



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
MESTRADO EM ODONTOLOGIA**

**ESTUDO DA GLÂNDULA SALIVAR MENOR DE PACIENTES
COM SÍNDROME DE SJÖGREN: ANÁLISE
HISTOPATOLÓGICA, CARACTERIZAÇÃO DO INFILTRADO
INFLAMATÓRIO E ASSOCIAÇÃO COM O VÍRUS EPSTEIN-
BARR E CITOMEGALOVIRUS**

ANTONIO JORGE ARAÚJO DE VASCONCELOS II

MANAUS

2015



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
MESTRADO EM ODONTOLOGIA**



ANTONIO JORGE ARAÚJO DE VASCONCELOS II

**ESTUDO DA GLÂNDULA SALIVAR MENOR DE PACIENTES
COM SÍNDROME DE SJÖGREN: ANÁLISE
HISTOPATOLÓGICA, CARACTERIZAÇÃO DO INFILTRADO
INFLAMATÓRIO E ASSOCIAÇÃO COM O VÍRUS EPSTEIN-
BARR E CITOMEGALOVIRUS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Odontologia da Universidade
Federal do Amazonas, como requisito parcial para a
obtenção do título de Mestre em Ciências
Odontológicas

Orientadora: Profa Dra Tatiana Nayara Libório Kimura.

Co-orientadora: Profa Dra Nikeila Chacon de Oliveira Conde.

**MANAUS
2015**

Ficha Catalográfica

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

V331e Vasconcelos II, Antonio Jorge Araujo de
Estudo da glândula salivar menor de pacientes com síndrome de sjögren : análise histopatológica, caracterização do infiltrado inflamatório e associação com o vírus epstein-barr e citomegalovirus / Antonio Jorge Araujo de Vasconcelos II . 2015
82 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Tatiana Nayara Libório Kimura
Coorientadora: Nikeila Chacon de Oliveira Conde
Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Síndrome de sjögren. 2. Epstein barr virus. 3. CMVcitomegalovirus. 4. imunoistoquímica. 5. PCR-polymerase chain reaction. I. Kimura, Tatiana Nayara Libório. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

FOLHA DE APROVAÇÃO

Vasconcelos II, A. J.A. Estudo da glândula salivar menor de pacientes com Síndrome de Sjögren: análise histopatológica, caracterização do infiltrado inflamatório e associação com o vírus EBV e Citomegalovirus [Dissertação de Mestrado]. Amazonas; Faculdade de Odontologia da UFAM; 2015.

Amazonas, __/__/__.

Banca Examinadora

1) Prof^ª. Dr.^ªTatiana Nayara Libório Kimura

Titulação: Membro titular e presidente

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof. Dr.Luiz Carlos de Lima Ferreira

Titulação: Membro titular

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof. Dr. Luiz Fernando de Souza Passos

Titulação: Membro titular

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Antonio Jorge e Ana Glória, depositários do conhecimento a respeito do que é a Vida e transmissores do dever de todo homem: *“teme a Deus e guardar teus Mandamentos”*.

Aos meus irmãos Sylvia e Cayo, pela paciência e carinho de uma vida.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Profa Dra Tatiana Nayara Libório Kimura e a minha co-orientadora Profa Dra Nikeila Chacon de Oliveira Conde pelas sugestões a respeito do caminho das pedras.

Ao Prof Dr Luiz Carlos de Lima Ferreira, Prof Ms José de Ribamar Araújo e Prof Ms Jeconias Câmara pelas portas abertas e desprendimento pelo compromisso com a investigação científica.

A todos os professores do Programa de Pós Graduação em Odontologia, pela missão na construção do conhecimento e formação de mestres.

Aos amigos da Patologia Bucal e da Semiologia Odontológica I do curso de Odontologia da minha casa –Universidade do Estado do Amazonas- Prof Dr Lioney Nobre Cabral, Prof Dr Tiago Novaes Pinheiro, Prof Dr Marco Túllio Brazão Silva, Prof Dr José Ricardo Prando Santos, Profa Ms Vilma da Silva Melo, Profa Dra Cláudia Andréa Corrêa Garcia Simões, Profa Ms Michele Navarro Ferreira, Profa Esp Myrian Salles Vieira pela amizade, apoio e carinho fraterno que envolve nosso ambiente de trabalho. É uma vitória nossa.

À todos os funcionários da disciplina de patologia bucal e Policlínica Odontológica da UEA, do Departamento de Patologia e Medicina Legal da UFAM, da Faculdade de Odontologia da UFAM e dos laboratórios de Biologia Molecular e Imunoistoquímica da Fundação de Medicina Tropical – Heitor Vieira Dourado pelo bom convívio e dedicação em tudo o que se é necessário para o bom combate da docência e pesquisa científica

À biomédica Ms Renata Galvão, pela amizade, dedicação e grande humildade de alguém verdadeiramente comprometida com o seu trabalho e com o dever cristão.

A minha colega pós graduanda de lutas, Juliana Maria Souza de Oliveira por toda ajuda. Foi muita “sofrência”. Mas agora é só alegria. Vitória!

As residentes Naíza Abraham, Silvia Brandão, Sarah Oliveira e Thaíse Cavalcanti pelo apoio moral e boas risadas durante a maratona.

“Tudo posso naquele que me fortalece.”

Filipenses 4:13

RESUMO

A Síndrome de Sjögren (SS) é uma doença autoimune, mais comumente observada em mulheres. A etiologia por trás da SS não está completamente elucidada, mas alguns fatores ambientais como a infecção por vírus Epstein-Barr (EBV) e Citomegalovírus (CMV) são reconhecidos como influentes na condição. No presente estudo foi avaliada as características histológicas, grau de atividade inflamatória e, sobretudo escore focal de 20 biópsias de glândulas salivares menores com laudo compatível com o que se observa na SS de pacientes diagnosticados com a condição a partir dos critérios do Consenso Americano-Europeu de 2002, sendo a expressão de linfócito T verificada por imunoistoquímica (IQ) e graduada em graus 1 (até 50%), 2 (50%-75%) e 3 (acima de 75%). A presença do vírus EBV foi avaliada por imunoistoquímica e PCR e a presença do CMV por PCR. Oito glândulas satélites adjacentes a áreas de mucocele foram utilizadas como controle glandular normal. A análise histológica revelou alteração acinar (95%), infiltração adiposa (65%), fibrose (90%) e dilatação ductal (100%). Em relação ao grau de atividade inflamatória, o grau 3 foi encontrado em 50% (n=10) das amostras e grau 4 nos outros 50% (n=10). A análise do escore focal (EF) mostrou que 50% (n=10) das amostras apresentaram EF=1; 35% (n=7) apresentaram EF=2; 10% (n=2) apresentaram EF=3 e apenas 5% (n=1) apresentaram EF=4. O foco linfocitário com localização periductal foi o mais prevalente (90%; n=18), seguido do foco em região perivascular (85%; n=17) e em região periacinar (35%, n=7), sendo muitas vezes concomitante considerando essas diferentes regiões. De maneira geral, não houve predominância de linfócitos T nos focos linfocitários avaliados, pois 60% (n=12) das amostras apresentaram grau 1, 25% (n=5) apresentaram grau 2 e 15% (n=3), grau 3. Nenhuma das amostras mostrou imunoreatividade para EBV, porém no grupo controle glandular normal (12,5%, n=1) apresentaram imunoreatividade para EBV. Em relação à amplificação por PCR do EBV, 5% (n=1) das amostras mostraram positividade para os iniciadores da região EBNA1 do EBV e nenhuma das amostras mostrou positividade para CMV. Alterações histopatológicas da glândula salivar menor são frequentes em pacientes portadores de SS, sendo a presença do foco linfocitário fundamental como critério de diagnóstico da doença. Sugere-se que não há importante relação entre a presença dos vírus EBV e CMV na etiopatogenia da SS.

Palavras-chave: Síndrome de Sjögren, Epstein-Barr Vírus, CMV, Imunoistoquímica, PCR.

ABSTRACT

Sjögren's Syndrome (SS) is an autoimmune disease mostly common observed in women. The etiology of SS is not fully elucidated, but some environmental factors such viruses like EBV and CMV infection are known to influence such condition. In the present study we proposed to evaluate the histological features on 20 minor salivary glands biopsies with diagnosis suggestive of SS of patients evaluated regarding American-European Consensus Group in 2002, and the T lymphocyte expression was verified by immunohistochemistry (IH) and graded as 1 (up to 50%), 2 (50%-75%) and (over 75%). The presence of EBV was evaluated by IQ and PCR and the presence of CMV by PCR. Eight adjacent satellites glands to areas of mucocele were used as normal glandular control. Histological analysis revealed acinar alterations (95%), adipose infiltration (65%), fibrosis (90%) and ductal dilatation (100%). Regarding the grade of inflammatory activity, grade 3 was found in 50% (n=10) and grade 4 was found on the other half (n=10). Focus score (FS) analysis, 50% (n=10) of samples showed FS=1; 35% (n=7) showed FS=2; 10% (n=2) showed FS=3 and only 5% (n=1) showed FS=4. The lymphocytic foci in the periductal location was the most prevalent (90%; n=18), followed by perivascular region (85%, n=17) and periacinar region (35%, n=7). In general, there was no predominance of T cells in foci, since 60% of samples (n=12) were scored as 1, 25% (n=5) were scored as 2 and 15% (n=3) scored as 3. None of the samples showed immunoreactivity for EBV, but in control group (12,5%, n=1) showed immunoreactivity for EBV. About EBVs PCR, 5% (n=1) of samples showed positivity for EBNA1 region and none of the samples showed positivity for CMV. Histopathological changes of minor salivary gland are relatively frequent in patients with SS, and the presence of the lymphocytic foci is critical as diagnostic criteria for the disease. It is suggested that there is no significant relation between the presence of EBV and CMV virus in SS pathogenesis.

Key-words: Sjögren's Syndrome, Epstein-Barr virus, CMV, immunohistochemistry, PCR;

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Evolução imunológica de resposta a infecção viral no ambiente da glândula salivar menor no desenvolvimento da autoimunidade. Pág.19

Figura 2: Degeneração acinar. Observe a perda da morfologia piramidal das células mucosas. Seta: coloração basofílica sugerindo degeneração. Pág.51

Figura 3: Degeneração acinar. **Seta:** observe o apagamento da membrana citoplasmática. Pág.51

Figura 4: Infiltração gordurosa. Observe a presença de grupos de adipócitos no interior do parênquima glandular. Pág.51

Figura 5: Fibrose. Observe a presença de tecido conjuntivo em maior quantidade no interior do parênquima glandular. Pág.51

Figura 6: Ectasia ductal. Observe a dilatação da estrutura e proliferação do componente epitelial associada a presença de material eosinofílico amorfo no interior dos ductos. **Seta:** fibrose. Pág.51

Figura 7: Foco linfoplasmocitário periductal. Mais de 50 linfócitos agregados circundando completamente a estrutura ductal em meio a ácinos de aparência normal. Observe a proliferação do componente epitelial ductal. Pág.52

Figura 8: Foco linfoplasmocitário perivascular. Mais de 50 linfócitos agregados circundando vasos sanguíneos congestos. Pág.52

Figura 9: Foco linfoplasmocitário periacinar. Mais de 50 linfócitos agregados circundando completamente unidades acinares. Observe as alterações morfológicas degenerativas das unidades acinares envolvidas pelas células mononucleares. Pág.52

Figura 10: Predominância de linfócitos T (CD3) em até 50%. Observe as células T (CD3) marcadas em marrom pelo cromógeno em quantidade inferior a 50% do foco linfocitário que circunda a estrutura ductal. Pág.53

Figura 11: Predominância de linfócitos T (CD3) maior que 50% e menor que 75%. Observe as células T (CD3) marcadas em marrom pelo cromógeno em quantidade maior que 50% e menor que 75% do foco linfocitário que circunda as estruturas acinares. Pág.53

Figura 12: Predominância de linfócitos T (CD3) maior que 75%. Observe as células T (CD3) marcadas em marrom pelo cromógeno em quantidade maior que 75% do foco linfocitário que circunda as estruturas ductais. Observe a dilatação ductal e proliferação epitelial Pág.53

Figura 13: Controle positivo EBV (Linfoma Hodgkin). Observe a marcação em marrom pelo cromógeno indicando positividade para a presença do vírus. Pág.54

