oral experiente quanto à aplicação dos critérios histológicos para avaliação de casos suspeitos de SS.

Vale ressaltar ainda que o observador, mestrando desta pesquisa, é também um especialista em Patologia Oral, treinado durante sua residência no DPML em análises histológicas de casos suspeitos de SS. Todas as análises, tiveram um intervalo de duas semanas entre a primeira e segunda análise. De posse da área total das glândulas foi realizada a média entre as análises.

Após obter a área total da glândula foi possível identificar a presença de (FLS), que descreve a presença de agregados densos (focos) de ≥ 50 células mononucleares (principalmente linfócitos), adjacentes a ácinos preservados e em uma localização periductal ou perivascular. Os agregados linfocitários foram quantificados em 3 momentos e foi realizada a média dessas análises para assim calcular o SF.

Posteriormente à obtenção dos valores da área total da glândula e do número de focos presentes o SF foi calculado por meio da fórmula (N° de focos/área total da glândula x 4). Para uma análise histológica positiva para SS o resultado da fórmula precisa ser ≥ 1 . Foram verificadas também, de maneira qualitativa, a presença ou ausência de possíveis alterações acinares, ductais, presença de fibrose, infiltração adiposa, centros germinativos e lesões linfoepiteliais, sem quantificação das características em cada glândula.

4.7.4 Análise Histológica pelo meio digital

Os 24 exames selecionados tiveram suas lâminas avaliadas também pelo *software* digital, seus respectivos diâmetros foram mensurados digitalmente pela máquina. Foi utilizado o *software* OPTHD, disponibilizado pela empresa Opticam, a mesma marca do microscópio utilizado nas análises convencionais e digitais, esse *software* foi devidamente calibrado para realização das análises das lâminas histológicas. No programa, escolhemos comandos presentes no menu disponíveis para as análises, entre eles temos o *Measurements* que é basicamente usado para aplicação de medidas em imagem. Com os itens deste menu podemos medir a imagem através de formas geométricas com facilidade. Essa modalidade possui submenus que são mostrados abaixo.

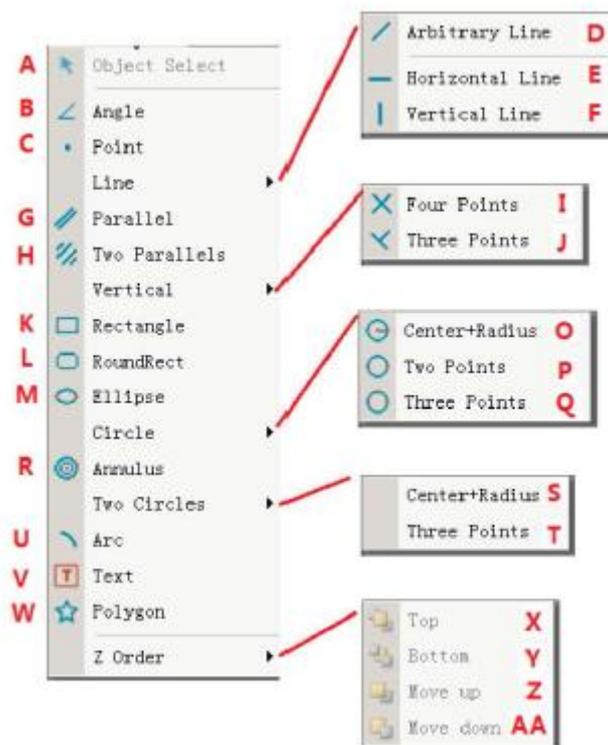


Figura 2. Todos os submenus que o comando *Measurements* possui e podem ser usados para medir imagens.

Fonte: Manual Operação *Software* Opticam OPTHD 1005162

Foi necessário escolher a opção mais adequada dos submenus, isso de acordo com o formato da imagem que precisaríamos medir, no caso, a opção *polygon*, pois se tornou a escolha mais adequada para se trabalhar com as

características das glândulas salivares menores avaliadas, uma vez que, através dessa opção podíamos circundar toda a glândula com a ponteira do *mouse* tendo mais liberdade na mensuração de sua área, conseguindo contornar todas as glândulas salivares menores com precisão e assim foi possível fazer a mensuração dos diâmetros digitalmente das glândulas presentes nas lâminas selecionadas. O *software* OPTHD é usado em conjunto com o microscópio da marca Opticam tipo 0600R com câmera digital acoplada, as mensurações das áreas glandulares foram realizadas no aumento de 20x, que através dessa objetiva conseguíamos medir toda a área, sendo por vezes necessário dividir a glândula em duas partes, quando ela era muito grande e não cabia no enquadramento do *software*. O SF foi calculado utilizando a mesma fórmula utilizada na análise convencional, porém com os valores obtidos através da análise dos diâmetros glandulares digitais

Os diâmetros da área glandular foram medidos em mm² e tabulados em tabelas confeccionados para cada análise e realizada em dois momentos pelo mesmo observador, um Patologista Oral treinado (análise intra-observador) com intervalo de 2 semanas entre primeira e segunda análise. Ao final da análise histomorfométrica, os resultados foram comparados aos da histopatologia convencional.

4.8 CONFIABILIDADE INTRA-OBSERVADOR E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após a coleta dos laudos arquivados, os dados foram transmitidos para tabelas no *software* Excel (Microsoft Office 2016 ®) onde foram tabulados por caso (pc/ano). De posse de todas as análises histológicas realizadas os resultados foram submetidos ao teste Coeficiente de Correlação Intraclassa (CCI), considerando um intervalo de confiança de 95%, a partir do *software* IBM SPSS Statistics versão 20. Este teste estatístico foi utilizado para avaliar a confiabilidade intra-observador das análises histopatológicas. Seguindo as orientações de Koo e Li (2016) os valores do ICC foram interpretados: valores menores que 0,5, entre 0,5 e 0,75, entre 0,75 e 0,9 e maiores que 0,90 são indicativos de confiabilidade ruim, moderada, boa e excelente, respectivamente. Adicionalmente foi realizada avaliação da correlação entre os

valores de área obtidos através do método convencional e digital e também entre os valores de SF obtidos nas duas técnicas, ambos realizados por meio do coeficiente de correlação de Spearman. Também foi realizado o teste de Qui-quadrado para avaliar associação entre SF e a presença de LESA tanto na análise digital quanto na análise convencional.

5. ARTIGO

Artigo original completo escrito nas normas do periódico *Advances in Rheumatology* (antiga Revista Brasileira de Reumatologia), classificado como Qualis B2, fator de impacto 0.854, de acordo com a classificação de periódicos da CAPES de 2013-2016 (Edição nova da revista ainda atualização para classificação 2019-2020).

Biópsia positiva de glândula salivar menor para Síndrome de Sjogren: Análise convencional *versus* digital e nível de confiabilidade intra- observador

¹Jéssica Barroso Barbosa, ²Clara Melissa Natário Martins, ³Juliana Vianna Pereria, ⁴Yan Nogueira Leite de Freitas, ⁵Jeconias Câmara, ⁵Tatiana Nayara Libório-Kimura

Conflitos de interesse

Os autores não relatam conflitos de interesse.

Contribuição dos autores

JBB foi responsável pelo desenho do estudo, coleta, análise e interpretação de dados e redação do trabalho; CNM contribuiu com a análise e interpretação de dados e redação do trabalho. JVP foi responsável pela orientação do trabalho, contribuiu para o desenho do estudo e análise de dados. YNF contribuiu com a análise estatística dos dados e análise da redação do artigo. JC contribuiu com a análise de dados. TNK foi responsável pela orientação do trabalho, desde sua concepção e desenho metodológico, interpretação dos dados, redação e revisão da versão final.

Detalhes dos autores

¹ Mestranda de Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO), Universidade Federal do Amazonas

² Acadêmica de Odontologia. Faculdade de Odontologia. Universidade Federal do Amazonas

³ Professora de Estomatologia. Faculdade de Odontologia. Universidade Federal do Amazonas

⁴ Professor de Saúde Bucal Coletiva. Faculdade de Odontologia. Universidade Federal do Amazonas

⁵ Professor de Patologia Oral e Maxilofacial. Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Amazonas

Autor Correspondente:

Tatiana Nayara Libório Kimura. Departamento de Patologia e Medicina Legal. Rua Afonso Pena, número 1053, bairro Praça 14 de Janeiro na cidade de Manaus – AM.

Resumo

Objetivo: Realizar caracterização de glândulas salivares menores (GSM) com histologia positiva para Síndrome de Sjögren (SS), assim como realizar uma comparação entre análise histopatológica convencional e digital.

Materiais e métodos: Em um período de 10 anos, 123 pacientes com suspeita de SS foram localizados no Departamento de Patologia. Destes, 50 foram selecionados por apresentarem laudo com biópsia positiva para SS. Após aplicação dos critérios de elegibilidade 32 casos foram incluídos para serem avaliados microscopicamente utilizando os critérios de Fisher et al. (2017). A concordância intra-observador das análises pelo método convencional e digital foram realizadas por meio Coeficiente de Confiabilidade Intraclasse (CCI) utilizando variáveis contínuas de número de focos, área de parênquima glandular e score focal (SF) ≥ 1 nas diferentes técnicas. Adicionalmente foi realizada caracterização histológica exclusivamente qualitativa.

Resultados: A análise histológica mostrou concordância diagnóstica de histologia positiva para SS em 75% (n=24) da amostra. Desse total a média de idade foi de 40,1 anos e 100% eram do sexo feminino. Na análise convencional, a média do número de focos foi de 8,5 focos (± 4), com ICC de 0,835, a área glandular apresentou média de 19,5 mm² ($\pm 10,7$), com ICC de 0,966, e o SF médio de 2,04 ($\pm 1,05$). Já no método digital, a área glandular obteve média de 12,4 mm² ($\pm 6,8$), com ICC de 0,976 e o SF com média de 3,2 ($\pm 1,5$). Quando comparados os SF obtidos em cada método verificou-se um ICC de 0,769, evidenciando diferentes resultados de SF nas duas análises, não variando, porém, o diagnóstico.

Conclusão: A BGSM em pacientes com suspeita de SS é de extrema importância em razão de suas implicações diagnósticas e prognósticas, no entanto etapas de suas avaliações podem estar sujeitas a subjetividade em menor ou maior grau, sobretudo em relação a contagem de focos linfocitários. Sugere-se que a LESA e CG, apresentem baixa prevalência em GSM de pacientes com SS, podendo ser relatados de forma inconsistente. A análise digital apresenta o SF frequentemente superestimado em relação ao obtido pelo método convencional, o que poderia repercutir em divergências prognósticas, mas não diagnósticas.

Palavras-chave: Síndrome de Sjögren. Glândula salivar menor. Sialoadenite linfocítica focal. Centro germinativo. Lesão linfoepitelial.

Introdução

A Síndrome de Sjögren (SS) foi clínica e histologicamente descrita pelo oftalmologista sueco Henry Sjögren em 1933 (1), é uma doença autoimune crônica multissistêmica que tem um envolvimento de glândulas salivares e lacrimais causando hipofunção, caracterizado por xerostomia e xeroftalmia, a SS pode ser primária (SSp) ou secundária (SSs), esta última gerando manifestações sistêmicas em múltiplos órgãos, tem uma notável predileção feminina, apresentando-se mais comumente entre a 4ª e 5ª década de vida . Existem tratamentos que podem melhorar os sintomas e prevenir complicações da SS, mas é uma enfermidade ainda sem cura (2–5).