Figura 14: Marcação negativa EBV. Todas as 29 amostras do universo amostral de glândulas salivares menores com laudo sugestivo de SS apresentaram negatividade para a presença do vírus. Note a ausência de marcação em marrom em toda a estrutura glandular. Pág.54

Figura 15: Marcação positiva EBV do grupo controle. Uma amostra apresentou positividade para a presença viral. Note a marcação citoplasmática em marrom no conglomerado de células mononucleares. Pág.54

Figura 16: Gel agarose 2% ilustrando resultado da PCR – β Globina - nos casos 1 a 8. C+= controle positivo; PP= padrão de pares de base; pb= pares de base Pág.49

Figura 17: Gel agarose 2% ilustrado resultado da PCR – EBV (HSV GF/EBV R) - nos casos 1 a 8. C+= controle positivo; C-= controle negativo; PP= padrão de pares de base; pb= pares de base. Apenas a amostra de número 8 se apresentou positiva para a presença do EBV. Pág.50

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Registro das alterações histopatológicas das glândulas salivares menores de pacientes com SS. Pág. 28
- Tabela 2:** Grau de Infiltrado linfoplasmocitário de glândulas salivares menores. Pág. 30
- Tabela 3:** Pureza e quantificação de DNA. Pág. 40
- Tabela 4:** Amostras:1 a 29; concentrações entre 6,1 e 20, 9 ng/ μ L de DNA representam a mínima e a máxima. Pág. 41
- Tabela 5:** Protocolo registro de alterações histológicas das glândulas salivares menores. Pág.42
- Tabela 6:** Grau de Infiltrado linfoplasmocitário de glândulas salivares menores. Pág. 42
- Tabela 7:** Relação entre amostras analisadas e as proporções entre linfócitos X plasmócitos identificadas. Pág. 45

Tabela 8: Relação entre amostras analisadas e suas respectivas quantidades de focos linfoplasmocitários identificadas. A coluna “AMOSTRA” apresenta as amostras e suas respectivas codificações numéricas para identificação. A coluna “FOCO/QUANTIDADE” apresenta a quantidade de focos observados em cada amostra. A coluna “SCORE FOCAL” representa tal valor para cada amostra estudada segundo parâmetros de Daniels (et al., 2011).

Pág. 47

Tabela 9: Análise semiquantitativa de porcentagem de Linfócitos T segundo Ogbureke et al., 2007.

Pág. 48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg : micrograma

μl : microlitro

μm : micrometro

$^{\circ}\text{C}$: graus Celsius

aa: aminoácidos

AR: Artrite Reumatoide:

aSS: Síndrome de Sjögren Associada

DAB: diaminobenzidina

DNA: do inglês "desoxyribonucleid acid" ou ácido desoxirribonucléico

dNTP: deoxinucleotídeos trifosfato

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

EBV: Epstein-Barr Virus

LES: Lúpus Eritematoso Sistêmico

mM: milimolar

mm^2 : milímetro quadrado

mL: unidade de medida eme-ele

pSS: Síndrome de Sjögren Primária

PBS: do inglês "phosphate buffered saline" ou tampão fosfato-salino

PCR: do inglês "Polimerase Chain Reaction" ou Reação da Cadeia Polimerase

pmol: picomol

SS: Síndrome de Sjögren

TEB: solução tampão composta por uma base Tris, ácido bórico e EDTA

TRIS-HCL: do inglês "(hydroxymethyl) amino methane hydrochloride" ou tris(hidroximetil) aminometano hidróclorido

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	5
2. REVISÃO DE LITERATURA	7
2.1 SS: Histórico.....	7
2.2 SS: Aspectos introdutórios.....	8
2.3 SS: Diagnóstico.....	10
2.4 SS: Histopatologia.....	10
2.5 SS: Mosaico de etiologia.....	12
2.6 SS: Meio ambiente – agentes virais e modelos imunológicos.....	14
2.7 SS e EBV.....	15
2.8 SS e CMV.....	21
2.9 SS Fatores imunológicos.....	23
3.OBJETIVO	26
4.MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1 Obtenção dos espécimes.....	27
4.2 Histologia da glândula salivar menor.....	28
4.3 IQ para linfócito T e EBV.....	32
4.3.1 Desparafinização.....	33
4.3.2 Recuperação/reativação antigênica.....	33
4.3.3 Bloqueio da peroxidase endógena.....	34
4.3.4 Bloqueio das proteínas endógenas.....	34
4.3.5 Incubação do anticorpo primário.....	34
4.3.6 Incubação do anticorpo secundário e polímero.....	34
4.3.7 Desidratação dos cortes e montagem das lâminas.....	35
4.3.8 Instrumento de coleta de dados IQ.....	35
4.3.9. IQ do grupo controle.....	35
4.4 Extração do DNA e reação em cadeia da polimerase (PCR).....	36
4.4.1 Preparação dos blocos de parafina.....	37
4.4.2 Desparafinação.....	37
4.4.3 Extração do DNA propriamente dita.....	37
4.4.4 Uso da RNase.....	38
4.4.5 Purificação do DNA.....	38
4.4.6 Lavagem do DNA.....	39
4.4.7 Eluição do DNA.....	39
4.4.8 Quantificação e Pureza do DNA.....	39
4.4.9 Preparação do MIX e PCR propriamente dito.....	41
4.4.10 Eletroforese em gel de agarose 2%.....	43
4.5 Instrumento de coleta de dados de prontuário.....	43
5. RESULTADOS	44
6. DISCUSSÃO	55
7. CONCLUSÕES	66
8 REFERÊNCIAS	67
ANEXOS	77

1. INTRODUÇÃO

A Síndrome de Sjögren (SS) é uma desordem autoimune, crônica, inflamatória, sistêmica com etiologia multifatorial que tem como órgãos-alvo glândulas exócrinas, principalmente as glândulas lacrimais e salivares, causando sintomas de xerofthalmia e xerostomia, respectivamente. Acomete classicamente mulheres em proximidade com a menopausa (proporção de 9:1 em relação a homens). Sintomas sistêmicos podem ocorrer, acometendo rins, pele, tireóide, músculos, articulações, trato gastrointestinal, pulmões e diversos outros epitélios, além de risco maior de linfoma. Por isso seu manejo requer atenção pormenorizada e envolvimento multidisciplinar, principalmente por reumatologistas, oftalmologistas e cirurgiões dentistas (Daniels et al., 2011).

É uma condição de diagnóstico complexo, pois não existe teste específico como critério seguro para sua identificação. Sendo assim, uma série de informações clínicas/laboratoriais tem sido utilizadas para construir suas bases diagnósticas (Vitali et al., 2002). A histopatologia a partir de biópsias de glândula salivar menor, associada a outros critérios sistêmicos, é de suma importância para o fechamento multidisciplinar do diagnóstico da SS. Apesar das controvérsias ainda existentes em relação ao diagnóstico da SS, os critérios do Consenso Americano Europeu (Vitali et al., 2002), ainda são amplamente utilizados e reconhecidos. Segundo esse Consenso, a avaliação histopatológica é feita com base na presença de sialadenite linfocítica focal na forma de um aglomerado de pelo menos 50 linfócitos ao redor de ductos, (foco), bem como na quantificação desses focos (score focal) em 4 mm² de tecido glandular. No entanto, é importante o estudo mais detalhado de todas as alterações estruturais do parênquima glandular, como dilatação ductal, atrofia acinar.

Assim, acredita-se que tal estudo mais estendido de glândula salivar em pacientes com SS tem importância no contexto de uma investigação mais aprofundada dessas alterações que apenas a avaliação do foco linfocitário. Nesse sentido, uma de nossas hipóteses é de que essas alterações histológicas também estejam relacionadas à exposição a certos vírus e auto-antígenos.

Apesar dos avanços tecnológicos disponíveis, a etiologia da SS permanece desconhecida e várias hipóteses já foram levantadas na tentativa de esclarecer a complexidade de sua etiologia bem como os mecanismos de atuação do sistema imune. O distúrbio imune tem fatores intrínsecos (genéticos e hormonais) e extrínsecos, sendo que infecções virais persistentes em epitélio são citadas como possíveis elementos desencadeantes e mantenedores. Há indícios da participação do vírus Epstein-Barr (EBV), que é linfotrópico - e eventualmente epiteliotrópico - e mantêm-se em latência por toda a vida do hospedeiro. Nesse sentido, seria interessante observar se existe presença do vírus EBV diretamente na glândula salivar menor de pacientes com SS circunstanciando a hipótese de um gatilho viral para a doença.

Com base no exposto, esta pesquisa teve por objetivo analisar qualitativamente e semiquantitativamente as alterações histopatológicas das glândulas salivares menores de pacientes com SS bem como predominância de linfócitos T e plasmócitos e relacioná-las à presença dos vírus EBV e CMV. através da técnica de imunistoquímica e PCR e do vírus CMV somente através da PCR .

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Síndrome de Sjögren: um breve histórico

A primeira descrição a respeito da condição xerostomia registrada na literatura médica foi feita por Hadden (1888) e ao longo de vinte e cinco anos a partir de tal marco outras descrições semelhantes surgem pontualmente associadas a um componente lacrimal (MIKULICZ, JH., 1892), sua origem sistêmica (COUGEROT A., 1925) e sua proximidade entre outras condições imunes como a ceratite filamentosa e Artrite Reumatoide (AR) (MULOCK H. AW.,1927).

Apenas em 1933, o oftalmologista Henrik Sjögren realizou o primeiro estudo extensivo sobre tal condição, onde estabeleceu a existência de uma síndrome cujos componentes principais eram ceratoconjuntivite seca, atrite, boca seca, com ou sem a associação de aumento de glândula salivar.

Ao longo do século XX ainda observou-se incompreensão sobre o trabalho do oftalmologista sueco e a condição descrita no século XIX por Mikulicz. Schaffer e Jacobson (1927) estabeleceram diferenças a partir da associação entre algumas condições sistêmicas relacionadas ao quadro descrito por Mikulicz, ainda em 1892. Já na segunda metade do século XX, Morgan e Castleman (1953) afirmaram que a Doença de Mikulicz e a SS seriam na realidade a mesma entidade, enquanto que um ano antes (1952) Goldwin, e Gleeson em 1986 estabeleceram nominalmente de “*lesão linfoepitelial benigna*” as alterações parenquimais por conta dos achados histopatológicos de infiltração linfocítica, atrofia acinar, e alterações ductais císticas e/ou sólidas.

A SS é classificada como primária quando surge isoladamente e como secundária quando está associada a outra doença reumatológica como o Lúpus eritematoso sistêmico (LES) ou Artrite Reumatoide (RA). Vitali e colaboradores em 2002 estabeleceram critérios sólidos recentes para diagnóstico da condição baseados em uma série de critérios subjetivos e objetivos.

Atualmente, o interesse pela condição de Mikulicz se reascendeu a partir de Yamamoto e colaboradores 2005, na qual os autores descrevem sete pacientes com diagnóstico de Doença de Mikulicz (DM) de acordo com os seguintes critérios: inchaço persistente por mais de três meses de glândula salivar maior e/ou glândula lacrimal, infiltrado mononuclear proeminente em glândula lacrimal ou glândula salivar, com fatores de exclusão para sarcoidose, e doença linfoproliferativa, altos níveis de IgG4, associação com doenças IgG4 reativas em mais de 50% dos casos e plasmócitos IgG4+ em glândula salivar, ausência de anticorpos anti-Ro e anti-La, sugerindo assim que a DM seria uma condição autoimune IgG4 relacionada.

2.2 Síndrome de Sjögren – Aspectos introdutórios

A SS é uma desordem auto-imune, inflamatória, crônica e multissistêmica que afeta principalmente as glândulas salivares e lacrimais, resultando em xerostomia e xerofthalmia. No entanto, há também o envolvimento de tecidos extraglandulares, com manifestações articulares, cutâneas, pulmonares, gastrintestinais, renais, circulatórias, neurológicas e entre outras, o risco aumentado de linfoma, o que justifica a necessidade de assistência multidisciplinar (principalmente reumatologistas, oftalmologistas, estomatologistas e patologistas bucais) (Ebert E.C., 2012; Felberg et al., 2006; Fernandes et al., 2010;

Kronbichler et al., 2013; Missala et al., 2012; Moraes et al., 2010; Scofield et al, 2012; ZezoneE et al, 2012).

Existem duas formas de SS, a forma primária (pSS) que ocorre isoladamente, e a secundária, aqui chamada de associada (aSS) pois ocorre em associação com outras doenças auto-imunes como Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES), Artrite Reumatoide (AR) e esclerodermia (Felberg et al., 2006; Fernandes et al., 2010; Moraes et al., 2010; Jin Jo et al., 2013).