O critério de classificação estabelecido pelo Grupo de Consenso Americano-Europeu (AECG) e pelo Colégio Americano de Reumatologia / Liga Europeia contra o Reumatismo (ACR / EULAR) baseia-se na soma ponderada de 5 itens: positividade de anticorpos anti-SSA/Ro e sialoadenite linfocítica focal (FLS) com um score de foco (SF) ≥ 1 focos / mm^2 , cada um com pontuação de 3; um escore de coloração ocular anormal (SCO) ≥ 5 (ou escore de van Bijsterveld ≥ 4), um teste de Schirmer ≤ 5 mm / 5 min e uma taxa de fluxo salivar não estimulada $\leq 0,1$ mL / min, cada pontuação 1. Indivíduos (com sinais / sintomas sugestivos de SS) que têm uma pontuação total ≥ 4 para os itens acima, preenchem os critérios para SSp (2).

A característica anatomopatológica nas glândulas salivares é a FLS, caracterizada pela infiltração de células mononucleares. Ocorre uma inflamação crônica mediada por células T que leva à proliferação de células B produtoras de autoanticorpos, resultando em uma atrofia glandular global e deficiência na função (6). O SF calcula o número de agregados inflamatórios por área de 4 mm^2 de tecido glandular. Um SF ≥ 1 , ou seja, um ou mais focos de 50 ou mais células por área de 4 mm^2 de tecido glandular é estabelecido para o diagnóstico histopatológico de SS. (7–9).

A biópsia de glândula salivar menor (BGSM) desempenha um papel fundamental no critério de classificação mais atual, isoladamente ela não define o diagnóstico para SS mas tem um peso importante nessa avaliação. Além do mais, através da BGSM conseguimos avaliar características presentes no parênquima glandular, que podem ser importantes para o prognóstico da lesão

como CG e LESA, essas alterações estão relacionadas com maior risco de desenvolvimento de neoplasia hematológica nesses pacientes (10).

Apesar de sua presença difusa em todo o mundo, a SSp é mal diagnosticada e sua patogênese e biologia pouco estudadas, levando à carência de terapias capazes de modificar, amenizar ou retardar a doença. As glândulas salivares dos pacientes com SSp não são apenas uma “janela” diagnóstica para a doença, mas também são capazes de fornecer dados inestimáveis sobre a evolução da patologia, na estratificação dos pacientes e potencialmente capaz de informar sobre a resposta ao tratamento (11).

Uma ferramenta capaz de auxiliar na investigação diagnóstica e caracterização dessas glândulas pode ser a análise digital por meio de um *software* que vem sendo utilizada em inúmeros processos diagnósticos do âmbito da patologia. Ainda não há vasta literatura sobre análise histopatológica digital de glândula salivar menor para investigação diagnóstica de SS, deixando dúvidas a respeito de possíveis vantagens, desvantagens e diferenças entre esta técnica e a técnica convencional.

O objetivo deste estudo é a realização de uma caracterização histológica baseada na aplicação dos parâmetros preconizados por Fisher et al. (10), avaliando também possíveis alterações em ácinos e ductos, além de presença de fibrose, infiltração adiposa, CG e LESA, assim como uma comparação dos resultados obtidos através de análise histológica convencional e digital.

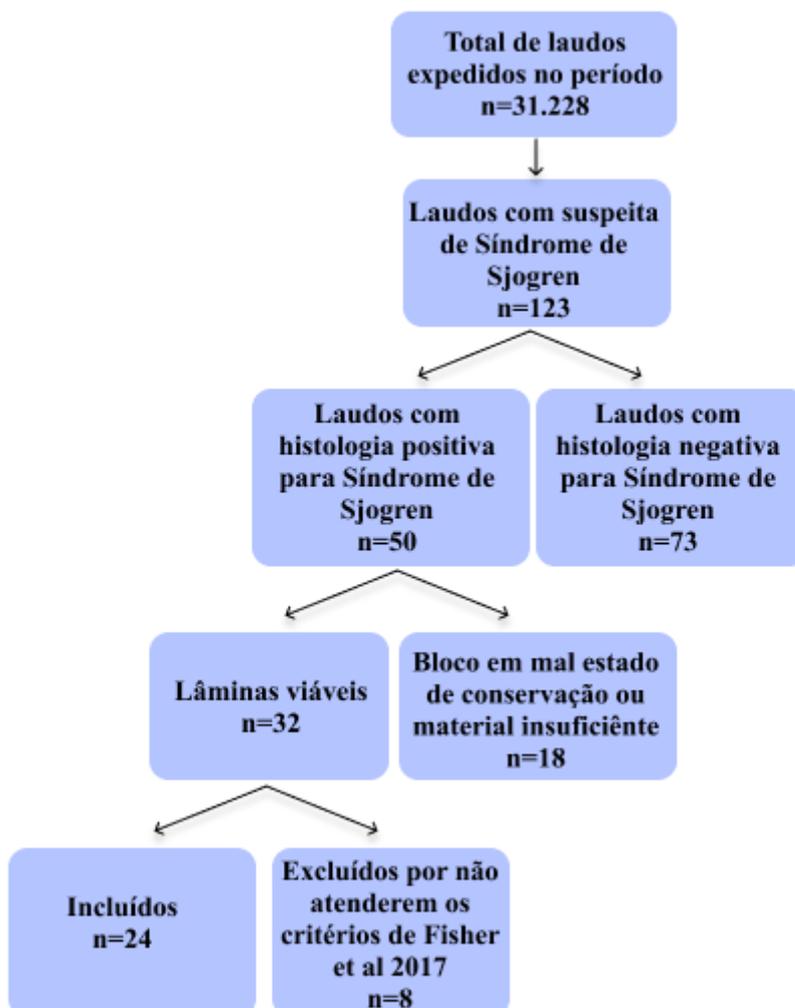
Materiais e Métodos

Trata-se de uma pesquisa observacional, transversal e retrospectiva seguindo a *Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology* (STROBE) (12) com o intuito de aplicar os critérios preconizados por Fisher et al. (10), na avaliação histológica das glândulas salivares menores de pacientes que tiveram biópsias positivas para SS diagnosticados no laboratório do Departamento de Patologia e Medicina Legal (DPML) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

Pacientes

Foi realizada uma busca ativa de laudos histopatológicos com suspeita de SS dentre os 31.228 laudos distribuídos em 130 pastas arquivadas no DPML no período entre janeiro de 2011 a dezembro de 2020. Foram encontrados um total de 123 laudos de biópsia com suspeita de SS, destes, 50 eram positivos na histologia para SS representando 40,65% (50/123) do total de laudos com suspeita de SS no período de 10 anos no DPML (Figura 1). O trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP) da UFAM com o número CAAE 21385419.9.0000.5020. Dados como sexo, idade, raça, xerostomia, xeroftalmia, positividade do anticorpo anti-RO e hipossalivação foram obtidos através das requisições de biópsia arquivadas.

Figura 1. Fluxograma de seleção da amostra.



Critérios e análises histopatológicas

As 10 características histopatológicas avaliadas durante as análises estão descritas na Tabela 1. Dos critérios 5 a 10, a avaliação se deu de maneira qualitativa, classificada de acordo apenas com a presença ou ausência das características e não a quantificação destas.

Tabela 1: Critérios de classificação histológica para Síndrome de Sjögren baseados em Fisher et al., 2017.

1. Sialoadenite linfocítica focal
2. Presença de focos linfocitários com 50 linfócitos ou mais adjacentes a ácinos preservados
3. Mensuração da área glandular de no mínimo 8mm ²
4. Score focal maior ou igual a 1
5. Avaliação de alteração acinar
6. Avaliação de alteração ductal
7. Avaliação da presença de fibrose
8. Avaliação de presença de infiltração adiposa
9. Avaliação da presença de centros germinativos
10. Avaliação da presença de lesão linfoepitelial

Análise convencional

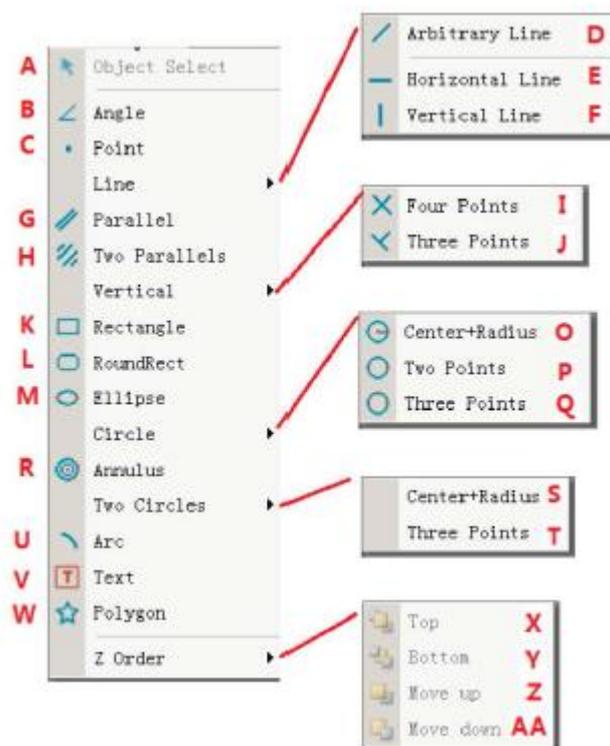
De um total de 123 laudos de biópsia com suspeita clínica de SS, 50 casos tinham o diagnóstico histológico positivo. Considerando a disponibilidade de lâminas viáveis, blocos em parafina e suficiência do material foram analisados microscopicamente 32 casos de biópsia. As glândulas tiveram seus diâmetros calculados através do uso de uma régua metálica milimetrada, de forma manual, apoiando a régua sobre a lâmina e medindo seu longo eixo. De posse da área total das glândulas foi feita a média entre as análises. As lâminas foram analisadas no método convencional por um microscópio óptico da marca Opticam tipo 0600R. Através dele foi identificado o número de agregados linfocitários presente nas glândulas em área normais para a classificação de FSL e esses foram quantificados em cada caso em 3 momentos e uma média das 3 análises foi realizada. Após a obtenção dos valores da área total da glândula e do número de focos presentes calculamos o SF usando a fórmula (N° de focos/área total da glândula x 4). Foi considerada histopatologia positiva para SS um SF maior ou igual a 1. Atribuindo os critérios de 2017, 24 casos foram

confirmados como biópsias positivas para SS na histologia representando nossa amostra final (Figura 1).

Análise digital

Os 24 casos selecionados também tiveram suas lâminas avaliadas pelo *software* digital, onde seus respectivos diâmetros de área glandular foram mensurados digitalmente pela máquina. Foi utilizado o *software* OPTHD, disponibilizado pela empresa Opticam, a mesma marca do microscópio utilizado nas análises convencionais. Esse *software* foi devidamente calibrado para realizar as análises das lâminas histológicas. No programa, escolhemos comandos presentes no menu disponíveis para as análises, entre eles temos o *Measurements* usado para aplicação de medidas em imagem. Com os itens deste menu podemos medir a imagem através de formas geométricas com facilidade. Essa modalidade possui submenus que são mostrados abaixo (Figura 2).

Figura 2. Todos os submenus que o comando Measurements possui e podem ser usados para medir imagens.



A opção *polygon* foi a escolha mais adequada para se trabalhar com as características das glândulas salivares menores, uma vez que, através dessa opção podíamos circundar toda a glândula com a ponteira do *mouse* tendo mais precisão na mensuração de sua área. As mensurações das áreas glandulares foram realizadas no aumento de 20x, pois através dessa objetiva conseguíamos medir toda a área (Figura 3). O SF foi calculado utilizando a mesma fórmula utilizada na análise convencional, porém com os valores obtidos através da análise dos diâmetros glandulares digitais.