A frequência da SS tem sido estimada, mundialmente, em uma variação de 0,2% a 3%, podendo ocorrer em qualquer idade e principalmente em mulheres após a menopausa, com uma proporção mulher-homem de 9:1 (Albuquerque et al., 2008; Gomes et al., 2010; Moraes et al., 2010; Neville et al., 2009; Mavragani; Moutsoupoulos, 2010) o que corrobora com Jin Jo et al (2013) onde tais autores declaram que - a respeito da importância da SS - estudos sobre sua prevalência mostram resultados que variaram de 0,04% a 4,8 e que a doença autoimune é uma das mais prevalentes nos EUA, onde cerca de 2 milhões a 4 milhões de pessoas são afetadas pela condição (90% são mulheres). Tais diferenças numéricas entre os estudos sobre prevalência da condição podem ser explicadas pelo uso de diferentes critérios diagnósticos, exames e valores de referência para avaliar a disfunção das glândulas lacrimais e salivares. Outra razão poderia ser o fato de que muitos estudos foram realizados em países diferentes, inclusive alguns em populações específicas (Valim et al., 2013).

2.3 Síndrome de Sjögren: Diagnóstico

Não existe teste diagnóstico específico que identifique a SS. Diante da generalidade de seus sinais e sintomas, o diagnóstico é dado por uma pontuação que leva em conta as manifestações clínicas, os achados histopatológicos e os resultados de exames sorológicos, baseado no critério da classificação revisado pelo Grupo de Consenso Americano- Europeu, em 2002 (Barros, 2010; Tincani et al., 2013; Vitali et al., 2002). Além de tal classificação, ainda em 2012 surgiu uma classificação baseada em três critérios puramente objetivos proposta pelo American College of Rheumatology (ACR): Ceratoconjuntivite seca (SCORE 3), avaliação histopatológica de glândula salivar menor e presença sorológica de anti – SSA/Ro/ ou anti – SSB/La. A avaliação histopatológica de glândula salivar menor representa um dos exames mais importantes para o diagnóstico do componente oral da SS, ao caracterizar o grau de comprometimento glandular causado pela reação inflamatória (Barros, 2010; Neville et al., 2009; Moraes et al., 2010; Tincani et al., 2013; Vitali et al., 2002), cujo resultado pode estar relacionado com a gravidade da doença.

2.4 Síndrome de Sjögren: Histopatologia glandular, implicações clínicas e papel do Cirurgião-Dentista

A infiltração inflamatória crônica no interior das glândulas exócrinas – em sua maioria constituída de linfócitos T e B – é o achado histopatológico característico da SS. Tal condição pode ser observada nas células glandulares epiteliais em apoptose e aparentemente o processo é mediado por citocinas inflamatórias das células T helper tipo-1. Essa disfunção imune é orquestrada por fatores genéticos, citocinas, por vírus e condições

hormonais. O “quadro” histopatológico observado pelo patologista na SS é a sialadenite crônica periductal, onde em seu estágio inicial observa-se agregados de linfócitos focais nos lóbulos glandulares nas regiões inter e intralobular dos ductos, e subsequentemente tal evento provoca a involução atrófica dos ácinos, com posterior disseminação linfocitária das regiões periductais em direção aos ácinos, tendo como resultado final uma infiltração difusa com perda de arquitetura tecidual glandular. Ainda, a ação linfocitária inicia danos nos ductos com a formação de lesões mioepiteliais e deposição de material hialino no lume. Entretanto, deve-se destacar que tal quadro não é patognomônico da SS, podendo ser encontrado em condições onde não existem indicativos clínicos e sorológicos positivos para a SS (Tincani et al., 2013).

No exame histopatológico das glândulas salivares menores do portador de SS, os principais achados incluem infiltração linfocitária com 50 ou mais linfócitos em pelo menos 4 mm² de tecido glandular (linfócitos T CD4+ e células B), ilhotas de células mioepiteliais formadas a partir do epitélio ductal, atrofia acinar e obstrução gradual da luz dos ductos (Vitali et al., 2002; Daniels et al., 2011). Ocorre subsequente destruição dos tecidos o que leva à disfunção da glândula (Barbieri et al., 2009; Gomes et al., 2010). Merece menção que Scott em 1980 obsevou em um estudo de 70 necrópsias que 25% das glândulas salivares menores analisadas apresentaram focos linfocitários sugerindo que os mesmos não estão relacionados exclusivamente com doenças reumatológicas.

A xerostomia é considerada a principal manifestação oral da SS. A redução da secreção salivar altera a composição e viscosidade da saliva e a microbiota oral, ocasionando uma série de sintomas como, queimação oral, dificuldade em deglutir e falar, mucosite, disgeusia, ulcerações, infecções oportunistas, cárie dental, doença periodontal,

tumefação das glândulas parótidas, perda de dentes, despilação e fissuras linguais (Albuquerque et al., 2008; Barros, 2010; Fernandes et al., 2010; Moraes et al., 2010).

O cirurgião dentista tem importante papel no estabelecimento do diagnóstico da SS, bem como no seu tratamento, pois pode ser o primeiro profissional da saúde a identificar os sinais e sintomas dessa síndrome e pode atuar também minimizando o seu impacto sobre a saúde bucal, de maneira a proporcionar alívio dos sintomas e reintegração da qualidade de vida aos pacientes, já que a SS não tem cura (Barros, 2010; Sasaki et al., 2006; Albuquerque et al., 2008; Corominas et al., 2008; Gomes et al., 2010; Larrarte, 2010).

2.5 Síndrome de Sjögren: Mosaico de etiologia

Apesar dos avanços tecnológicos disponíveis, a etiologia da SS permanece desconhecida. Várias hipóteses foram levantadas na tentativa de esclarecer a complexidade de sua etiologia. Nesse aspecto, fatores genéticos, endócrinos, imunológicos e ambientais, como agentes biológicos, têm sido relacionados (Barros, 2010; Margaix-Munoz et al., 2009; Neville et al., 2009; Roescher et al., 2009; Tincani et al., 2013).

Sobre tal assunto, Tzioufas et al (2012) estabelece o epitélio das glândulas salivares, como participante na iniciação e perpetuação da resposta autoimune local por sua capacidade de mediar o recrutamento, direcionamento, ativação, proliferação e diferenciação de células de defesa. Manoussakis et al (2007) em pesquisa com culturas de células epiteliais de glândula salivar demonstra que tais células demonstraram expressar várias moléculas imunoativas tanto por ação constitutiva quanto por indução expressa por vários fatores iniciadores tais quais moléculas apresentadoras de antígeno (MHC classe I e II), moléculas de adesão (CD54/ICAM-1), bem como citocinas pro inflamatórias (TNF alfa,

IL 1, e IL 18), moléculas coestimulatórias (B7) e quimiocinas (CCL4/MIP-1b, CXCL13/BCA-1, CCL20/LARC), sendo assim equipadas para apresentação de peptídeos antigênicos e transmissão de sinais para as células T além da indução de resposta imune inata no reconhecimento de patógenos estranhos através da expressão de receptores TLR-2, 3 e 4.

Células ductais cultivadas *in vitro* mantém esse padrão “ativado” por longo tempo, demonstrando que o estado de ativação é um fenômeno intrínseco à célula e não reativo ao milieu de citocinas. Micro-array de cDNA demonstraram atividade de genes induzidos por interferon, fatores de transcrição de interferon (IRFs) e receptores do tipo toll sensíveis a ácidos nucleicos virais (TLR3 e TLR9), elementos que poderiam estar na origem do processo de ativação. Não se sabe qual a origem primária dessas alterações, mas é plausível que a presença e persistência de vírus intracelular seja o desencadeador e perpetuador do processo (Manoussakis; Kapsougeorgou, 2010).

A respeito da genética e SS, Baodong et al (2013) relata entre 30% e 35% de familiares de indivíduos com SS apresentam doença autoimune. Além de alguns fenótipos HLA (Tzioufas et al., 2012) o envolvimento de condições como polimorfismos no cromossomo 1 e 6 onde genes codificam citocinas - como IL 10 e TNF alfa estão envolvidos no desenvolvimento da SS (Hajeer et al, 2000; Tzioufas et al., 2012; Baodong et al., 2013).

Assim, na SS observa-se forte associação com moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) de classe 2 - HLA-DRB1*1501/*0301/DQA1*0501 em europeus, e outros haplótipos em populações de diferente ancestralidade (Cobb et al, 2008). Observa-se que a associação de determinados haplótipos faz-se não só com a doença em si, mas também com autoantígenos específicos como Ro/La. Admitindo-se que produção de

autoantígenos seja um fenômeno ubíquo, associado à formação de blebs apoptóticos, tem-se que o desenvolvimento da doença será restrito a indivíduos geneticamente predispostos, com moléculas apresentadoras de antígeno (HLA) que interajam de forma especial com os autoantígenos produzidos em cenário fisiológico (apoptose do remodelamento) ou em cenário patológico (apoptose por estresse celular, incluindo persistência viral) (Rosen & Casciola-Rosen, 2004).

2.6 Meio ambiente e Síndrome de Sjögren: agentes virais – modelos imunológicos infecciosos e doenças autoimunes

Os agentes biológicos possivelmente são atuantes como desencadeadores da SS e podem contribuir para perpetuar a atividade autoimune. Shoenfeld et al., (2008) declara que muito provavelmente os agentes infecciosos virais são os mais importantes relacionados ao meio ambiente. Ainda segundo o autor, existem cinco mecanismos os quais podem levar uma infecção a desencadear uma doença autoimune. O primeiro é o do “mimetismo molecular”, onde o agente infeccioso expressa um epítipo que é estruturalmente similar a um autoantígeno. O segundo é um fenômeno conhecido como “*spreading*” onde uma ativação local exagerada de células apresentadoras de antígeno devido a um estado inflamatório provoca o super processamento e a super apresentação de antígenos que promovem a formação de grande quantidade de células T com grande diversidade de especificidades. O terceiro refere-se a “ativação policlonal”, um mecanismo que responde por um estímulo de células B, onde as mesmas sofrem proliferação e produzem exacerbadamente anticorpos que geram complexos imunes que causarão dano nos tecidos. O quarto mecanismo – “*a ativação bystander*” – descreve uma situação onde a grande

produção de citocinas induz a expansão de células T autorreativas que antes eram insuficientes para produzir uma doença autoimune. Finalmente o quinto mecanismo - o dos “*super antígenos*” – onde vírus (ou bactérias) podem possuir a habilidade de se unir a várias cadeias de receptores beta das células T bem como também a uma grande variedade de moléculas MHC – Classe 2, o que lhes permitirá se ligar a uma grande variedade de células T independentemente de sua especificidade, induzindo assim tal evento a uma reação autoimune.

A respeito do assunto, a literatura tem demonstrado que os vírus Epstein-Barr (EBV), o citomegalovírus (CMV), a Hepatite C (HCV), o eritrovírus-B19 (também chamado parvovírus-B19), o vírus Coxsakie, o HTLV-1/2 (Human T lymphotropic virus), e o HIV, além de certos retrovírus endógenos simulam ou estimulam a expressão de auto-antígenos (Ro, La) (Aragona et al., 1999; Abe et al., 1999; Triantafylopoulou & Moutsopoulos, 2007; Shienfeld et al., 2008; Albuquerque, 2008; Margaix-Munoz et al., 2009).

2.7 EBV e Síndrome de Sjögren

O vírus EBV é um γ herpesvirus ubíquo e cosmopolita responsável pela mononucleose infecciosa e presente em cerca de 90% da população mundial com tropismo epitelial e linfocitário que se replica em glândula salivar e no tecido orofaríngeo bem como células B durante seu contato primário com o organismo humano através da saliva, permanecendo em estágio de latência durante toda vida do indivíduo posterior a infecção primária (Bras-Silva, 2009).