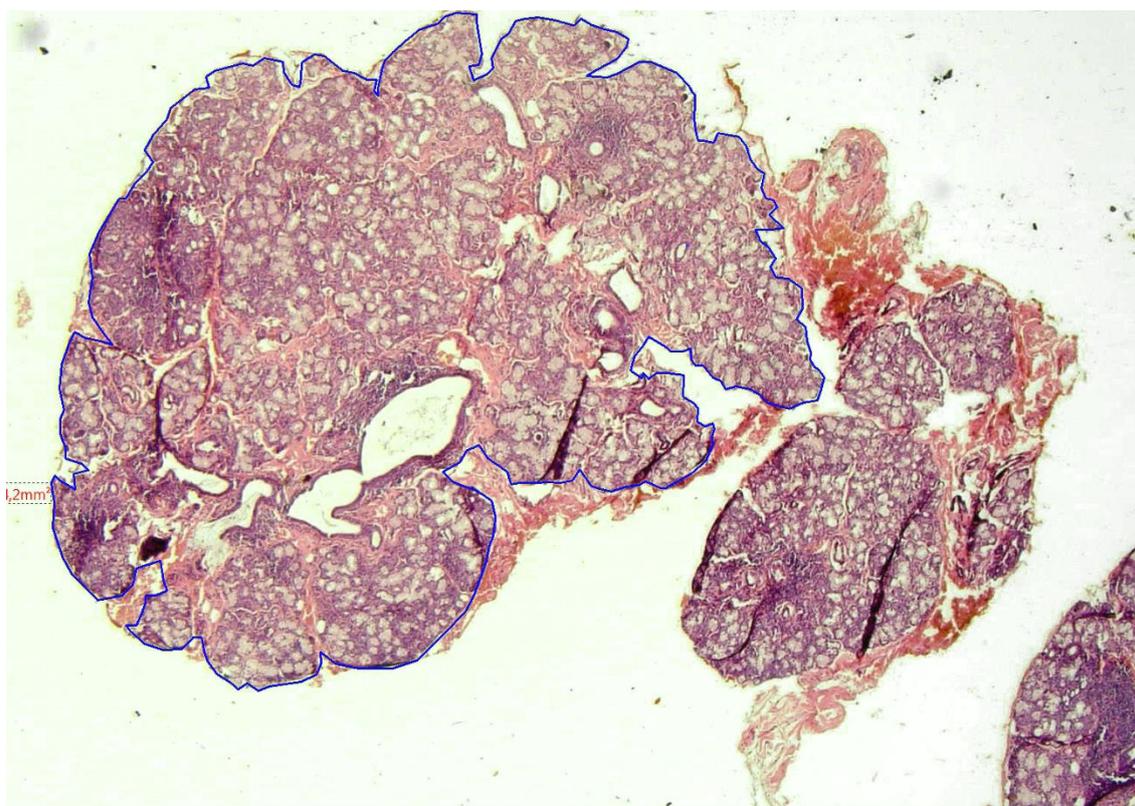


Figura 3. Área glandular mensurada com o auxílio do *software* OPTHD. (H&E, x20). Paciente 5

Fonte: DPML/UFAM.

Análise estatística e Confiabilidade intra-observador

As glândulas salivares menores presentes nas lâminas tiveram seu diâmetro medido por um único patologista oral com experiência em diagnóstico de SS, realizado em dois momentos com um intervalo de duas semanas entre a primeira e segunda análise, tanto na análise convencional quanto na digital, assim como o número de focos, que diferente da anterior teve sua contagem realizada em três momentos. A ferramenta estatística utilizada para avaliar a

confiabilidade intra-observador nas análises histopatológicas foi o Coeficiente de Confiabilidade Intraclasse (CCI). A análise estatística foi realizada considerando um intervalo de confiança de 95%, a partir do *software* IBM SPSS Statistics versão 20. Os valores do CCI foram interpretados seguindo as orientações de Koo e Li (13): valores menores que 0,5, entre 0,5 e 0,75, entre 0,75 e 0,9 e maiores que 0,90 são indicativos de confiabilidade ruim, moderada, boa e excelente, respectivamente. Para avaliar correlação entre os valores de área obtidos através do método convencional e digital, e adicionalmente entre os valores de SF também obtidos nas duas técnicas foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman. Foi realizado ainda o teste de Qui-quadrado para avaliar associação entre SF e a presença de LESA tanto na análise digital quanto na análise convencional.

Resultados

Dos 50 casos que apresentavam suspeita de SS, 18 foram removidos da amostra de acordo com os critérios de exclusão (Figura 1), restando 32 lâminas aptas para serem avaliadas microscopicamente tanto pelo método convencional quanto pelo método digital. Destes 32 casos, houve concordância em 75% (n=24), que foram mantidos com histologia positiva para SS, após a análise microscópica aplicando os critérios histológicos mais recentes preconizados por Fisher et al. (10), em que 8 casos foram excluídos por não corresponderem aos critérios de (10). Sendo assim, 24 casos caracterizaram a amostra final estudada e seguiram para as etapas posteriores da pesquisa de aprofundamento do estudo histológico.

1. Caracterização da população

A população do estudo foi 100% feminina. A mediana e média de idade foi de 40 e 40,1 anos (\pm 13,2 anos), respectivamente. Na amostra estudada, 71% eram pardas, expressando a característica amazônica da base populacional, seguida por 13% de negras, 8% não apresentavam esse dado informado no arquivo, já brancos e indígenas representaram apenas 4% da amostra cada. Entre os dados presentes, 79% dos indivíduos apresentaram xerostomia e 63% xeroftalmia como um dado mencionado na requisição de biópsia. Dados como

sorologia positiva para anti-Ro/anti-SSA e sialometria não foram informados na maioria dos arquivos, tendo 79% e 42% de dados não informados respectivamente (Tabela 2). Existem inúmeras ausências de preenchimento destas, o que implica na dificuldade de caracterização das manifestações clínicas desses pacientes, não dando a certeza de que os sintomas não eram apresentados pelo paciente ou se não foram questionados durante a anamnese. Esses resultados impossibilitaram a associação entre achados clínicos e histopatológicos.

Tabela 2: Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com biópsia positiva para Síndrome de Sjögren

Características gerais		Número de casos (n=24)	%
Sexo	Masculino	0	0%
	Feminino	24	100%
Faixa etária	0-10 anos	1	4%
	11-20 anos	0	0%
	21-30 anos	3	13%
	31-40 anos	9	38%
	41-50 anos	6	25%
	51-60 anos	4	17%
	61-70 anos	1	4%
	71-80 anos	0	0%
Raça	Pardo	17	71%
	Branco	1	4%
	Negro	3	13%
	Indígena	1	4%
	Não informado	2	8%
Xerostomia	Positivo	19	79%
	Negativo	0	0%
	Não informado	5	21%
Xeroftalmia	Positivo	15	63%
	Negativo	0	0%
	Não informado	9	38%
Anti-RO	Positivo	5	21%
	Negativo	0	0%
	Não informado	19	79%
Sialometria	Hipossalivação	9	38%
	Salivação normal	5	21%
	Não informado	10	42%

2. Achados histopatológicos

2.1 Método convencional

Foi identificada a presença de FLS nos 24 casos que descreve a presença de agregados densos (focos) ≥ 50 células mononucleares (principalmente linfócitos) em 4mm^2 , adjacentes a ácinos preservados em sua maioria e em uma localização periductal ou perivascular. Esses agregados linfocitários foram quantificados e todos apresentaram $\text{SF} \geq 1$.

Os cortes histológicos positivos para SS revelam fragmentos de tecido glandular menor caracterizado por ácinos seromucosos separados por septos fibrosos de aspecto habitual em sua maioria, além da presença de ductos, por vezes dilatados. Observa-se ainda áreas com agregados linfocitários com presença de 50 ou mais linfócitos adjacentes a ácinos preservados em uma localização periductal e/ou perivascular. É possível encontrar em algumas áreas presença fibrose e tecido adiposo completando assim o quadro histológico analisado (Figura 4).

Na avaliação do SF, o número de focos variou de 2 a 15, com uma média de 8,5 focos (± 4), a área glandular variou de 7,75 a $43,5\text{mm}^2$ com média de $19,5\text{mm}^2$ ($\pm 10,7$), e conseqüentemente o SF, variou de 0,82 a 5,11, com média de 2,04 ($\pm 1,05$) (Tabela 3).

Tabela 3 – Avaliação histológica para cálculo do score focal nas análises convencionais dos 24 casos com biópsia positiva para Síndrome de Sjögren

Variável	Análise Convencional			
	Média	DP (\pm)	Mínimo	Máximo
Nº Focos	8,5	4	2	15
Área glandular	19,5	10,7	7,75	43,5
Score Focal	2,04	1,05	0,82	5,11

P: Desvio Padrão.

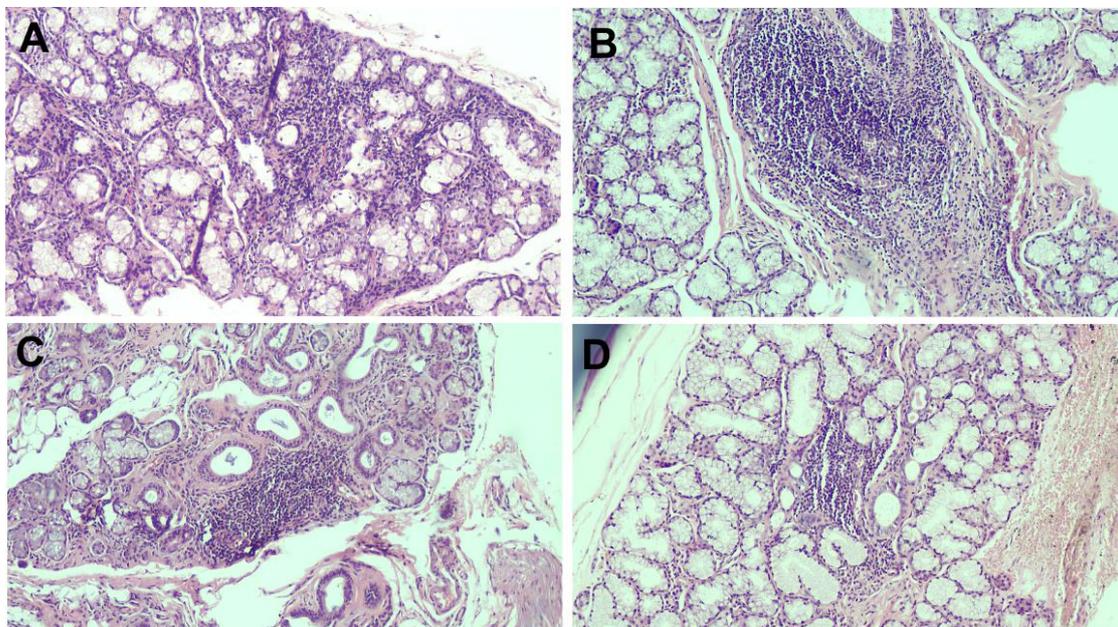


Figura 4. Focos linfocitários em biópsias positivas para Síndrome de Sjögren. A. Paciente 7 (H&E, x100). **B.** Paciente 9 (H&E, x100). **C.** Paciente 6 (H&E, x100). **D.** Paciente 11 (H&E, x100).

Por meio de uma avaliação qualitativa, classificada de acordo apenas com a presença ou ausência das características e não quantificação destas, foi possível observar (Figura 5) que todos os casos apresentavam algum grau de atrofia acinar, a maioria dos casos apresentavam também dilatação ductal e fibrose, sendo, somente 4% dos casos com nenhuma das duas alterações e quase metade dos casos tinham infiltração adiposa. Além disso, características importantes para o prognóstico da lesão e que representam riscos maiores de transformação maligna para neoplasias hematológicas como lesão linfoepitelial (LESA) estava presente em 1/3 dos casos, SF ≥ 3 em 4 casos e centro germinativo (CG) em apenas 1 caso (Tabela 4).

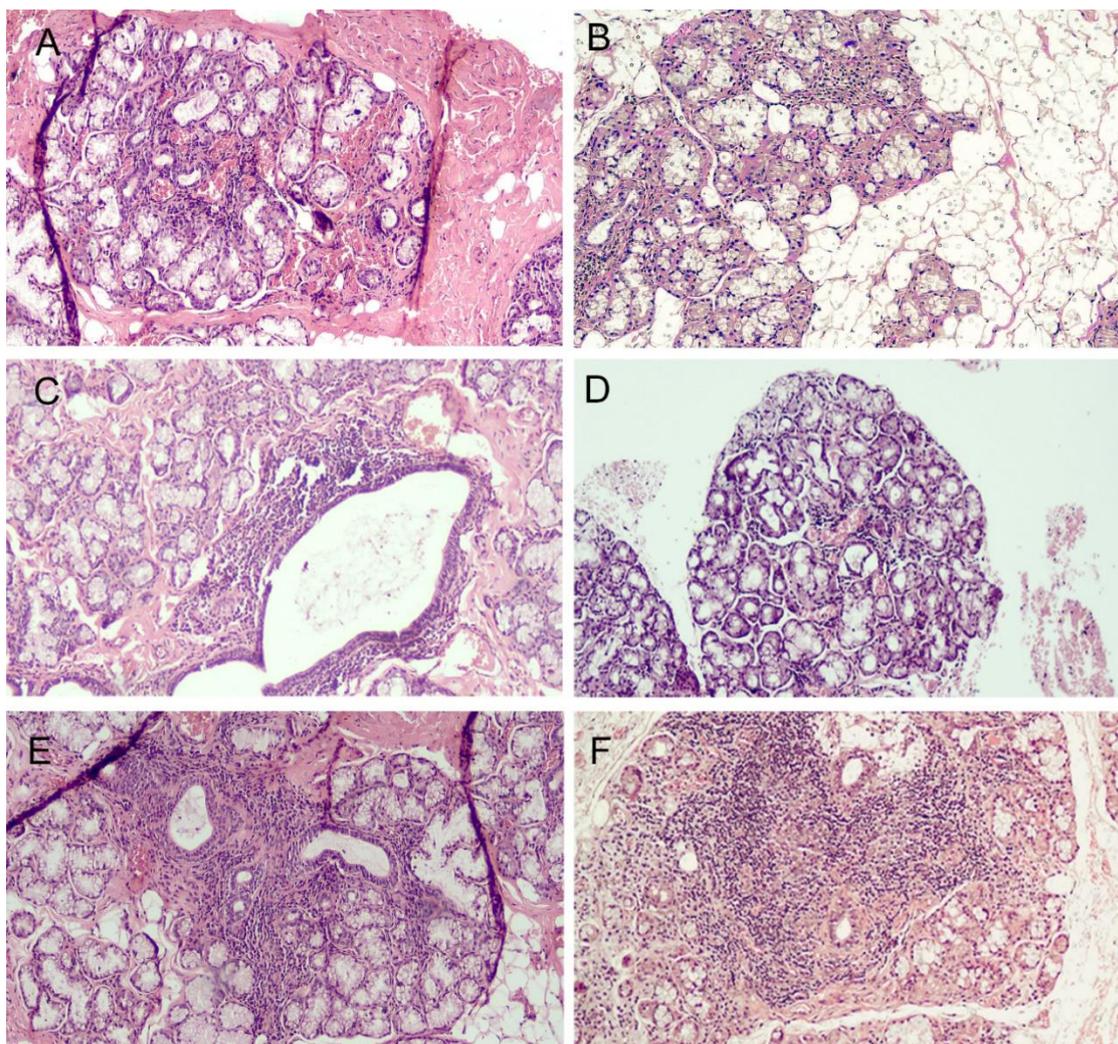


Figura 5. Características histológicas encontradas nas glândulas salivares menores de biópsias positivas para Síndrome de Sjögren. A. Fibrose – Paciente 10 (H&E, x100). B. Infiltração adiposa – Paciente 16 (H&E, x100). C. Dilatação ductal – Paciente 5 (H&E, x100). D. Atrofia acinar – Paciente 6 (H&E, x100). E. LESA – Paciente 7 (H&E, x100). F. CG – Paciente 16 (H&E, x100).

Tabela 4 – Análise histopatológicas qualitativa para caracterização histológica de biópsias positivas para Síndrome de Sjögren. Não foi levado em consideração o grau de acometimento da glândula.

Características gerais	Número de casos positivos(n=24)	%
Atrofia acinar	24	100%
Dilatação ductal	23	95,83%
Tecido adiposo	11	45,83%
Fibrose	23	95,83%
Centro Germinativo	1	4,16%
LESA	8	33,33%
Score Focal <3	19	79%
Não contabilizado para SF	01	4%
Score Focal ≥3	4	17%

Dos 8 casos com LESA, notou que a média de SF foi de 2,5, enquanto nos casos sem essa alteração a média de SF foi de 1,8. O único caso com CG apresentou SF=1,5.

Adicionalmente verificou-se que houve uma diferença entre a área glandular medida pelo patologista no laudo original e a feita pelo patologista durante a pesquisa, porém mantendo a confirmação de histologia positiva para SS.

2.1.1 Nível de confiabilidade Intra-observador

Para a avaliação do nível de confiabilidade intra-observador foram analisadas as variáveis: número de focos e mensuração de área. A média de número de focos foi de 7,3 (\pm 3,9) na primeira avaliação, 8,7 (\pm 4,3) na segunda e 10,4 (\pm 5,1) na terceira, produzindo CCI de 0,835 (IC 95% 0,632 - 0,928) e valor de $p < 0,001$. A média da área de parênquima mensurada pelo método convencional foi de 18,6 mm² (\pm 9,6) na primeira análise e média de 20,4 mm² (\pm 12,1) na segunda análise. O CCI nessa variável foi de 0,966 (IC 95% 0,910 - 0,986) e valor de $p < 0,001$, exibindo concordância maior na mensuração de área do que na contagem de focos (Tabela 5).

Tabela 5 – Concordância intra-observador em relação ao número de focos pelo método convencional e concordância intra-observador em relação à área de parênquima pelos métodos convencional e digital.

Variável	1º média	DP (\pm)	2º média	DP (\pm)	3º média	DP (\pm)	CCI	IC 95%	n
Nº de focos	7,3	3,9	8,7	4,3	10,4	5,1	0,835	0,632 - 0,928	23
Área de Parênquima Convencional	18,6	9,6	20,4	12,1	-	-	0,966	0,919 - 0,986	24
Área de Parênquima Digital	12,4	6,7	12,9	8,1	-	-	0,976	0,946 - 0,990	24

DP: Desvio Padrão; IC: Intervalo de confiança; N: Número de casos

Adicionalmente foram comparados os dados presentes no laudo gerado por um patologista da rotina do departamento com os dados resultantes da análise convencional desta pesquisa. O CCI dos SF, número de focos e área de parênquima foi de 0,650 (IC 95% -0,282 - 0,924), com valor de $p = 0,058$, 0,810

(IC 95% 0,103 - 0,958), com valor de $p=0.04$, e 0,973 (IC 95% 0,888 - 0,994), com valor de $p<0,001$ respectivamente. Deve-se levar em consideração que estas análises foram feitas em diferentes momentos com diferenças de anos e muitas lâminas avaliadas na pesquisa foram por meio de recortes do bloco.

2.2 Método digital

No método digital, foi realizada análise da área glandular, que obteve média final (considerando a média das duas análises) de 12,4 mm², gerando um SF, com média de 3,1 ($\pm 1,5$). Dos 24 casos, notou-se que 45,8% ($n=11/23$) apresentaram $SF \geq 3$, representando um acréscimo de 7 casos em comparação ao método convencional), ficando 54,1% ($n=13/23$) de casos com $SF < 3$.

Dos 8 casos com LESA, notou-se que a média de SF foi de 3,9, enquanto nos casos sem essa alteração a média de SF foi de 2,7. O único caso com CG apresentou $SF=2,5$.

2.2.1 Nível de confiabilidade Intra-observador

A média da área de parênquima mensurada na primeira análise pelo método digital foi de 12,4 mm² ($\pm 6,7$) e a média na segunda análise de 12,9 mm² ($\pm 8,1$). O CCI nessa variável foi de 0,976 (IC 95% 0,946 - 0,990) e valor de $p<0,001$ (Tabela 5).

2.3 Comparação entre análise convencional e análise digital

A média de SF obtida na análise digital foi de 3,1 ($\pm 1,5$) e na análise convencional de 2 (± 1), com CCI de 0,769 (IC 95% -0,162 - 0,933) e valor de $p<0,001$ (Tabela 6).

Tabela 6 – Concordância intra-observador em análise convencional e digital

Variável	Análise Convencional		Análise Digital		n	CCI	IC 95%
	Média final	DP (\pm)	Média Final	DP (\pm)			
Score Focal	2	1	3,1	1,5	23	0,769	-0,162 - 0,933
Área glandular	19,5	10,7	12,4	6,7	24	NR	NR

DP: Desvio Padrão; IC: Intervalo de confiança. NR: Não realizado

Comparativamente, notou-se que na análise digital, enquanto os valores de SF se tornavam maiores (média= 3,1), os mesmos mostravam-se ligeiramente menores na análise convencional (média= média=2), portanto ocorrendo (como esperado) o contrário em relação às médias de área de parênquima glandular, ou seja, tendiam a ser menores na análise digital (média= 12,4) em relação à convencional (média= 19,5).

Apesar deste fato, observou-se uma correlação positiva entre as médias das áreas de parênquima mensurados pelo método digital com as médias das áreas mensuradas pelo método convencional (coeficiente de Spearman 0,942, $p < 0,001$). Na análise de correlação entre o SF obtidos pela técnica digital e SF obtidos pela técnica convencional encontramos resultados semelhantes, notou-se uma correlação significativamente positiva entre ambas as técnicas (coeficiente de Spearman 0,971, $p < 0,001$) resultado esperado considerando que a mensuração da área é um pré-requisito para o cálculo do SF.

No teste do qui-quadrado foi possível observar que não há associação estatisticamente significativa entre o valor de SF e presença de LESA, tanto na análise digital ($p=0,304$) quanto na convencional ($p=0,482$).

De maneira geral, notou-se que em ambas as técnicas de análise, a presença de LESA tende a apresentar SF maior em relação aos casos sem essa alteração. Nesse sentido, observou-se os valores de SF=2,5 e SF=3,9, respectivamente na análise convencional *versus* a digital para os casos positivos para LESA, ao passo que os valores de SF sem LESA foi de SF=1,8 e SF=2,7, respectivamente em ambas as análises.

Já para o único caso de CG, o valor de SF foi de 1,4 e 2,5, respectivamente na análise convencional *versus* digital.

Discussão

Neste trabalho foi realizado uma análise histomorfométrica de glândulas salivares menores com histologia positiva para SS utilizando os critérios de avaliação histológica de Fisher et al. (10), para melhor padronização dos critérios visando diagnóstico mais preciso, evidenciar os padrões e dificuldades da análise convencional e sua comparação com uma análise digital através de um

software. Verificou-se ainda as características histológicas importantes para a avaliação também do prognóstico e suas possíveis implicações.

Os laudos com histologia positiva para SS representaram apenas 0,16% dos laudos liberados no DPML no período do estudo. O estudo de Valim et al. (14) encontrou em uma área metropolitana do Brasil, a prevalência de 0,17% de casos de SS usando diferentes critérios de seleção. Segundo Dinescu et al. (6) as estimativas de prevalência para SS variam de 0,2% a 2,7%, dependendo de quais protocolos de estudo foram escolhidos. Nosso estudo revela uma maior porcentagem de pacientes do sexo feminino o que é consistente com diversos outros estudos como Pereira et al. (15), Dinescu et al. (6), Daniels et al. (9). Temos uma média de idade de 40,1 corroborando com estudos de Dinescu et al. (6).