A invasão viral ocorre nas células B de memória através da adsorção do vírus aos receptores CD21 de superfície celular e no coreceptor de superfície MHC-II pela glicoproteína do envelope viral gp350-220 que interioriza o vírus por endocitose levando-o até o núcleo celular assumindo uma estrutura episomal. A reativação viral implica na liberação de vírions que infectarão secundariamente células epiteliais da orofaringe. A infecção é usualmente assintomática e persistente, permanecendo inativa nas células B de memória. O processo de replicação viral transforma os Linfócitos B em células linfoblastoides em permanente crescimento que começam a expressar genes do ciclo de latência (seis antígenos nucleares: EBNA1, EBNA2, EBNA3, EBNA3C e EBNA-LP) e proteínas de membrana latente (LMP1, LMP2A e LMP2B) que juntos expressam RNAs não codificantes (EBER1 e EBER2) e duas pequenas sequências de RNAs (EBER1 e EBER2) que cooperam para tal transformação celular proliferativa contínua associada ao EBV também na sua fase produtiva (esta regulada pela proteína BZLF1 –ZEBRA que age na ativação-gatilho viral, estimulando a BHRF1 que regula a produção de DNA polimerase viral e timidase quinase, responsáveis pela replicação do DNA viral e proteínas tardias estruturais dos vírions como a VCA e a glicoproteína de envelope gp350-220) de modo que tal evento pode ser considerado um fator de risco para a malignização linfocítica por sua capacidade de estabelecer aumento populacional de células linfoblásticas figurando como fator de risco para neoplasmas como o Linfoma de Burkitt e outros linfomas em estados de imunodeficiência, além do desenvolvimento de doenças autoimunes como LES e AR, Esclerose Múltipla, SS, Tireoidite autoimune, Hepatite e Doença de Kawasaki (Venables et al., 1989; Shoenfeld et al., 2008; Munz et al., 2009; Roew, et al., 2009; Inoue et al., 2012;).

Também é sabido que o vírus EBV induz resposta exacerbada de células T, fato este contribuinte para alterações histológicas glandulares por conta da infecção viral (Wen et al., 1996). Além de raramente infectar células T e NKCs em pacientes com doença crônica ativa do EBV (Fox et al., 2001), a qual ainda não está esclarecida sua patogênese, já que ambas linhagens celulares não possuem usualmente receptores CD21.

A literatura demonstra certa controvérsia sobre o sítio celular primário de infecção do EBV. Crawford et al. (2001) apresentaram um modelo onde o vírus infectaria primeiramente o epitélio em regiões mais diferenciadas persistindo na camada basal, sendo a infecção dos linfócitos B um evento secundário.

Entretanto, estudos mais recentes demonstram que na realidade o sítio celular primário de infecção do vírus EBV é o linfócito B. Pacientes com mononucleose infecciosa apresentam infecção de linfócito B isoladamente ao epitélio não infectado da orofaringe, o que sugere que tais células de defesa das tonsilas possam ser o sítio primário de infecção viral (Hudnal et al., 2005).

Quanto às doenças da autoimunidade, seguindo Shoenfeld et al (2008) infecção por vírus EBV é até agora, a mais bem estabelecida relação entre uma infecção viral e o desenvolvimento de uma doença autoimune de acordo com sua atividade epitelial/linfocitária. A melhor compreensão dessa relação está no papel do EBV e o LES. Algumas explicações têm sido dadas para essa interessante associação, sendo o mimetismo molecular entre o antígeno nuclear -1 do EBV e os anticorpos lúpus-específicos como os anti DNA e os anti-Ro e anti-La a ideia mais consistente. De maneira interessante, Lerner et al (1981) demonstraram dois micro RNAs (EBER1 e EBER2) formando complexos com proteínas precipitadas de auto anticorpos anti-La, este presente no LES e na SS.

Rivera e colaboradores (2003) investigaram a possibilidade de participação do vírus EBV em doenças de glândulas salivares por conta de sua presença no local. Estudos tem demonstrado a presença de antígenos e DNA viral na glândula relacionando a presença circunstancial do vírus EBV com a SS (Venables et al., 1989; Mariette et al., 1991; Karameris et al., 1992; Maitland & Scully, 1994; Rivera et al., 2003; Barzilai et al., 2007).

A infecção por vírus EBV tem sido associada com a SS, tanto em relação à carga viral quanto a produção de proteínas (EBNA, VCA, EA) em indivíduos portadores da condição, bem como o risco aumentado em 5% de surgimento de linfoma MALT em glândula salivar ou do tipo Não-Hodgkin (Fox et al., 1986; Miyasaka et al., 1989; Saito et al., 1989; Inoue et al., 1991; Mariette et al., 1991; Pflugfelder et al., 1993; Toda et al., 1994; Wen et al., 1996; Pasoto et al., 2013). A respeito do assunto Luchese (et al., 2013) contemporiza o seguinte cenário ilustrado pela figura a seguir:

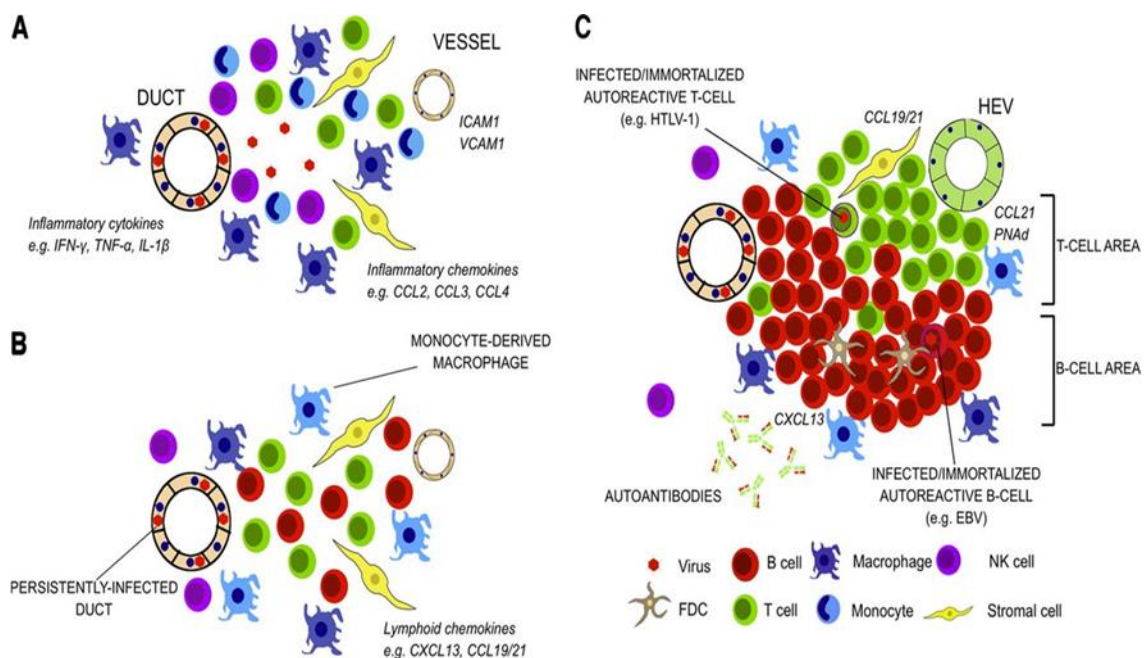


Figura 1: Evolução imunológica de resposta a infecção viral no ambiente da glândula salivar menor no desenvolvimento da autoimunidade. Fonte: Luchese et al., Volume 94, Dec. 2013 JLB

Através do esquema acima pode-se observar um modelo no qual a infecção viral induziria a ativação epitelial assim como células estromais e macrófagos residentes, ativando a produção de quimiocinas inflamatórias e expressão de moléculas de adesão nos vasos sanguíneos, recrutando de regiões periféricas células do sistema imune inato para o interior da glândula salivar menor. As quimiocinas inflamatórias atrairiam monócitos e na primeira semana da infecção, as células T agiriam secretando citocinas (IFN- γ , TNF- α , IL-1 β) que por sua vez ativariam NKCs residentes e macrófagos gerando uma resposta antiviral de células Th1. Entretanto, apesar de tal resposta ser potente em indivíduos imunocompetentes, vírus como o CMV e o EBV conseguiriam escapar da resposta imune, levando assim a uma infecção persistente, preferencialmente nas células epiteliais dos ductos. Essa estimulação antigênica crônica levaria a alterações genéticas por conta da prolongada interação entre indutores e células, ativando a produção de quimiocinas linfoides como CXCL13, CL1 e CL21 pelas células estromais e monócitos através do aumento populacional de células T e B no interior da glândula. Esse ambiente seria propício para a organização de um centro germinativo linfoide ectópico onde as células T se concentrariam no interior de tal estrutura, e as células B em sua periferia. Em tal cenário, a infecção viral modularia a resposta das células B e T, promovendo sua autoreatividade e sobrevivência, favorecendo assim seu crescimento populacional onde o desfecho seria a infiltração linfocitária lobular glandular e possível surgimento de neoplasia linfoide (LUCHESE, et al., 2013).

Mariette e colaboradores (1991) através da técnica de hibridização *in situ* utilizaram o fragmento BamH1-W de DNA do EBV em biópsias de glândula salivar menor de lábio inferior de 14 pacientes com SS (8 com SS(p) e 6 com SS(a)) e 39 de pacientes-controle para investigar o genoma viral em pacientes com a condição. Como resultado, os autores

detectaram a presença de DNA do EBV nas células epiteliais ductais em 4 de 8 pacientes com SS(p) (50%), e em nenhum paciente com SS(a) e 3 de 39 pacientes-controle (8%). O tratamento estatístico do estudo apresentou a diferença percentual entre pacientes com SS(p) e pacientes-controle como estatisticamente significativa ($p < 0,02$), sugerindo que o vírus EBV desempenha papel na patogênese da condição. Do mesmo modo, o estudo de Karameris et al (1992) com 23 biópsias de glândula salivar menor retiradas de lábio inferior realizadas em 23 pacientes com SS (todas associadas a AR), 11 de pacientes com ceratoconjutivite seca associadas a AR (sem diagnóstico de SS) e 7 de pacientes-controle demonstrou através da técnica de Hibridização *in situ* utilizando o fragmento BamH1-V (W) viral demonstrou presença do DNA do vírus EBV em células epiteliais ductais em 16 indivíduos com SS, em 3 pacientes com AR e ceratoconjutivite seca e em nenhum dos pacientes-controle. Ainda tal estudo demonstrou maior frequência de presença do genoma viral em áreas nas zonas de destruição do parênquima glandular e em lesões linfoepiteliais, evidenciando a também a sugestão da participação do vírus EBV na patogênese da SS.

Pflugfelder e colaboradores (1993) identificaram o DNA do vírus EBV em glândulas lacrimais de indivíduos com SS. Proteínas virais expressadas na fase lítica e latente da infecção por vírus EBV foram detectadas nessas estruturas através da imunistoquímica e áreas com linfócitos B e células epiteliais em tecido glandular lacrimal também indicando possível participação do EBV na SS.

Por outro lado, a associação entre HIV e certos vírus de DNA, incluindo o vírus EBV, tem sido relatada na literatura (Telenti et al., 1993; Cisterna et al., 1995), sendo o vírus EBV ainda implicado na patogênese de malignidades linforreticulares, especialmente no contexto da imunossupressão causada pela infecção do HIV (Dolcetti et al.1995; Ioachim et al., 1998). Alguns mecanismos têm sido associados com a indução de autoimunidade

pelo vírus EBV. A infecção viral influencia o sistema imune do hospedeiro tanto diretamente (através da infecção de vários linfócitos resultando em sua proliferação policlonal, aumento de produção de anticorpos e formação de complexos imunes) quanto indiretamente (pela expressão de proteínas imunomoduladoras). Tais eventos culminariam em supressão de apoptose nos linfócitos infectados e consequente perda de tolerância imunológica (Henderson et al., 1993; Kanegane et al., 1997; Wucherpfenning et al., 2001; Gross et al., 2005;).

É relatado ainda que o RNA codificado pelo vírus EBV ativa receptores inatos (TLR-3) com produção de α INF e síntese das citocinas atuantes na patogenia da SS. Dessa forma, o vírus EBV pode aumentar a autoreatividade contra a ribonucleoproteína La (SSB) frequentemente encontrada no LES e na SS (Wucherpfenning et al., 2001; Iwakiri et al., 2010). O mimetismo molecular é um mecanismo adicional no estabelecimento de perda de tolerância imunológica. Tem sido demonstrado que a proteína EBNA-1 pode produzir reação cruzada com o autoantígeno direcionado à ribonucleoproteína Ro (SSA) (Poole et al., 2008).