Entre os casos com FLS ≥ 1 nesta pesquisa, não se pode afirmar que o diagnóstico do paciente seja SS. Isso se dá pelo fato de que a histologia isolada não define o diagnóstico, porém é um dos critérios de grande peso. Fisher et al. (10) reitera que a BGSM é amplamente utilizada no diagnóstico da SSp e desempenha um papel fundamental nos critérios de classificação estabelecidos pelo AECG e ACR / EULAR. Trevisani et al. (16) reforça que a BGSM é o critério de diagnóstico com maior sensibilidade e especificidade e deve ser realizada para confirmar o diagnóstico em todos os pacientes com suspeita de SS que apresentam resultado negativo para anticorpos anti-Ro / SSA. Guellec et al. (17) e Trevisani et al. (16) demonstraram que a sensibilidade da BGSM varia de 63,5% a 93,7%, enquanto a especificidade varia de 61,5% a 100%, os dados de especificidade foram mais consistentes e sugeriram alta especificidade do teste, considerada alta, > 80% na maioria dos estudos, provavelmente superior a 89%. Em relação ao valor preditivo positivo (VPP) do exame variou de 74,2% a 100% e o valor preditivo negativo (VPN) variou de 39,1% a 96,1% de acordo com o estudo Guellec et al. (17) Trevisani et al. (16) destacou um VPP de 95% e VPN de 92,6%.

Wicheta et al. (18) questionam se o SF no diagnóstico precoce pode ser consideravelmente menor do que naqueles casos de doença estabelecida ou progressiva, o que poderia justificar a não concordância em alguns casos entre

o diagnóstico histológico do arquivo e o deste estudo após a utilização dos critérios aplicados. Fisher et al. (10) relata a necessidade de aprofundamento dos cortes quando existem dúvidas no diagnóstico, e há chances de encontrar agregados linfocitários em áreas mais profundas.

Pacientes mais jovens no momento do diagnóstico parecem ter maior infiltração da glândula salivar devido a alterações imunomediadas mais agressivas Wicheta et al. (18) no nosso estudo a média de idade foi de 40,1 anos (\pm 13,2 anos). Também foi demonstrado que a extensão da infiltração inflamatória pode variar muito de glândula para glândula no mesmo paciente.

Ao fazermos uma comparação dos achados do Patologista durante a pesquisa e as informações presentes no laudo original identificamos diferenças importantes na área glandular e número de focos, o que reflete diretamente no SF. Dos 32 pacientes com SS positiva, a reavaliação histológica foi mantida em 24 dos 32, evidenciando uma concordância de 75%. Conforme relatado previamente por Greenspan et al. (19) Daniels et al. (9) e Wicheta et al. (18) a reprodutibilidade do SF pode ser notoriamente baixa, uma vez que, tanto a interpretação discordante entre patologistas quanto o seccionamento de espécimes submetidos em diferentes níveis contribuem para este problema, corroborando com o nossos achados. Dos 8 pacientes que não tiveram seus resultados mantidos, foi atribuída como causa a profundidade das secções dos blocos de parafina na reavaliação, pois o diagnóstico inicial foi dado em lâminas diferentes e as lâminas da pesquisa em sua maioria são recortes, além disso, se levou em conta também a variabilidade de interpretação entre patologistas corroborando com o estudo de Lucchesi et al. (11). Essa problemática acerca do número de focos levou a decisão de que a análise dessa variável deveria ser feita em três momentos, e não dois, como o restante das variáveis.

No nosso estudo detectamos fibrose em quase todas as lâminas positivas para SS, porém, não avaliamos a extensão dessa fibrose na glândula salivar como uma ferramenta para classificação ou diagnóstico da doença, apenas identificamos sua presença ou ausência. O estudo de Leehan et al. (20) e Sisto et al. (21) relata que indivíduos classificados como SSp têm maior porcentagem média de fibrose da área do que aqueles que não preenchem os critérios de

classificação de SSp, corroborando com os nossos achado. Essa característica é uma consequência comum de dano e inflamação dos tecidos e frequentemente complica doenças reumáticas, causa constrição de componentes secretores e acaba levando à hipossalivação e xerostomia.

Em relação a infiltração adiposa estudos como Leehan et al. (22) sugerem que a reposição de gordura na glândula salivar é principalmente uma característica do envelhecimento e não se associa a sinais de SS ou classificação da doença. O estudo de Chu et al. (23) discorda dessa informação, afirmando que a deposição de gordura nas glândulas salivares é uma consequência da SSp. No nosso estudo não encontramos associação de infiltração de tecido adiposo com idade avançada, sendo nossa média de 40,1 anos e estes achados estão de acordo com o estudo de Skarstein et al. (24) que menciona que os pacientes com SS (idade média de 53,0 anos) tiveram uma incidência significativamente maior de infiltração adiposa do que os não-SS (idade média de 54,8 anos). Uma distribuição etária uniforme entre esses grupos sugere que essa diferença significativa na infiltração adiposa entre indivíduos com e sem SS pode não ser um resultado de diferenças de idade.

Skarstein et al. (24) menciona ainda que ao avaliar a relação entre valor de SF e a incidência de infiltração adiposa, houve uma associação entre baixa infiltração adiposa e SF negativa em pacientes com SS. Portanto, pode haver uma relação entre o grau de inflamação da glândula e o grau de infiltração adiposa, onde o aumento da incidência de infiltração adiposa nos pacientes com SS pode apresentar um possível indicador de progressão da doença. Ainda não está claro se essa detecção de adipócitos no local da inflamação faz parte do processo de reparo ou é uma consequência do desenvolvimento da doença.

Em relação a presença de atrofia acinar e dilatação ductal, em nosso estudo tivemos a presença de atrofia acinar em todas as nossas amostras e em quase todas encontramos presença de dilatação ductal. Pereira et al. (15) menciona que é importante ressaltar que essas características histológicas carregam um componente subjetivo variável durante a avaliação, limitando seu uso rotineiro como parâmetro auxiliar no diagnóstico e progressão da SS. Não há muitos estudos analisando essas características na literatura, limitando assim sua avaliação.

Neste trabalho apresentamos uma abordagem moderna baseada em computador para a análise de lâminas usando o *software* OPTHD, que permitiu uma quantificação precisa da área glandular pelo método digital, uma vez que, é possível delimitar exatamente a área do parênquima, eliminando tecidos extras que não podiam ser removidos com confiança na mensuração convencional, como fibrose, tecido adiposo ou outros artefatos que não façam parte da área essencial do parênquima (10). Sabemos que o SF é influenciado pelo valor da área glandular total que através da análise digital conseguimos medir com exatidão a área total da glândula de uma maneira muito superior quando comparado com a análise de área total manual convencional utilizada na rotina. Esses achados corroboram com Lucchesi et al. (11).

Lucchesi et al. (11) incluíram toda a área de parênquima glândula salivar que não conseguiam remover com segurança. Os resultados sugerem que a concordância intra-observador pode variar em algumas características, conseqüentemente os resultados de SF sofrem diferença em função da menor área encontrada pelo método digital.

A concordância intra-observador encontrada em relação ao número total de focos inflamatórios em cada amostra de glândula salivar verificou-se que no nosso estudo varia de satisfatória a excelente segundo a classificação de Koo e Li (13), dessa forma sendo possível rejeitar a hipótese de que a concordância intra-observador seria pobre, porém sendo expressada a variabilidade na contagem. Segundo Lucchesi et al. (11) estudos demonstram que amostras com maior número de infiltrados inflamatórios levam a um grau muito maior de variabilidade na contagem total de focos entre os diferentes observadores. Isso não é surpreendente, pois as glândulas amplamente infiltradas frequentemente apresentam focos inflamatórios confluentes, deixando um alto grau de interpretação subjetiva na definição do limite espacial de cada foco inflamatório o que corrobora com os resultados desta pesquisa, pois foi identificado um número alto de focos linfocitários, dessa forma gerando mais uma vez uma diferença importante no resultado final numérico do SF no nosso estudo, mas mantendo o resultado positivo para SS. Apesar dessa diferença, tivemos uma correlação significativamente positiva (coeficiente de Spearman 0,971, $p < 0,001$) entre os valores de SF obtidos nas duas técnicas. Costa et al. (25) apontaram que são comuns as dificuldades na identificação de FLS e NSCS por

patologistas. Os desafios podem surgir quando ambas as características estão presentes na mesma glândula, porém se FLS predomina, então o FS deve ser determinado.

O estudo de Stewart et al. (26) nos mostra que a falta de concordância entre patologistas e uma padronização diagnóstica é preocupante, pois tem potencial para impactar o manejo do paciente. A presença de um $SF \geq 3$ (27) do ponto de vista do prognóstico da doença se torna uma alteração importante, uma vez que, esse resultado demonstra uma maior gravidade da SS, podendo estabelecer um risco maior para os casos de transformação maligna, para lesões como linfoma. Neste trabalho foram observadas diferenças de SF nas análises digitais e convencionais, tendendo a serem maiores na análise digital e se encontrando subestimadas na análise convencional devido ao fato de não se conseguir uma precisão na análise de área através desse método. Em nosso estudo, 17% das amostras exibiram $SF \geq 3$ na análise convencional. Enquanto que na análise digital, o $SF \geq 3$ foi evidenciado em 41,7% dos casos. Através do teste de qui-quadrado não se observou associação estatisticamente significativa entre o valor de SF e a presença de LESA nas duas técnicas empregadas. Portanto, fica evidente que nossos dados não têm realmente implicação prognóstica. Deve-se ainda considerar que esse limiar de SF mais preocupante foi originalmente baseado em análises convencionais e não digitais, o que necessitaria de maiores esclarecimentos.

Presença de alterações como LESA e CG são consideradas significativas para o prognóstico, e apesar de não serem frequentes neste estudo devem ser relatadas dada a sua importância em uma possível neoplasia hematológica. De maneira geral, neste estudo notou-se que em ambas as técnicas de análise, convencional e digital, a presença de LESA tende a apresentar SF maior em relação aos casos sem essa alteração, porém como já mencionado anteriormente, não se observou associação estatisticamente significativa entre o valor de SF e a presença de LESA através do teste de qui-quadrado.

LESA é relativamente incomum nas GSM e é mais frequentemente encontrada como uma característica das principais glândulas salivares maiores, como a parótida (16,28). Há estudos que rejeitam esta afirmação mostrando que foram encontrados ductos estriados com LESA em 81% das parótidas e 86%

das glândulas labiais, e eles estavam consistentemente localizados em associação com infiltrados periductais (29).

Em relação às estruturas semelhantes a CG Costa et al. (25) e SÈNE et al. (30) mencionam que essa característica prediz SS grave e o desenvolvimento de linfoma merecendo incorporação em sistemas de classificação de gravidade para SS e critérios de monitoramento para subgrupos específicos de pacientes. Sua prevalência variou entre 18% e 59% na revisão de Risselada et al. (27). CG eram comuns em estudos em populações com FS médio > 3 ou com linfoma MALT. Nesta revisão sistemática de 13 coortes de pacientes com SS, CG foram observados em 25,1% dos pacientes. Na revisão de Trevisani et al. (16) foi relatado que os CG são detectados em 17–25% das amostras de BGSM de pacientes com SS. Em nosso estudo tivemos apenas 1 caso de CG representando 4% das amostras identificado em coloração de rotina, a hematoxilina e eosina (H & E). Uma limitação do estudo foi a não realização de exame de imunohistoquímica para confirmação do CG.

Wicheta et al. (18) menciona que a maioria dos autores concorda que a detecção de CGs na BGSM é mais desafiadora do que nos nódulos linfáticos, o que também foi percebido em nosso estudo nas dificuldades encontradas durante a investigação dessas estruturas em BGSM utilizando somente a coloração histológica universal. A segregação da zona escura / clara pode ser mais difícil de avaliar e pode ser responsável pela ampla variabilidade relatada. A coloração imunohistoquímica para CD21, CD23, CD3 e CD20 pode ser usada para a identificação quantitativa de células B / T em focos linfocitários, bem como seu grau de segregação e pode ajudar na identificação de CGs.