2.8 CMV e Síndrome de Sjögren

Em seu artigo de revisão sobre o vírus CMV e sua possível participação em doenças autoimunes, Halenius e colaboradores (2014) relatam que tal vírus representa um membro patogênico do subgrupo β da família *herpesvirus*. Várias características como replicação lítica em diversos tecidos, persistência através de períodos de latência e reativação intermitente, extraordinário proteoma e manipulação extensiva da imunidade inata e

adaptativa fazem do vírus CMV extremamente bem adaptado às condições biológicas do seu hospedeiro humano. Como todos os membros da família *herpes*, o vírus CMV possui um genoma de cadeia dupla de DNA e tem uma capacidade formidável de codificar mais de 750 proteínas virais incluindo mirRNAs nas células infectadas. Isso reflete seu poder excepcional de manipular e lidar com o seu hospedeiro. É um vírus ubíquo na população humana, e em populações adultas pode estar presente em até 99% da população adulta dependendo da etnia e condições socioeconômicas. A infecção primária normalmente acontece silenciosamente. Após tal evento, o vírus CMV permanece em estado de latência nas células progenitoras mieloides CD34+, podendo ocorrer posterior reativação e replicação viral. Apesar do sistema imune de um indivíduo saudável poder controlar a replicação viral, sua eliminação não é possível pelo sistema imune, nem através de terapia antiviral. Em indivíduos imunossuprimidos, o vírus CMV pode realizar infecções oportunistas severas o que eventualmente leva a um evento fatal. Achados clínicos como fadiga, hepatite, enterocolite, encefalite, pneumonia são comuns em indivíduos com distúrbios imunológicos supressores infectados por vírus CMV. Pacientes HIV positivos apresentam também falha produtora na medula óssea bem como a infecção congênita por vírus CMV é causa de perda auditiva neurosensorial em infantes.

O controle imune da infecção primária e latente do vírus CMV é organizado de maneira hierárquica, com papel proeminente de Interferon dos tipos I e II, NKCs, CD8+, CD4+, linfócitos T, enquanto anticorpos antivirais são essenciais para restringir a disseminação de recorrência. O vírus CMV consegue realizar constantes modificações nas populações de células do sistema imune competente. Uma característica peculiar do vírus CMV é a constante expansão de linfócitos TCD8+ através de seus epítomos prevalecendo

em células TCD8+ de memória (elas podem representar cerca de 20% do total de células TCD8+ circulantes). Ainda, uma alta frequência de células TCD4+ específicas podem ser observadas em indivíduos soropositivos. Ademais, expansão de NKC's expressando CD94/NKG2C também pode ser observado.

Uma vez infectada, as células passam a ser controladas pelo vírus CMV, expressando inúmeras proteínas sinalizadoras, reguladoras do ciclo celular, apoptose, apresentadoras de antígeno, entre outras. Até agora, a compreensão do vírus CMV na resposta das células T, NKC's, receptores de Interferon, é apenas a “*ponta do iceberg*” do que tal vírus é capaz de realizar em interação com o sistema imune humano.

O papel do vírus CMV na patogênese início do evento de autoimunidade tem sido discutido pela comunidade científica. Por todas as suas características apresentadas, tal vírus é também um forte agente biológico no envolvimento de doenças autoimunes. Em vista disso, seria esperado que uma alta prevalência de anticorpos do tipo IgG deva existir em pacientes acometidos por doenças autoimunes. Scully (1990) e Shillitoe e colaboradores (1982) apresentam resultados conflitantes ao tentarem relacionar a presença de anticorpos CMV positivos no sangue periférico de pacientes com SS.

2.9 Síndrome de Sjögren: Fatores imunológicos

Autoanticorpos direcionados a antígenos nucleares ocorrem comumente em doenças autoimune multissistêmicas como o LES, AR e SS. Apesar de heterogêneos, tais auto anticorpos fazem parte basicamente de dois grandes grupos – autoanticorpos de DNA e autoanticorpos de não-DNA – este último incluindo anticorpos antinucleares de antígenos

nucleares solúveis. Tais antígenos nucleares são ribonucleoproteínas (RNPs) que consistem em pequenas moléculas de RNA ligada a proteínas não-histonas e possuem três grandes categorias: o grupo U (U1 -6), o grupo Ro e o grupo La. O antígeno Ro/SSA é uma pequena proteína nucleocitoplasmática de RNA complexa, que consiste em uma proteína 60kDa que está associada com um dos quatro RNAs citoplasmáticos humanos (hY1, hY3, hY4, hY5). As funções do 60 kDa Ro e 52 kDa Ro ainda não são completamente conhecidas, apesar do conhecimento que se tem sobre o envolvimento de tais proteínas na cadeia de descarte de RNA ribossomal. O antígeno La/SSB consiste em uma proteína 48-kDa que serve como fator de terminação para o RNA polimerase III. Existe grande importância no estudo dos autoanticorpos (anti-Ro/SSA e anti-La/SSB) direcionados a essas ribonucleoproteínas, pois os tais são muito frequentes no soro de pacientes com SSp e menos frequentes na SSa (Tzioufas et al., 2002; Toker, et al., 2004).

Já o fator reumatoide (FR) e o fator antinúcleo (FAN) são mais frequentes na SSa que na SSp. Também estão circulantes no sangue periférico auto-anticorpos contra receptores muscarínicos (anti-MUC3) e contra proteínas do citoesqueleto das células acinares (anti-alfa-fodrim) (Harley et al., 1986; Felberg; Dantas, 2006).

Existem evidências na literatura de que as células linfocitárias de glândulas salivares de pacientes com SS encontram-se envolvidas com uma resposta contra as proteínas SS-A/Ro e SS-B/La. Um dos mecanismos relatados é de que as glândulas salivares menores de pacientes com SS representam um sítio de ativação de linfócitos B (LB), que se convertem em plasmócitos e produzem auto-anticorpos contra as proteínas SS-A/Ro e SS-B/La presentes no epitélio dos ácinos e ductos dessas glândulas. Linfócitos T (LT) também são atingidos, perpetuando a atividade dos LB ativados e a agressão tecidual (Tengner et al.1998; Esch, 2001; Felberg; Dantas 2006; Silveira, 2006;). De maneira mais

detalhada, essa resposta autoimune, possivelmente mantida pelo LB, estaria direcionada, sobretudo, às ribonucleoproteínas SS-A/Ro, com duas cadeias protéicas de 52 e 60 kDa (citoplasmática) e SS-B/La (nuclear) de 48 kDa (Silveira, 2006).

Possivelmente há participação secundária das células acinares em relação às ductais no estímulo ao processo inflamatório das glândulas salivares menores dos pacientes com pSS (De Wilde et al., 1996; Cuello et al., 1998; Manoussakis et al., 1999; Silveira, 2006). Estudos demonstraram uma possível redistribuição do antígeno SS-B/La para o citoplasma de células acinares das glândulas salivares de pacientes com SS (De Wilde et al 1996; Silveira, 2006), sendo que essa diferença no padrão de expressão dos antígenos não estava necessariamente acompanhada da presença de anti-SS-B/La no soro desses pacientes (De Wilde et al 1996).

Várias informações sugerem que os autoanticorpos anti SS-A/Ro e anti SS-B/La na SS representam uma resposta especificamente dirigida a esses antígenos e não fruto de reatividade cruzada a outro antígeno qualquer (Reichilin; et al., 1989; St Clair et al., 1990; Manoussakis et al., 1995; Scofield et al., 1996).

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Analisar qualitativamente e semiquantitativamente as alterações histopatológicas das glândulas salivares menores de pacientes com SS bem como predominância de linfócitos T e plasmócitos e relacioná-las presença dos vírus EBV e CMV.

3.2. Objetivos específicos

- Analisar qualitativamente a presença de alterações morfológicas acinares, presença de infiltração gordurosa, fibrose, ectasia de ductos e presença de centro germinativos;
- Analisar qualitativamente a presença de focos linfoplasmocitários e quantificá-los para calcular o escore focal;
- Analisar semiquantitativamente a predominância de linfócitos e plasmócitos;
- Analisar semiquantitativamente a predominância do linfócito T através de imunoistoquímica;
- Identificar e analisar semiquantitativamente a presença do vírus EBV através de imunoistoquímica nos casos selecionados e no grupo controle;
- Identificar a presença do vírus EBV e CMV através da PCR;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram obtidas 29 amostras de material embocado em parafina (glândulas salivares menores) com o laudo sugestivo de SS provenientes dos arquivos do Departamento de Patologia e Medicina Legal da UFAM (DPML), sendo nove descartadas conforme os critérios de exclusão abaixo, totalizando 20 amostras válidas para o estudo. A obtenção do material, sem prejuízo para os pacientes, foi autorizada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, da UFAM (CAAE:39573214.2.00000.5020/ANEXO A) e mediante a assinatura do TCLE pelos pacientes.

Critérios de inclusão:

Material parafinado de pacientes maiores de 18 anos com laudo positivo compatível com o que se observa na SS e diagnosticados a partir dos critérios do Consenso Americano-Europeu;

Critérios de exclusão:

Ausência de foco linfocitário no material analisado

Escore focal insuficiente (saber: <1);

Área glandular insuficiente (a saber: < 4mm²)

4.1 Obtenção dos espécimes

O material foi selecionado a partir de busca nos livros de registro de laudos do Departamento de Patologia e Medicina Legal da UFAM. Foram encontrados 29 laudos sugestivos de SS entre 2011 e 2014. De posse do número de registro e dos dados clínicos

dos pacientes, coletou-se os blocos parafinizados. Além disso, utilizou-se os critérios de inclusão e exclusão preconizados por Vitalli e colaboradores (2002) para seleção dos casos já previamente coletados. Então, entrou-se em contato com os pacientes para assinatura do TLCE. Em seguida, foram recolhidas amostras para realização da PCR para pesquisa do vírus EBV e vírus CMV e confecção de lâminas para técnica de imunohistoquímica para detecção do vírus EBV e linfócitos T.

4.2 Histopatologia da glândula salivar menor

Através das lâminas coradas por HE, foi feita uma análise qualitativa das alterações histopatológicas (ácinos, tecido adiposo, fibrose e ectasia de ductos, possível presença de centro germinativo) e da presença de infiltrado celular (linfócitos, plasmócitos) nas glândulas salivares menores. Esta leitura foi realizada por um patologista do DPML em microscopia óptica em cortes corados por HE e registrados na tabela abaixo, modificado a partir do protocolo elaborado por Silveira, 2006.

Ácinos		Tecido Adiposo		Fibrose		Ectasia de Ductos		CG		Infiltrado Inflamatório	
Preservado	Alterado	P	A	P	A	P	A	P	A	Células	
										Linfócitos	Plasmócitos

Tabela 1: Registro das alterações histopatológicas das glândulas salivares menores de pacientes com SS.

Legenda:

P – Presente / A – Ausente

CG – Centro Germinativo

Na análise do material histológico utilizou-se como critério de exclusão de amostras: *I- ausência de foco linfocitário; II- score focal insuficiente (a saber: < 1); III- área insuficiente (tecido glandular total com área inferior a 4 mm²)*. Também foram excluídos da análise focos plasmocitários.

A análise dos ácinos recebeu as classificações “*preservado*” e “*alterado*”. Através de análise tradicional verificou-se tais estruturas buscando identificar a sua presença e indícios de alterações morfológicas. Degeneração acinar (caracterizado por alteração de forma, zonas basofílicas indicando sinais degenerativos e apagamento dos limites da membrana citoplasmática) foram utilizados como critério de avaliação em tal quesito.

Considerou-se como positiva a presença de tecido adiposo a observação histológica de adipócitos no interior da glândula salivar menor.

Considerou-se como positiva a presença de fibrose a observação de tecido conjuntivo fibroso espessado no interior da glândula salivar. Para a ectasia ductal, considerou-se a dilatação dos ductos com ou sem a presença de material amorfo eosinofílico no interior dos mesmos.

Considerou-se a presença de centro germinativo a formação de estruturas linfoides que se assemelham a centros germinativos existentes em folículos primários de órgãos linfoides secundários. Tais centros germinativos nas glândulas salivares menores de pacientes com SS são formados por grandes agrupamentos de linfócitos B e T e conglomerados de células proliferativas semelhantes a células dendríticas foliculares.

Para graduação do infiltrado linfoplasmocitário de glândulas salivares menores, foram utilizados os critérios de Chisholm & Mason (1968), de maneira similar a utilizada por Silveira, 2006, sendo considerados para o estudo somente os graus 3 e 4. A análise histopatológica da glândula salivar menor foi considerada positiva como parte dos critérios

do Consenso Americano-Europeu para o diagnóstico da SS (Vitali et al., 2002), quando houve a presença de um ou mais “foco(s)”, definido como sendo um agregado de células inflamatórias contendo mais de 50 linfócitos, sendo o escore focal a presença de pelo menos 1 foco numa área de 4mm² (*focus score* ≥ 1). Essa graduação é importante uma vez que os graus 3 (ou 1 foco/4mm² de tecido glandular) e 4 (ou mais de 1 foco/4mm² de tecido glandular) são alterações sugestivas da SS, devendo ser analisadas em conjunto com as alterações clínicas e sorológicas do paciente de acordo com a tabela a seguir de Chisholm & Mason (1968):

Grau	Infiltrado linfoplasmocitário/4mm ² de área glandular
0	Ausência de alterações histológicas
1	Infiltrado em grau leve
2	Infiltrado em grau moderado
3	Formação de um foco
4	Formação de mais de um foco

Tabela 2: Grau de Infiltrado linfoplasmocitário de glândulas salivares menores.

Através de análise semiquantitativa observacional de patologista experiente em microscópio de luz realizou-se a contagem dos focos e fez-se a contagem do score focal a partir da seguinte fórmula: *nº de focos ÷ área da glândula x 4*. Tal fórmula é recomendada por Daniels e colaboradores(2011), sendo necessário aproximadamente de 3 a 5 glândulas salivares para análise. No presente estudo, foi utilizado *papel milimetrado* sobreposto sobre o material glandular fixado HE em lâmina de microscopia para obter a mensuração da área do material a ser analisado conforme realizado na Universidade Federal do Espírito Santo em serviço coordenado pela prof^a Dr^a Valéria Valim.

A respeito da composição do infiltrado inflamatório dos focos, realizou-se uma análise semiquantitativa proporcional quanto a presença de linfócitos e plasmócitos. Na análise, buscou-se observar a proporção entre tais células com a seguinte gradação: +(até 25%); ++(até 50%); +++(acima de 50%). Na análise do material através da imunistoquímica, observou-se a quantidade de células marcadas (CD3) seguindo a

seguinte proporção: “0=*negativo*; 1:*até 50%*; 2:*>50% porém <75%*; 3:*>75%* em semelhança ao protocolo *de Ogbureke e colaboradores (2007)* para verificar a percentagem de linfócitos T presentes. Em ambas situações utilizaram-se os aumentos de 200X e 400X.

Sobre as estruturas envolvidas no processo inflamatório, considerou-se a saber: ductos, vasos e ácinos. Para categorização dos dados em nossa análise, indicamos que o infiltrado linfoplasmocitário deveria estar circundando em sua totalidade tais estruturas.

4.3 Imunoistoquímica (IQ) para linfócito T e EBV

As reações imunoistoquímicas foram realizadas no Laboratório de Imunoistoquímica da Fundação Medicina Tropical: Heitor Vieira Dourado, com o auxílio do técnico Carlos Melquias Melquior realizando-se cortes de cada bloco, em micrótomo, de 4 µm cada sendo estes montados em lâminas silanizadas para a realização da técnica de imunoistoquímica. Os anticorpos utilizados estão descritos a seguir:

Linfócito T: Anticorpo antiCD3 (Monoclonal Mouse Antibody), marca NovocastraTM (LeicaBiosystems Newcastle), clone LN10. Código do produto (NCL-LCD3- 565). Diluição de 1:200 (1 µL de Ac CD3 para 200 µL de BSA 0,1%). A escolha dessa diluição foi feita após testes prévios realizados em tonsila com diluições de 1:100, 1:200, 1:500 e 1:1000.

O controle positivo para as reações foram amostras de amígdala humana.

EBV: Anticorpo monoclonal anti-LMP-1 Novocastra TM (LeicaBiosystems Newcastle) diluído 1:400 conforme protocolo da instituição contendo o anticorpo secundário biotilado e o conjugado de streptavidina e peroxidase. A revelação foi realizada através da solução cromógena (HI DEF[®]) e a contra-coloração realizada com

hematoxilina de Harris. O controle positivo desta etapa foi um Linfoma de Hodgkin sabidamente EBV positivo através de imunistoquímica prévia. Para investigar a presença da proteína de latência LMP-1 do vírus EBV, os blocos parafinados foram submetidos à microtomia e cortes com 5µm de espessura e depositados em lâminas pré-tratadas com adesivo (Silano®4).

O controle positivo para as reações foram amostras de Linfoma Hodgkin sabidamente EBV positivo.

Nenhuma das amostras foram excluídas.

4.3.1 Desparafinização

Os cortes foram desparafinizados em dois banhos de xilol de 10 minutos cada. Em seguida faz-se banho em álcool absoluto e em seguida em álcool 96% e em álcool 70%. E em seguida lavou-se as lâminas em água corrente.

4.3.2 Recuperação/reativação antigênica:

Para os anticorpos anti CD3, anti LMP -1 foi utilizado o tampão de citrato pH 6,0 (ácido cítrico mono-hidratado). As lâminas foram incubadas na solução tampão de citrato, previamente aquecido em forno de micro-ondas por 10 minutos. Após, foram retiradas e deixadas em temperatura ambiente por 25 minutos para esfriar e passar por lavagem em água destilada por 5 minutos. Em seguida realizou-se 3 banhos em solução tampão phosphate buffered saline (PBS) pH 7, o qual forneceu às lâminas pH mais adequado

4.3.3 Bloqueio da peroxidase endógena:

As lâminas foram deixadas em álcool metílico por 15 minutos e, em seguida, lavadas com água corrente e após, realizou-se três banhos em solução tampão PBS de 5 minutos cada. Os cortes das lâminas foram então marcados com caneta própria para essa técnica, fazendo-se um círculo em torno do corte e colocando-se as lâminas nas bandejas de incubação, onde foram realizados todos os próximos procedimentos

4.3.4 Bloqueio das proteínas endógenas – biotina e avidina:

Para o bloqueio das proteínas endógenas, usou-se albumina bovina (5g), utilizando-se para cada 5 de μL solução TRIS-HCl. Colocou-se, então, esse preparado sobre os cortes por 10 minutos que em seguida foram banhados em solução PBS por dois minutos.

4.3.5 Incubação do anticorpo primário:

Em seguida, realizou-se a incubação de anticorpo primário nas diluições testadas e padronizadas previamente. O período de incubação foi de 24 horas (overnight) em câmara úmida. Após esse período realizou-se 3 banhos de PBS de 5 minutos cada.

4.3.6 Incubação do anticorpo secundário e polímero:

O anticorpo secundário foi o mesmo para todas as reações (MACH 4 Mouse Probe (UP534L – Biocare Medical), independentemente do tipo de anticorpo primário, incubado

por 30 minutos, com bandejas de incubação em câmara úmida por 30 minutos. Procedeu-se a lavagem das lâminas por 2 vezes, de 5 minutos cada, com solução de PBS. Após isso, fez-se a incubação com o polímero MACH 4 HRP Polymer (MRH534L – Biocare medical), por mais 30 minutos, com as bandejas de incubação fechadas, à temperatura ambiente e em seguida lavagem das lâminas por 2 vezes, de 5 minutos cada, com solução PBS. Em seguida, seguiu-se com o uso do DAB (revelador, DAKO, Glostrup, Denmark) aplicando sobre as lâminas e esperando 5 minutos protegendo-as da luz. Seguiu-se com lavagem de 5 minutos em PBS. Realizou-se então banho com Hematoxilina de Meyer por 15 minutos. Em seguida fez-se lavagem em água corrente.

4.3.7 Desidratação dos cortes e montagem das lâminas:

A desidratação dos cortes foi realizada fazendo-se quatro banhos em álcool (70%; 80%; 95%; absoluto), de dois minutos cada, e dois banhos em xilol, dois minutos cada. Finalmente, se colocou a lamínula sobre cada lâmina usando-se uma gota de Erv-Mount.

4.3.8 Instrumento de coleta de dados IQ:

Os dados de interesse foram reunidos e semiquantificados a partir de ficha elaborada para tal fim (ANEXO B).

4.3.9 Imunoistoquímica do Grupo Controle:

Devido a inviabilidade de realização de biópsia da mucosa labial inferior sem justificativa clínica aplicável em pacientes estritamente saudáveis objetivando material de

controle da pesquisa, optou-se por selecionar casos de fenômeno obstrutivo/de extravasamento de muco (mucocele) na mesma região já que estas possuem indicação de biópsia e geralmente englobam outras glândulas satélites “normais” limítrofes à lesão durante a sua remoção cirúrgica com base em um protocolo. Neste caso, seriam estas glândulas satélites o alvo da avaliação em relação ao controle.

Dessa maneira, foram usados blocos de parafina de glândulas salivares menores satélite provenientes de 8 casos de mucocele localizadas na região de mucosa labial inferior como grupo controle para a presença do vírus EBV. *O protocolo para realização da imunoistoquímica está descrito nos itens 4.3.1 até 4.3.7.*

4.4 Extração de DNA e Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

Na reação de PCR para o vírus EBV e CMV, foi utilizado o protocolo da Fundação de Medicina Tropical: Heitor Vieira Dourado, que recomenda como controle positivo um caso de Linfoma de Hodgkin sabidamente EBV positivo através de imunoistoquímica prévia. Do mesmo modo, o controle positivo para CMV utilizado pela instituição foi material de biópsia anal sabidamente positivo para CMV. As reações foram realizadas com o auxílio da biomédica Msc e Doutoranda Renata Galvão.

As amplificações foram previamente realizadas para o gene constitutivo de alta expressão β Globina, usado para controle endógeno das amostras. Nenhuma das amostras foi excluída. Os passos realizados foram os seguintes:

4.4.1 Preparação dos blocos de parafina

Inicialmente foram realizados 6 cortes de 20 micras em micrótomo (Reichert HistoStat Microtome), adicionados tais fragmentos em microtubos de 2mL devidamente identificados em sequência ordinal do número 1 ao 29.

4.4.2 Desparafinização

A remoção da parafina seguindo os passos: 1 ml de xilol e 15 minutos em banho-maria a 60 °C (EVLAB BM EV 015). Centrifugação: 3 min a 10000 RPM (Eppendorf 5804 R). Após isso, retira-se o sobrenadante com micropipeta (Eppendorf®). Tal processo é repetido mais uma vez. Em seguida, adiciona-se álcool absoluto (1 ml – 5 minutos em temperatura ambiente). Em seguida realiza-se a centrifugação (Eppendorf® – 5804 R). Remove-se o sobrenadante. O processo é repetido mais uma vez para em seguida as amostras foram deixadas em fluxo aberto (QUIMIS) por 1 hora para evaporação do restante de álcool.

Seguiu-se o protocolo do KIT (INVITROGEN):

4.4.3 Extração do DNA propriamente dita

- a) Adicionou-se 180 µl em cada amostra de PURELINK Genomic Digestor;
- b) Adicionou-se 20 µl em cada amostra de Proteinase K;

- c) Cada amostra foi processada no Vórtex (Biomixer QL 901) para homogeneização da mistura e em seguida ir para overnight em Banho-Maria em 56 °C a fim de se obter melhor performance do material;

Após o overnight as amostras foram transferidas verificando previamente se as mesmas apresentam aspecto homogêneo. Em seguida, realizou-se centrifugação (3 min/14.000 RPM). Então, as amostras foram transferidas para outros tubos devidamente identificados com a remoção do sobrenadante através de pipetas.

4.4.4 Uso da RNase

Para tal acrescentou-se 20 µl de RNase em cada amostra e em seguida levou-se ao vórtex para homogeneização da mistura com incubação de 2 minutos. Após isso fez-se o uso do PURELINK GENOMIC LYSIS (Biding Buffer) acrescentando 200 µL em cada amostra e em seguida levou-se ao vórtex para homogeneização da amostra. Em seguida utilizou-se álcool absoluto (200 µL em cada amostra). Levou-se as amostras ao vórtex.

4.4.5 Purificação do DNA

Neste processo transferiu-se a mistura para as colunas devidamente identificadas e em seguida centrifugação (1 min/8000 RPM).

4.4.6 Lavagem do DNA

Removeu-se a parte inferior dos tubos das amostras substituindo-as por outras. Adicionou-se em seguida 500 μ L de PURELINK GENOMIC WASH BUFFER 1 em cada amostra. Levou-se as amostras para a centrífuga (por 1 min/8000 RPM) e removeu-se a coluna inferior para em seguida substituir cada uma por outras. Adicionou-se 500 μ L de PURELINK GENOMIC WASH BUFFER 2 em cada amostra. Em seguida centrifugação (3 min/14000 RPM). Então, descartou-se a parte inferior dos tubos.