Um dos pontos fracos desta pesquisa inclui sua natureza retrospectiva e o tamanho da amostra no estudo que foi realizado por conveniência. Nessa pesquisa uma padronização do laudo de SS é recomendada, para a melhora do processo diagnóstico da histologia de SS. Além das três características fundamentais como número de focos, área glandular e SF, seis outros itens importantes do parênquima que precisam ser relatados quanto a sua presença, sendo atrofia acinar, dilatação ductal, fibrose e tecido adiposo e duas características indispensáveis para o prognóstico da lesão, LESA e CG.

Além disso, a análise histopatológica quando feita a partir de um *software* (método digital) deve ser realizada com cautela, pois a área glandular mensurada através da análise digital tem uma maior precisão resultando em um SF diferente do encontrado pelo método convencional, onde se encontrava subestimado. Observamos que isso não interfere demasiadamente no diagnóstico histológico de SS, mas pode fazer diferença no seu prognóstico, já que um $SF \geq 3$ está relacionado com um risco aumentado de uma neoplasia hematológica, como o linfoma de acordo com os critérios utilizados na análise convencional (27). Ressaltamos ainda, a necessidade de mais estudos voltados para a análise digital através de *software* que tenham um resultado de SF adequado para as suas particularidades, pois é uma análise nova que ainda não tem parâmetros bem definidos, e quando utilizamos o que já está sedimentado na literatura temos valores frequentemente maiores quando comparados aos que encontraríamos em uma análise convencional.

A Análise Digital de Imagem (DIA) vem sendo usada há algumas décadas na patologia clínica com outras doenças e trazendo avanços nos processos diagnósticos destas, como por exemplo o câncer de mama, na detecção de biomarcadores na patologia cirúrgica. Como abordado por Cornish (31) ainda não existem modelos padronizados para integração de fluxos de trabalho clínicos em DIA. Costa et al. (32) também enfatizam que os sistemas automatizados estão associados a uma menor variabilidade intra e inter-observador em comparação com os métodos de contagem manual. Eles tornam o procedimento de contagem menos complicado e subjetivo, melhorando assim a reprodutibilidade e a precisão. É possível que ferramentas como esta possam auxiliar no diagnóstico mais rápido e acurado, contudo muitos avanços ainda se fazem necessários para o estabelecimento de uma análise digital no processo diagnóstico de GS.

Conclusão

A BGSM em pacientes com suspeita de SS é de extrema importância em função de suas implicações diagnósticas e prognósticas, no entanto etapas de sua avaliação podem estar sujeitas a subjetividade em menor ou maior grau,

sobretudo em relação a contagem de focos linfocitários. A maioria dos cortes histológicos de BGSM apresentam alta frequência de alterações, sejam elas representadas por atrofia acinar (100%; n=24), dilatação ductal (95,83%; n=23), infiltração adiposa (45,83%; n=11) ou fibrose (95,83%; n=23). Sugere-se que a LESA (33,33%; n=8) e CG (4,16%; n=1) apresentem baixa prevalência em GSM de pacientes com SS, podendo ser relatados de forma inconsistente. Verificou-se ainda uma diferença na comparação das análises convencionais e digitais, com tendência do SF ser maior nas análises digitais, em função da menor área. A análise digital apresenta maior precisão na medida de área glandular através do *software* e conseqüentemente o SF reflete essa característica apresentando resultado diferente do que encontramos no método convencional, onde ele se encontra subestimado, o que poderia repercutir em divergências prognósticas, mas não diagnósticas.

Abreviações

ACR/EULAR: Colégio Americano de Reumatologia/ Liga Européia contra o Reumatismo; AECG: *American European Consensus Group*; BGSM: Biópsia de glândula salivar menor; CCI: Coeficiente de Confiabilidade intraclasse; CEP: Comitê de Ética e Pesquisa com Seres Humanos; CG: Centros Germinativos; DIA: Análise Digital de Imagens; DPML: Departamento de Patologia e Medicina Legal; FLS: Sialoadenite Linfocítica focal; SF: *Score Focal*; GSM: Glândula Salivar Menor; HE: Hematoxilina-eosina; LESA: Lesão Linfoepitelial; MALT: Linfoma da Zona Marginal da Mucosa Associada ao Tecido Linfóide; NSCS: Sialadenite Crônica Não Específica; SCO: Escore de Coloração Ocular; SCS: Sialadenite Esclerosante Crônica; SS: Síndrome de Sjogren; SSp: Síndrome de Sjogren Primária; SSS: Síndrome de Sjogren Secundária; UFAM: Universidade Federal do Amazonas.

DECLARAÇÕES

Aprovação ética e consentimento para participar

Não se aplica

Consentimento para publicação

Não se aplica

Disponibilidade de dados e materiais

Os conjuntos de dados usados e/ou analisados durante o estudo atual estão disponíveis junto ao autor correspondente, mediante solicitação.

Financiamento

Financiamento próprio

Conflito de interesse

Os autores não declaram conflito de interesse

Contribuição dos autores

JBB foi responsável pelo desenho do estudo, coleta, análise e interpretação de dados e redação do trabalho; CNM contribuiu com a análise e interpretação de dados e redação do trabalho. JVP

contribuiu com o desenho do estudo e análise de dados. YNF contribuiu com a análise estatística dos dados. JC contribuiu com a análise de dados. TNK contribuiu substancialmente para a concepção e desenho do trabalho, interpretação dos dados, redação do trabalho e revisão crítica.

Detalhes dos autores

¹ Mestranda de Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO), Universidade Federal do Amazonas

² Acadêmica de Odontologia. Faculdade de Odontologia. Universidade Federal do Amazonas

³ Professora de Estomatologia. Faculdade de Odontologia. Universidade Federal do Amazonas

⁴ Professor de Saúde Bucal Coletiva. Faculdade de Odontologia. Universidade Federal do Amazonas

⁵ Professor de Patologia Oral e Maxilofacial. Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Amazonas

Referências

1. Barone F, Campos J, Bowman S, Fisher BA. The value of histopathological examination of salivary gland biopsies in diagnosis, prognosis and treatment of Sjögren's syndrome. *Swiss Med Wkly*. 2015;145:w14168.
2. Shiboski CH, Shiboski SC, Seror R, Criswell LA, Labetoulle M, Lietman TM, et al. 2016 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism classification criteria for primary Sjögren's syndrome: A consensus and data-driven methodology involving three international patient cohorts. *Ann Rheum Dis*. 2017;76(1):9–16.
3. Rasmussen A, Ice JA, Li H, Grundahl K, Kelly JA, Radfar L, et al. Comparison of the American-European Consensus Group Sjögren's syndrome classification criteria to newly proposed American College of Rheumatology criteria in a large, carefully characterised sicca cohort. *Ann Rheum Dis*. 2014;73(1):31–8.
4. Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos H, Alexander E, Carsons S, et al. Classification criteria for Sjögren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis*. 2002;61:554–8.
5. Aljanobi H, Sabharwal A, Krishnakumar B, Kramer JM. Is it Sjögren's Syndrome or Burning Mouth Syndrome? Distinct pathoses with similar oral

- symptoms. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2017;123(4):482–95.
6. Dinescu ȘC, Fortofoiu MC, Bumbea AM, Ciurea PL, Busuioc CJ, Mușetescu AE. Histopathological and immunohistochemical profile in primary Sjögren's syndrome. *Rom J Morphol Embryol.* 2017;58(2):409–17.
 7. Soto-Rojas AE, Kraus A. The oral side of Sjögren syndrome. Diagnosis and treatment. A review. *Arch Med Res.* 2002;33(2):95–106.
 8. Daniels TE. Labial salivary gland biopsy in Sjögren's syndrome. Assessment as a diagnostic criterion in 362 suspected cases. *Arthritis Rheum.* 1984;27(2):147–56.
 9. Daniels TE, Cox D, Shiboski CH, Schiødt M, Wu A, Lanfranchi H, et al. Associations between salivary gland histopathologic diagnoses and phenotypic features of Sjögren's syndrome among 1,726 registry participants. *Arthritis Rheum.* 2011;63(7):2021–30.
 10. Fisher BA, Jonsson R, Daniels T, Bombardieri M, Brown RM, Morgan P, et al. Standardisation of labial salivary gland histopathology in clinical trials in primary Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis.* 2017;76(7):1161–8.
 11. Lucchesi D, Pontarini E, Donati V, Mandarano M, Sidoni A, Bartoloni E, et al. The use of digital image analysis in the histological assessment of Sjögren's syndrome salivary glands improves inter-rater agreement and facilitates multicentre data harmonisation. *Clin Exp Rheumatol.* 2021;38(4):S180–8.
 12. Malta M, Cardoso LO, Bastos FI, Magnanini MMF, Silva CMFP da. Iniciativa STROBE: subsídios para a comunicação de estudos observacionais. *Rev Saude Publica.* 2010 Jun;44(3):559–65.
 13. Koo TK, Li MY. A Guideline of Selecting and Reporting Intraclass Correlation Coefficients for Reliability Research. *J Chiropr Med.* 2016;15(2):155–63.
 14. Valim V, Zandonade E, Pereira AM, Honor O, Filho DB, Serrano EV, et al. Prevalência da síndrome de Sjögren primária em importante área

- metropolitana no Brasil. *Rev Bras Reum.* 2013;53(1):24–34.
15. Pereira DL, Vilela VS, dos-Santos TCRB, Pires FR. Clinical and laboratorial profile and histological features on minor salivary glands from patients under investigation for Sjögren's syndrome. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2014;19(3):237–41.
 16. Trevisani VFM, Pasoto SG, Fernandes MLMS, Lopes MLL, De Magalhães Souza Fialho SC, Pinheiro AC, et al. Recommendations from the Brazilian society of rheumatology for the diagnosis of Sjögren's syndrome (Part I): Glandular manifestations (systematic review). *Adv Rheumatol.* 2019;59(1):1–17.
 17. Guellec D, Cornec D, Jousse-Joulin S, Marhadour T, Marcorelles P, Pers JO, et al. Diagnostic value of labial minor salivary gland biopsy for Sjögren's syndrome: A systematic review. *Autoimmun Rev.* 2013;12(3):416–20.
 18. Wicheta S, Van der Groen T, Faquin WC, August M. Minor Salivary Gland Biopsy—An Important Contributor to the Diagnosis of Sjögren Syndrome. *J Oral Maxillofac Surg.* 2017;75(12):2573–8.
 19. Greenspan JS, Daniels TE, Talal N, Sylvester RA. The histopathology of Sjögren's syndrome in labial salivary gland biopsies. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1974;37(2):217–29.
 20. Leehan KM, Pezant NP, Rasmussen A, Grundahl K, Moore JS, Radfar L, et al. Minor salivary gland fibrosis in Sjögren's syndrome is elevated, associated with focus score and not solely a consequence of aging. *Clin Exp Rheumatol.* 2018;36(Suppl 112):80–188.
 21. Sisto M, Lorusso L, Ingravallo G, Tamma R, Ribatti D, Lisi S. The TGF- β 1 signaling pathway as an attractive target in the fibrosis pathogenesis of Sjögren's syndrome. *Mediators Inflamm.* 2018;2018:1965935.
 22. Leehan KM, Pezant NP, Rasmussen A, Grundahl K, Moore JS, Radfar L, et al. Fatty infiltration of the minor salivary glands is a selective feature of aging but not Sjögren's syndrome. *Autoimmunity.* 2017;50(8):451–7.
 23. Chu C, Feng Q, Zhang H, Zhao S, Chen W, He J, et al. Evaluation of