4.4.7 Eluição do DNA

Adicionou-se microtubos de 1,5 mL identificados e utilizou-se 50 μ l de ELUTION BUFFER para cada amostra nas colunas (com cuidado nesta etapa para dispensar o produto exatamente no local onde está concentrado o DNA). Após isso, incubação por 1 minuto em temperatura ambiente. Em seguida levou-se as amostras para centrífuga em 1 min/10000 RPM). Em seguida descartou-se as colunas de cada amostra e fechou-se os tubos com o DNA armazenado a -81 °C em freezer (Sanyo Ultra Low) para posterior quantificação em espectrofotômetro (NANODROP 2000 Thermo Scientific).

4.4.8 Quantificação e pureza do DNA

Colocou-se 2 μ L de cada amostra no dispositivo NANODROP 2000 (Termo Scientific) para quantificação em ng/ μ L. A pureza é dada pela razão de proteínas e ácido DNA. *Os resultados estão dispostos em tabela, a seguir:*

AMOSTRA	Concentração DNA ng/μL	Pureza
1	6,4	1,65
2	7,8	1,59
3	6,4	1,87
4	6,4	2,0
5	6,9	2,03
6	10,6	1,93
7	11	1,88
8	6,1	1,81
9	6,7	1,88
10	8,4	2,01
11	8,3	1,74
12	8,1	1,66
13	8,1	1,67
14	9	2,01
15	9,9	1,05
16	11,8	2,05
17	20,9	1,48
18	11,6	2,02
19	6,2	1,98
20	7,2	2,02
21	8,7	2,05
22	7,4	2,0
23	8,7	2,02
24	7,3	2,01
25	8,5	1,98
26	7,5	2,0
27	6,5	2,02
28	8,7	2
29	9,7	1,89

Tabela 3: Pureza e quantificação das amostras de DNA

4.4.9 Preparação do MIX e PCR propriamente dito

A reação de PCR foi processada no equipamento termociclador (Eppendorf Mastercycler egradient). O sistema utilizado para a PCR foi composto por 5 μ L de DNA da amostra; 2,5 μ L do tampão 10x; 0,8 μ L de MgCl₂ 50mM, 1,2 μ L do primer forward (10pmol); 1,2 μ L do primer reverse (10pmol). A sequência dos primers e tamanho dos fragmentos estão descritos na tabela 4, sendo que foram utilizados pares de primers provenientes de um sistema multiplex para ambos os vírus, além de um par de primer específico para o EBV; 0,5 μ L de dNTP 10 mM; 0,25 μ L de Taq polimerase 5U/ μ L e 13,55 μ L de água de injeção para completar o volume de 25 μ L. *As quantificações seguem a tabela abaixo para melhor visualização:*

Produto	Quantidade	Concentração
H ₂ O	13,55 μ L	-----
Tampão 10x	2,5 μ L	-----
Magnésio	0,8 μ L	50mM
dNTPp	0,5 μ L	10mM
EBNA1F	1,2 μ L	10 pmol
EBNA1R (10pmol)	1,2 μ L	10 pmol
Taq	5U/ μ L	1,25 mM
DNA	5 μ L	30,5 – 104.5ng
Total	25 μ L	-----

Tabela 4. Amostras:1 a 29; concentrações entre 6,1 e 20, 9 ng/ μ L de DNA representam a mínima e a máxima.

Para controle da reação, utilizou-se um controle negativo e uma amostra positiva clínica. O equipamento foi programado para executar o seguinte termociclo:

ETAPAS	TEMPERATURA	TEMPO
Denaturação	94 °C	2 minutos
Denaturação	94 °C	30 segundos
Associação	60 °C	45 segundos
Extensão	72 °C	45 segundos
Extensão final	72 °C	10 minutos
Manutenção/hold	4 °C	Tempo indefinido

39 ciclos

Tabela 5: sequência de etapas de termociclagem.

PRIMER	SEQUÊNCIA (5'-3')	TAMANHO –Pares de Base
Human β Globina F	ACACA ACTGTGTTCACTAGC	110
Human β Globina R	CAACTTCATCCACGTTCCACC	
EBNA1- F	GTCATCATCATCCGGGTCCTC	269
EBNA1 – R	TTCGGGTTGGAACCTCCTTG	
HSV – GF (EBV-F)	GTGTTGACTTTGCCAGCCTCTAC	176
EBV – R	ACTCGTGCACGTGCTTCTTTAC	
HSV-GF (CMV – F)	GTGTTGACTTTGCCAGCCTCTAC	242
CMV – R	TTGACACTCGCGCATGCATTC	

Tabela 6: sequência e fragmento do DNA utilizado na reação da PCR.

As amostras foram armazenadas a -33 °C em freezer (Scientific Freezer –Indrel Scientific) para em dia seguinte realizar a eletroforese.

4.4.10 Eletroforese em gel de agarose 2,0%

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2,0% (p/v) em tampão TEB (e EDTA) 1x, nas seguintes condições: 70 Volts até a entrada da amostra no gel, aumentando a voltagem para 100 Volts até a amostra chegar no final da corrida com duração de aproximadamente 40 minutos. Foi utilizado como marcador o ladder múltiplo de 100pb da Invitrogen Life Technologies. O gel foi corado com brometo de etídio (1,0 mg/mL), e foram visualizadas sob luz ultravioleta (UV) e fotografadas no equipamento Image Master® VDS FTI-500, da Pharmacia Biotech.

4.5 Instrumento de coleta de dados de prontuário:

Ficha com dados (número de registro na FAO, número de registro do estudo, sexo, raça, procedência, data e local de nascimento, doença autoimune presente, história familiar de doença autoimune, Teste de Schirmer, sorologia de anticorpos Ro/La, Sorologia EBV, Sorologia CMV, presença de fator reumatoide, Laudo da Biópsia) foram utilizadas para organização de dados essenciais a partir do prontuário do paciente e relatório clínico (ANEXO C). O diagnóstico foi realizado segundo os critérios de Vitalli e colaboradores (ANEXO D).

5. RESULTADOS

5.1 Histopatologia da glândula salivar menor

Dos 29 casos inicialmente selecionados, 9 foram descartados seguindo os critérios de exclusão descritos na metodologia. A partir das amostras válidas (n=20), foram estratificadas as seguintes estruturas analisadas: ácinos, presença de tecido adiposo intraglandular, fibrose, ectasia de ductos, presença de centro germinativo e infiltrado inflamatório (linfócitos e plasmócitos). Das amostras analisadas, 5% (n=1) apresentou preservação morfológica acinar, no entanto 95% (n=19) apresentaram degeneração acinar caracterizada por apagamento de seus limites citoplasmáticos, descaracterização morfológica com características basofílicas (figura 2 e 3). Quanto a presença de infiltração adiposa, 65% das amostras (n=13) apresentaram tal característica (figura 4). Em relação à fibrose, 90% das amostras (n=18) mostraram-se positivas para sua presença (figura 5). Ectasia de ductos esteve presente em todas 100% dos casos (n=20) estudados (figura 6). Não houve positividade para a presença de centros germinativos em nenhuma das amostras analisadas.

A respeito do escore focal (dado pela fórmula $n^{\circ} \text{ de focos} \div \text{área da glândula} \times 4$), 50% dos casos (n=10) apresentaram resultado igual a 1, assim como 35% das amostras (n=7) apresentaram valor igual a 2 e 10% dos casos (n=2) demonstraram score focal igual a 3 e apenas 5% (n=1) apresentou score focal igual a 4. A somatória de todos os scores focais das amostras foi igual a 34. Tal resultado culminou em uma média de 1,7 por amostra. Ainda, seguindo a classificação de Chisholm & Mason (1968) 50% das amostras (n=10)

apresentaram “*grau 3*” (presença de 1 foco em 4mm² de área glandular) enquanto que os outros 50% (n=10) apresentaram *grau 4* (presença de mais de 1 foco em 4mm² de área glandular).

Quanto a análise do infiltrado linfoplasmocitário observou-se os seguintes resultados de acordo com a metodologia proposta na tabela abaixo:

PROPORÇÃO LINFÓCITOS X PLASMÓCITOS		QUANTIDADE DE AMOSTRAS
+++ Linfócitos	0 Plasmócitos	1
+++ Linfócitos	+ Plasmócitos	11
+++ Linfócitos	++ Plasmócitos	4
++ Linfócitos	++ Plasmócitos	3
+ Linfócitos	+++ Plasmócitos	1

Tabela 7: relação entre amostras analisadas e as proporções entre linfócitos X plasmócitos identificadas.

A partir da tabela observada, 5% das amostras (n=1) apresentou o padrão “+++ linfócitos x 0 plasmócitos” bem como 55% (n=11) demonstraram o padrão “+++ linfócitos x + plasmócitos” e 20% (n=4) apresentaram o padrão “+++ linfócitos x ++ plasmócitos”. Ainda, 15% (n=3) demonstraram o padrão “++ linfócitos x ++ plasmócitos”. Apenas 5% (n=1) apresentou o padrão “+ linfócitos x +++ plasmócitos”.

Em relação à área de tecido glandular analisada, o total da somatória de todas as 20 amostras foi de 303 mm². Deve-se lembrar que a área mínima recomendada por Daniels (et al., 2011) para que exista possibilidade factível de diagnóstico sugestivo de SS é de 4 mm². Apenas 5% (n=1) possuía o valor mínimo recomendável, sendo que os 95% restantes (n=19) apresentaram quantidade de área analisável superior a 4 mm². A menor área foi 6mm² e a maior 41mm². A média da área analisada foi de 15,15 mm².

Quanto a localização do foco, 10% das amostras (n=2) apresentaram apenas foco com localização periductal enquanto que 55% (n=11) apresentaram focos em região periductal e perivascular e 25% (n=5) apresentaram focos em região periductal, perivascular e periacinar. Apenas 5% (n=1) apresentou focos apenas em região perivascular e periacinar. Quanto a região periacinar, 5% (n=1) apresentou foco estritamente na região. Em relação a região mais prevalente para o foco linfoplasmocitário, temos localização periductal (figura 7) com 90% dos casos (n=18), seguida da região perivascular (figura 8) com 85% dos casos estudados (n=17) e periacinar (figura 9) com 35% dos casos estudados (n=7).

Quanto à quantidade de focos, 118 focos foram identificados ao todo. Isso representa uma *média de 5,9 focos* se distribuirmos igualmente tal resultado por amostra. A tabela 8 apresenta cada caso analisado em relação a quantidade de focos:

Todos os resultados tabulados em relação a histopatologia, escore focal estão apresentados no anexo E.

AMOSTRA	FOCO/QUANTIDADE	ESCORE FOCAL
1	4	4
3	2	1
4	3	1
5	3	1
6	5	2
8	6	1
9	6	2
10	4	3
12	3	1
14	4	1
16	17	2
17	3	1
18	11	2
21	5	3
22	6	1
23	15	2
25	5	2
26	3	1
27	9	2
29	4	1

Tabela 8: relação entre amostras analisadas e suas respectivas quantidades de focos linfoplasmocitários identificadas. A coluna “AMOSTRA” apresenta as amostras e suas respectivas codificações numéricas para identificação. A coluna “FOCO/QUANTIDADE” apresenta a quantidade de focos observados em cada amostra. A coluna “ESCORE FOCAL” representa tal valor para cada amostra estudada segundo parâmetros de Daniels (et al., 2011).

5.2 Imunoistoquímica

5.2.1 Imunoistoquímica do linfócito T

Através de uma análise semiquantitativa, estratificou-se as 20 amostras analisadas de acordo com Ogbureke e colaboradores (2007), sendo 0% para o perfil sem marcação (n=0) com escore =0, ainda 60% para o perfil de até 50%” (n=12) com escore=1, bem como 25% para o perfil “maior que 50% e menor que 75%” (n=5) com escore =2 e por fim 15% para o perfil “acima de 75%” (n=3) com escore=3. As figuras 10, 11 e 12 representam cada foco observável com suas respectivas alocações de acordo com o julgamento feito pelo patologista. A tabela abaixo exemplifica os resultados descritivos:

IMUNOISTOQUÍMICA LINFÓCITOS T			
Perfil de porcentagem em relação ao foco	Quantidade de amostras	Porcentagem descritiva (do total de amostras)	Escore
Sem marcação	0	0%	0
Até 50%	12	60%	1
Maior que 50% e menor que 75%	5	25%	2
Acima de 75%	3	15%	3

Tabela 9: Análise semiquantitativa de porcentagem de Linfócitos T segundo Ogbureke et al., 2007

5.2.2 Imunoistoquímica EBV

O controle positivo das reações foi um Linfoma de Hodgkin sabidamente EBV positivo (Figura 13). Todas as amostras - suas duplicatas e triplicatas – (100%) apresentaram resultado negativo para a presença do vírus EBV (Figura 14).