- salivary gland fat fraction values in patients with primary Sjögren's syndrome by mDIXON quant imaging: Initial findings. *Eur J Radiol*. 2020;123:108776.
24. Skarstein K, Aqrabi LA, Øijordsbakken G, Jonsson R, Jensen JL. Adipose tissue is prominent in salivary glands of Sjögren's syndrome patients and appears to influence the microenvironment in these organs. *Autoimmunity*. 2016;49(5):338–46.
 25. Costa S, Quintin-Roué I, Lesourd A, Jousse-Joulin S, Berthelot JM, Hachulla E, et al. Reliability of histopathological salivary gland biopsy assessment in sjögren's syndrome: A multicentre cohort study. *Rheumatol (United Kingdom)*. 2015;54(6):1056–64.
 26. Stewart CM, Bhattacharyya I, Berg K, Cohen DM, Orlando C, Drew P, et al. Labial salivary gland biopsies in Sjögren's syndrome: still the gold standard? *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2008;106(3):392–402.
 27. Risselada AP, Looije MF, Kruize AA, Bijlsma JWJ, Van Roon JAG. The Role of Ectopic Germinal Centers in the Immunopathology of Primary Sjögren's Syndrome: A Systematic Review. *Semin Arthritis Rheum*. 2013;42(4):368–76.
 28. Mason GI, Hamburger J, Bowman S, Matthews JB. Salivary gland expression of transforming growth factor β isoforms in Sjogren's syndrome and benign lymphoepithelial lesions. *J Clin Pathol - Mol Pathol*. 2003;56(1):52–9.
 29. Van Ginkel MS, Haacke EA, Bootsma H, Arends S, Van Nimwegen JF, Verstappen GM, et al. Presence of intraepithelial B-lymphocytes is associated with the formation of lymphoepithelial lesions in salivary glands of primary Sjögren's syndrome patients. *Clin Exp Rheumatol*. 2019;37(6):S42–8.
 30. Sène D, Ismael S, Forien M, Charlotte F, Kaci R, Cacoub P, et al. Ectopic Germinal Center–Like Structures in Minor Salivary Gland Biopsy Tissue Predict Lymphoma Occurrence in Patients With Primary Sjögren's

- Syndrome. *Arthritis Rheumatol.* 2018;70(9):1481–8.
31. Cornish TC. Clinical Application of Image Analysis in Pathology. *Adv Anat Pathol.* 2020;27(4):227–35.
 32. Costa S, Schutz S, Cornec D, Uguen A, Quintin-Roué I, Lesourd A, et al. B-cell and T-cell quantification in minor salivary glands in primary Sjögren's syndrome: Development and validation of a pixel-based digital procedure. *Arthritis Res Ther.* 2016;18:21.

6. CONCLUSÃO

A BGSM é uma ferramenta fundamental para a investigação da SS, não somente no diagnóstico como também no prognóstico. Os resultados deste estudo evidenciam os desafios da análise histológica criteriosa de pacientes com suspeita de SS. Esta análise deve seguir os parâmetros atualmente preconizados, a fim de fornecer um laudo histológico com maior precisão e maior nível de confiabilidade para ser utilizado no contexto do diagnóstico final da SS. A maioria dos cortes histológicos de BGSM apresentam alta frequência de alterações, sejam elas representadas por atrofia acinar (100%; n=24), dilatação ductal (95,83%; n=23), infiltração adiposa (45,83%; n=11) ou fibrose (95,83%; n=23). Uma parcela menor desses pacientes apresenta alterações como CG (4,16%; n=1) e LESA (33,33%; n=8) que devem ter essas características descritas no laudo, tornando-o mais completo e com informações importantes para o prognóstico do paciente. A subjetividade intra-observador tanto na contagem de focos linfocitários quanto na medição da área glandular deve ser considerada. As análises através do uso de *softwares* digitais apresentam maior precisão na análise de área e podem trazer diferenças quantitativas em relação ao SF em relação ao método convencional onde se encontra subestimado por não ter uma análise de área glandular tão precisa o que poderia implicar em divergências no prognóstico necessitando de estudo adicionais para melhor aplicação dessa técnica. No que diz respeito ao diagnóstico final de sialoadenite linfocítica focal com $SF \geq 1$, compatível com o que se observa na SS, as técnicas não apresentam diferenças qualitativas.

REFERÊNCIAS

- ALJANOBI, H. et al. Is it Sjögren's Syndrome or Burning Mouth Syndrome? Distinct pathoses with similar oral symptoms. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, 123(4):482-495, 2017.
- ALUNNO, A. et al. Lymphoma and Lymphomagenesis in Primary Sjögren's Syndrome. **Front Med (Lausanne)**, 13;5:102, 2018.
- AQRAWI, L.A et al. Signalling pathways identified in salivary glands from primary Sjögren's syndrome patients reveal enhanced adipose tissue development. **Autoimmunity**, 51(3):135-146, 2018.
- BARRERA, M.J. et al. Sjögren's syndrome and the epithelial target: A comprehensive review. **J Autoimmu**, 42:7-18, 2013.
- BARONE, F. et al. The value of histopathological examination of salivary gland biopsies in diagnosis, prognosis and treatment of Sjögren's Syndrome. **Swiss Med Wkly**, 145:w14168, 2015.
- CARUBBI, F. et al. Histopathology of salivary glands. **Reumatismo**, 70(3):146-154, 2018.
- CARUBBI, F. et al. Is minor salivary gland biopsy more than a diagnostic tool in primary Sjogren's Syndrome? Association between clinical, histopathological and molecular features: a retrospective study. **Semin Arthritis Rheum**, 44(3):314-324, 2014
- CHISHOLM, D.M; MASON, D. K. Labial salivary gland biopsy in Sjögren's disease. **J Clin Pathol**, 21(5):656-60, 1968.
- CHU, C. et al. Evaluation of salivary gland fat fraction values in patients with primary Sjögren's syndrome by mDIXON quant imaging: Initial findings. **Eur J Radiol**, 123:108776, 2020.
- CORNISH, T.C. Clinical Application of Image Analysis in Pathol. **Adv Anat Pathol**, 27(4):227-235, 2020.
- COSTA, S. et al. B-cell and T-cell quantification in minor salivary glands in primary Sjögren's syndrome: development and validation of a pixel-based digital procedure. **Arthritis Res Ther**, 18:21, 2016.
- COSTA, S. et al. Reliability of histopathological salivary gland biopsy assessment in Sjogren's syndrome: a multicentre cohort study. **Rheumatology**, 54(6):1056-64, 2015.

DANIELS, T.E. Labial salivary gland biopsy in Sjögren's syndrome: assessment as a diagnostic criterion in 362 suspected cases. **Arthritis Rheum**, 27:147–56, 1984.

DANIELS, T.E. et al. Associations between salivary gland histopathologic diagnoses and phenotypic features of Sjögren's syndrome among 1,726 registry participants. **Arthritis Rheum**, 63(7):2021-30, 2011.

DANIELS, T. E.; WHITCHER, J. P. Association of patterns of labial salivary gland inflammation with keratoconjunctivitis sicca. Analysis of 618 patients with suspected Sjögren's syndrome. **Arthritis Rheum**, 37(6):869-77, 1994.

DINESCU, Ş.C. et al. Histopathological and immunohistochemical profile in primary Sjögren's syndrome. **Rom J Morphol Embryol**, 58(2):409-417, 2017.

FISHER, B.A. et al. Standardisation of labial salivary gland histopathology in clinical trials in primary Sjögren's syndrome. **Ann Rheum Dis**, 76:1161–1168, 2017.

FRAGKIOUDAKI, S.; MAVAGRANI, C.P.; MOUTSOPOULOS, H.M. Predicting the risk for lymphoma development in Sjogren syndrome: An easy tool for clinical use. **Medicine**. 95:25, 2016.

GIOVELLI, R.A. et al. Clinical characteristics and biopsy accuracy in suspected cases of Sjögren's syndrome referred to labial salivary gland biopsy. **BMC Musculoskelet Disord**, 16:30, 2015.

GREENSPAN, J. S. et al. The histopathology of Sjogren's syndrome in labial salivary gland biopsies. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, 37(2):217-29, 1974.

GUELLEC, D. et al. Diagnostic value of labial minor salivary gland biopsy for Sjögren's syndrome: A systematic review. **Autoimmun Rev**, 12(3):416-20, 2013.

HAACKE, E.A. et al. Germinal centres in diagnostic labial gland biopsies of patients with primary Sjögren's syndrome are not predictive for parotid MALT lymphoma development. **Ann Rheum Dis**, 76(10):1781-1784, 2017.

IWASA, A. et al. Aromatase controls Sjögren syndrome-like lesions through monocyte chemotactic protein-1 in target organ and adipose tissue-associated macrophages. **Am J Pathol**, 185(1):151-61, 2015.

KATONA, K. et al. Adipose tissue infiltration in minor salivary glands of patients with Sjögren's syndrome: Lack of significant correlation with the disease. An image analysis of 174 cases. **Autoimmunity**, 50(4):199-201, 2017.

KOO, T. K.; LI, M. Y. A Guideline of Selecting and Reporting Intraclass Correlation Coefficients for Reliability Research. **Journal of Chiropractic Medicine**, 15(2):155–163, 2016.

LEE, K.E. et al. The Significance of Ectopic Germinal Centers in the Minor Salivary Gland of Patients with Sjögren's Syndrome. **J Korean Med Sci**, 31:190-195, 2016.

LEEHAN, K.M. et al. Fatty infiltration of the minor salivary glands is a selective feature of aging but not Sjögren's syndrome. **Autoimmunity**, 50(8):451-457, 2017.

LEEHAN, K.M. et al. Minor salivary gland fibrosis in Sjögren's syndrome is elevated, associated with focus score and not solely a consequence of aging. **Clin Exp Rheumatol**, 112(3):80-88, 2018.

LLAMAS-GUTIERREZ, F.J. et al. Histopathological environment besides the focus score in Sjögren's syndrome. **Int J Rheum Dis**, 17(8):898-903, 2014.

LUCCHESI, D. et al. The use of digital image analysis in the histological assessment of Sjögren's syndrome salivary glands improves inter-rater agreement and facilitates multicentre data harmonization. **Clin Exp Rheumatol**, 38 Suppl 126(4):180-188, 2020.

MASON, G.I. et al. Salivary gland expression of transforming growth factor beta isoforms in Sjögren's syndrome and benign lymphoepithelial lesions. **Mol Pathol**, 56(1):52-9, 2003.

PEREIRA, D.L. et al. Clinical and laboratorial profile and histological features on minor salivary glands from patients under investigation for Sjögren's syndrome. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, 19(3):e237-41, 2014.

PRINGLE, S. et al. Salivary Gland Stem Cells Age Prematurely in Primary Sjögren's Syndrome. **Arthritis Rheum**, 71(1):133-142, 2019.

RASMUSSEN, A. et al. Comparison of the American-European Consensus Group Sjögren's syndrome classification criteria to newly proposed American College of Rheumatology criteria in a large, carefully characterized sicca cohort. **Ann Rheum Dis**, 73(1), 2014.

RISSELADA, A.P. et al. The Role of Ectopic Germinal Centers in the Immunopathology of Primary Sjögren's Syndrome: A Systematic Review. **Semin Arthritis Rheum**, 42(4):368-76, 2013.

SÈNE, D. et al. Ectopic germinal centre-like structures in minor salivary gland biopsy predict lymphoma occurrence in patients with primary Sjögren syndrome. **Arthritis Rheum**, 70(9):1481-1488, 2018.

SHIBOSKI, C.H. et al. 2016 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism classification criteria for primary Sjögren's syndrome. **Ann Rheum Dis**, 76:9-16, 2017.

SISTO, M. et al. The TGF- β 1 Signaling Pathway as an Attractive Target in the Fibrosis Pathogenesis of Sjögren's Syndrome. **Mediators Inflamm**, 2018:1965935, 2018.

SKARSTEIN, K. et al. Adipose tissue is prominent in salivary glands of Sjögren's syndrome patients and appears to influence the microenvironment in these organs. **Autoimmunity**, 49(5):338-46, 2016.

SOTO-ROJAS, A.E.; KRAUS, A. The oral side of Sjogren syndrome. Diagnosis and treatment. A review. **Arch Med Res**, 33:95-106, 2002.

STEWART, CM. et al. Labial salivary gland biopsies in Sjögren's syndrome: still the gold standard? **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, 106(3):392-402, 2008.

STROBE Statement. Strengthening the reporting of observational studies in epidemiology checklists. <https://www.strobe-statement.org/index.php?id=available-checklists>.

THEANDER, E. et al. Lymphoid organisation in labial salivary gland biopsies is a possible predictor for the development of malignant lymphoma in primary Sjögren's syndrome. **Ann Rheum Dis**, 70(8):1363-8, 2011.

TINCANI, A. et al. Novel aspects of Sjögren's syndrome in 2012. **BMC Med**, 11:93, 2013.

TREVISANI, V.F.M. et al. Recommendations from the Brazilian society of rheumatology for the diagnosis of Sjögren's syndrome (Part I): glandular manifestations (systematic review). **Adv Rheumatol**, 59(1):58, 2019.

VALIM, V. et al. Prevalência da Síndrome de Sjögren primária em importante área metropolitana no Brasil. **Rev Bras Reumatol**, 50(1):24-34, 2013.

VAN GINKEL, M.S. et al. Presence of intraepithelial B-lymphocytes is associated with the formation of lymphoepithelial lesions in salivary glands of primary Sjögren's syndrome patients. **Clin Exp Rheumatol**, 37 Suppl 118(3):42-48, 2019.

VITALI, C. et al. Classification criteria for Sjögren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. **Ann Rheum Dis**, 61(6):554-8, 2002.

WANG, X. et al. Dysregulation of NF- κ B in glandular epithelial cells results in Sjögren's-like features. **PLoS One**, 13(8):e0200212, 2018.

WICHETA, S. et al. Minor Salivary Gland Biopsy-An Important Contributor to the Diagnosis of Sjögren Syndrome. **J Oral Maxillofac Surg**, 75(12):2573-2578, 2017.

WICHETA, S. et al. Discrepancies in Interpretation of the Minor Salivary Gland Biopsy in the Diagnosis of Sjögren syndrome. **J Oral Maxillofac Surg**, 77(8):1628-1635, 2019.

APÊNDICE A – FICHA DE COLETA INDIVIDUAL

CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA DE BIÓPSIA DE GLÂNDULA SALIVAR MENOR COMO FATOR DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO DE PACIENTES COM SÍNDROME DE SJOGREN

FICHA DE COLETA INDIVIDUAL

Nº de registro:	PC-DPML:		
Data do diagnóstico:	Identificação do paciente no estudo:		
Sexo:	Idade:		
Raça:	Ocupação:		
Dados clínicos e exames			
	SIM	NÃO	Valor
Xerostomia			
Xeroftalmia			
anti-SSA/RO			
anti-SSB/LA			
Schirmer			
Teste de fluxo salivar:			
Outros exames. _____			

APÊNDICE B – TABELA COM DADOS CLÍNICOS DOS 24 CASOS

CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA DE BIÓPSIA DE GLÂNDULA SALIVAR
MENOR COMO FATOR DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO DE PACIENTES COM
SÍNDROME DE SJOGREN

TABULAÇÃO DE DADOS CLÍNICOS

PC	Idade	Sexo	Raça	Xerostomia	Xerofthalmia	Oftalmológicos	Sorológicos	Sialometria
1	32	F	ÍNDIA	X	X	NI	NI	0,044ML/MIN POSITIVO
2	55	F	PARDA	X	X	SCHIRMER 6mm/5min NEGATIVO	NI	0,008ML/MIN POSITIVO
3	50	F	NEGRA	X	X	0mm/5min POSITIVO	NI	0,2ml/min NEGATIVO
4	55	F	PARDA	X	X	2mm/5min POSITIVO	NI	0,008ml/min POSITIVO
5	38	F	PARDA	X	X	NI	NI	0,008ml/min POSITIVO
6	59	F	PARDA	NI	NI	NI	NI	0,16ml/min POSITIVO
7	45	F	PARDA	X	X	NI	NI	NI
8	35	F	PARDA	X	X	0mm/5min POSITIVO	NI	0,0303 POSITIVO
9	34	F	PARDA	X	X	30mm/5min NEGATIVO	ANTI-Ro POSITIVO ANTI- La POSITIVO	1,48ml/min NEGATIVO
10	52	F	PARDA	X	NI	POSITIVO	ANTI-Ro POSITIVO ANTI- La POSITIVO	NI
11	21	F	PARDA	X	X	NI	NI	NI
12	50	F	NEGRA	NI	NI	NI	NI	NI
13	9	F	PARDA	X	NI	NI	NI	NI
14	44	F	PARDA	NI	NI	NI	NI	NI
15	66	F	PARDA	X	X	NI	NI	0,055ML/MIN POSITIVA
16	21	F	PARDA	X	NI	NI	NI	NI
17	37	F	LEUCODERMA	NI	NI	NI	NI	NI
18	40	F	NI	X	X	NI	NI	NI
19	42	F	PARDA	X	NI	NI	NI	NEGATIVO (NORMAL)

20	40	F	PARDA	X	NI	NI	ANTI-Ro POSITIVO 84	FLUXO NORMAL 0,4ML/MIN
21	27	F	NEGRA	X	X	NI	NI	HIPOSSALIVAÇÃO 0,033ML/MIN
22	31	F	PARDA	X	X	NI	ANTI-Ro POSITIVO	FLUXO NORMAL 0,2ML/MIN
23	46	F	NI	X	X	NEGATIVO	ANTI-Ro POSITIVO >240	HIPOSSALIVAÇÃO 0,092ML/MIN
24	34	F	PARDA	NI	X	NI	NI	NI

APÊNDICE C – TABELA PARA TABULAÇÃO DE DADOS HISTOLÓGICOS

CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA DE BIÓPSIA DE GLÂNDULA SALIVAR
MENOR COMO FATOR DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO DE PACIENTES COM
SÍNDROME DE SJOGREN

TABULAÇÃO DE DADOS HISTOLÓGICOS

PC-DPML	PACIENTE	Nº DE LÂMINAS	FOCOS LINFOCITÁRIOS			ÁREA DE TECIDO GLÂNDULAR			SCORE FOCAL	FIBROSE		TECIDO ADIPOSEO		DILATAÇÃO DUCTAL		ATROFIA ACINAR		LESÃO LINFÓCITELI		CENTROS GERMINATI		Nº F MACRO	Nº F LÂMINA	PATOLOGISTA	
			S	N	Nº	1º ANÁLISE	2º ANÁLISE	MÉDIA FINAL		Nº	S	N	S	N	S	N	S	N	S	N	S				N
	1																								
	2																								
	3																								
	4																								
	5																								
	6																								

Obs: A mesma ficha consolidada será usada para análise convencional e digital

APÊNDICE D – TABELA COM DADOS HISTOPATOLÓGICOS DOS 24 CASOS

ANÁLISE HISTOLÓGICA CONSOLIDADA

PACIENTE	FOCOS LINFOCITÁRIOS				ÁREA DE TECIDO GLÂNDULAR CONVENCIONAL			SCORE FOCAL CONVENCIONAL	ÁREA DE TECIDO GLÂNDULAR DIGITAL			SCORE FOCAL DIGITAL	FIBROSE	TECIDO ADIPOSE	DILATAÇÃO DUCTAL	ATROFIA ACINAR	LESA	CG
	1º	2º	3º	MÉDIA	1º	2º	MÉDIA		Nº	1º	2º							
1	6	10	9	8	13	14	13,5	2,37	7,1	7,1	7,1	4,51	SIM	NÃO	SIM	SIM	SIM	NAO
2	6	6	6	6	9	9,5	9,25	2,59	3,9	3,3	3,6	6,67	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	NAO
3	7	8	8	7	16	15,2	15,62	1,79	11,1	10,4	10,75	2,60	SIM	NÃO	SIM	SIM	NAO	NAO
4	13	13	13	13	21	18,7	19,87	2,62	12,4	12	12,2	4,26	SIM	SIM	SIM	SIM	NÃO	NAO
5	11	11	12	11	21	20,5	20,75	2,12	13,1	13,1	13,1	3,36	SIM	NÃO	SIM	SIM	SIM	NAO
6	2	3	4	3	12	12,7	12,37	0,97	9,1	8,7	8,9	1,35	SIM	SIM	SIM	SIM	NÃO	NAO
7	19	11	16	15	11	12,5	11,75	5,11	10,3	10,4	10,35	5,80	SIM	NÃO	SIM	SIM	SIM	NAO
8	6	15	15	12	12	14	13	3,69	9,4	9,5	9,45	5,08	SIM	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NAO
9	3	2	2	2	10	9,5	9,75	0,82	7,5	7,5	7,5	1,07	SIM	NÃO	SIM	SIM	NAO	NAO
10	9	10	11	10	11	15	13	3,08	8,3	8,5	8,4	4,76	SIM	SIM	SIM	SIM	NÃO	NAO
11	10	13	14	12	39	46,5	42,75	1,12	28,4	28,7	28,55	1,68	SIM	NÃO	SIM	SIM	NAO	NAO
12	8	17	22	15	26	26	26	2,31	18,2	18,1	18,15	3,31	SIM	NÃO	SIM	SIM	NAO	NAO
13	2	4	5	3	8	7,5	7,75	1,55	5,9	5,8	5,85	2,05	SIM	NÃO	SIM	SIM	SIM	NAO
14	3	4	5	4	17	18,5	17,75	0,90	11	10,6	10,8	1,48	SIM	NÃO	SIM	SIM	SIM	NAO
15	33	6	7	5	9	12	10,5	1,90	7,1	7	7,05	2,84	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	NAO
16	7	16	20	14	31	41,5	36,25	1,54	21,3	22,5	21,9	2,56	SIM	SIM	SIM	SIM	NAO	SIM
17	6	8	10	8	37	40	38,5	0,83	25,7	36,6	26,15	1,22	SIM	NÃO	SIM	SIM	NAO	NAO
18	5	5	6	5	19	24	21,5	0,93	11,7	12,6	12,15	1,65	NÃO	SIM	SIM	SIM	NAO	NAO
19	9	13	17	13	38	49	43,5	1,20	26,7	27,5	27,1	1,92	SIM	SIM	SIM	SIM	NAO	NAO
20	6	6	8	6	21	20,5	20,75	1,16	11,6	11,6	11,6	2,07	SIM	SIM	SIM	SIM	NAO	NAO
21	9	5	9	7	12,5	11,5	12	2,33	7,5	7,7	7,6	3,68	SIM	NÃO	SIM	SIM	NAO	NAO

22	10	9	12	10	20	16	18	2,22	12,3	12,5	12,4	3,23	SIM	SIM	SIM	SIM	NAO	NAO
23	9	6	10	8	9,5	9	9,25	3,46	7	6,9	6,95	4,60	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	NAO
24			15		24,5	26	25,25	3,28	11,8	11,9	11,85	5,06	SIM	NAO	SIM	SIM	NAO	NAO

ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
AMAZONAS - UFAM

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA DE BIÓPSIA DE GLÂNDULA SALIVAR MENOR COMO FATOR DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO DE PACIENTES COM SÍNDROME DE SJOGREN

Pesquisador: Jéssica Barroso Barbosa

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 21385419.9.0000.5020

Instituição Proponente: Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.613.628

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

MANAUS, 01 de Outubro de 2019

Assinado por:
Eliana Maria Pereira da Fonseca
(Coordenador(a))