5.2.3 Imunoistoquímica Grupo Controle da glândula salivar menor

Para o controle positivo foi utilizado um Linfoma de Hodgkin sabidamente EBV positivo (Figura 13). Apenas 12,5% (n=1) de um universo de 8 amostras apresentou positividade para vírus EBV (figura 15).

5.3 PCR

5.3.1 Gene constitutivo da β globina

Todos os casos foram positivos para β globina demonstrando 100% das amostras eram viáveis para o experimento. Segue figura para ilustrar o resultado:

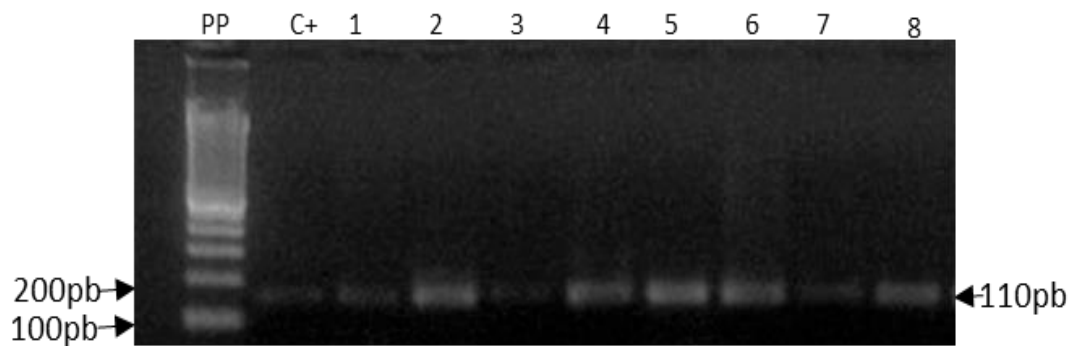


Figura 16: Gel agarose 2% ilustrando resultado da PCR – β Globina - nos casos 1 a 8. C+= controle positivo; PP= padrão de pares de base; pb= pares de base.

5.3.2 EBV

De um universo de 20 amostras viáveis, apenas uma amostra (a de número 8) apresentou positividade para a presença do vírus EBV (EBNA1 F/EBNA1 R) e nenhuma amostra utilizando o primer proveniente do sistema multiplex (HVS-GF=EBV-F e EBV-R). Isso é quantificado em 5% do total das amostras estudadas. Segue figura para ilustrar o resultado:

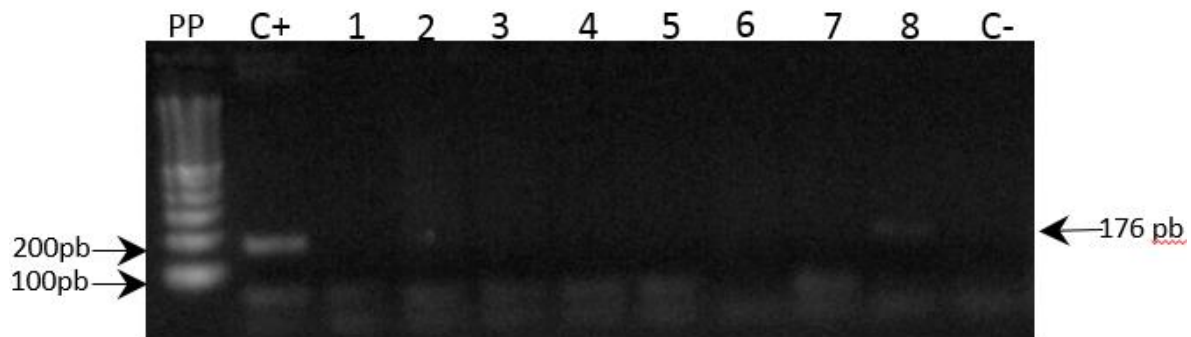


Figura 17: Gel agarose 2% ilustrado resultado da PCR – EBV (HSV GF/EBV R) - nos casos 1 a 8. C+= controle positivo; C-= controle negativo; PP= padrão de pares de base; pb= pares de base. Apenas a amostra de número 8 se apresentou positiva para a presença do vírus EBV.

5.3.3 PCR-CMV

Todas as 29 amostras (100%) apresentaram negatividade para a presença do vírus CMV.

Figura 2

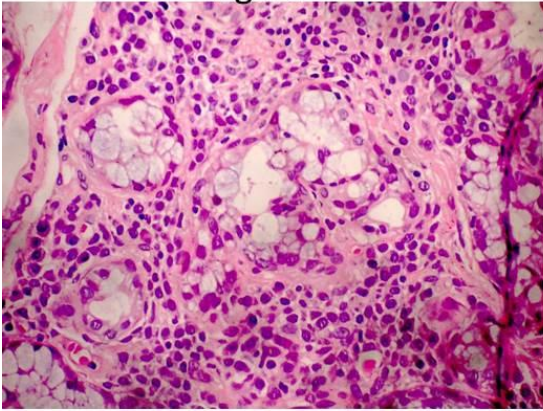


Figura 3

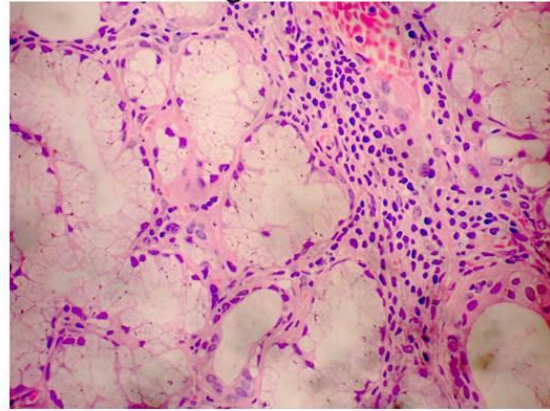


Figura 4

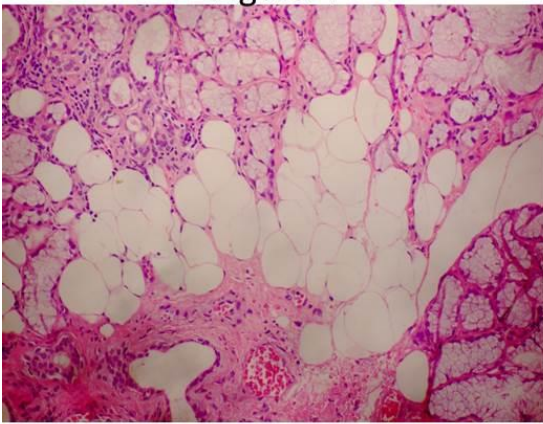


Figura 5

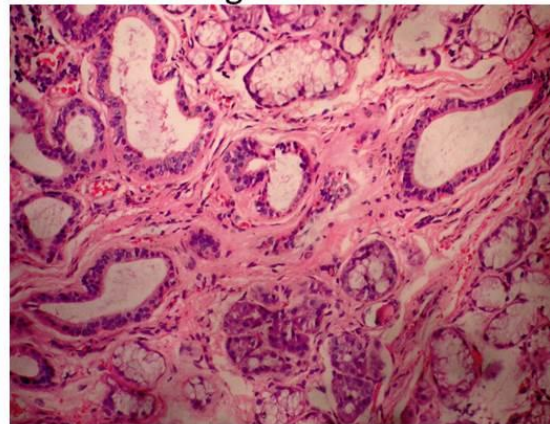


Figura 6

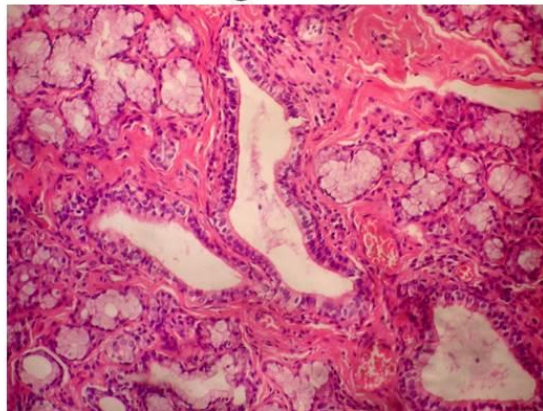


Figura 2: Degeneração acinar. Observe a perda da morfologia piramidal das células mucosas. **Seta:** coloração basofílica sugerindo degeneração (HE; 200X). **Figura 3:** Degeneração acinar. **Seta:** observe o apagamento da membrana citoplasmática (HE; 200X). **Figura 4:** Infiltração gordurosa. Observe a presença de grupos de adipócitos no interior do parênquima glandular (HE; 200X). **Figura 5:** Fibrose. Observe a presença de tecido conjuntivo em maior quantidade no interior do parênquima glandular (HE; 200X). **Figura 6:** Ectasia ductal. Observe a dilatação da estrutura e proliferação do componente epitelial associada a presença de material eosinofílico amorfo no interior dos ductos. **Seta:** fibrose (HE; 200X).

Figura 7

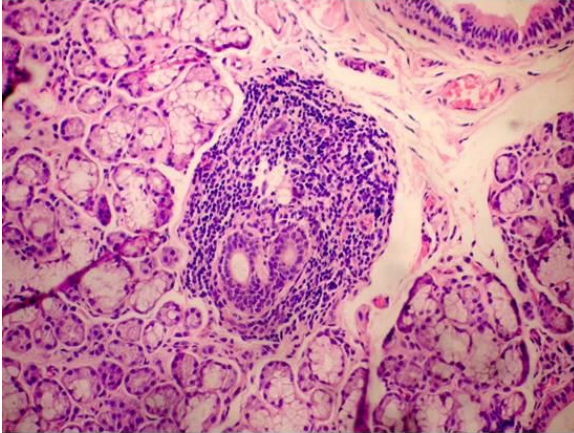


Figura 8

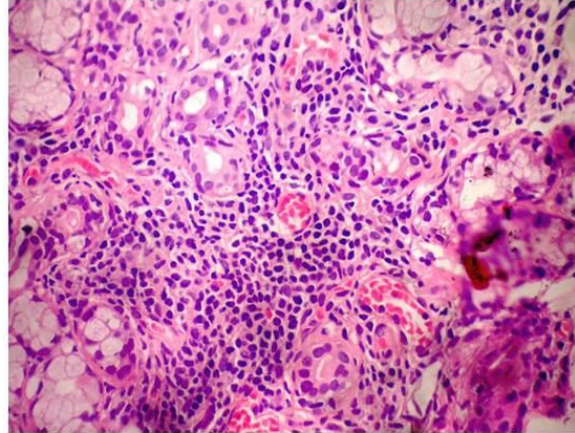


Figura 9

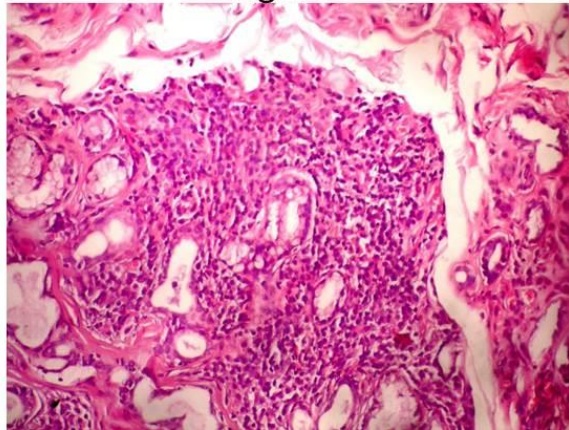


Figura 7: Foco linfoplasmocitário periductal. Mais de 50 linfócitos agregados circundando completamente a estrutura ductal em meio a ácinos de aparência normal. Observe a proliferação do componente epitelial ductal (HE; 200X). **Figura 8:** Foco linfoplasmocitário perivascular. Mais de 50 linfócitos agregados circundando vasos sanguíneos congestos (HE; 200X). **Figura 9:** Foco linfoplasmocitário periacinar. Mais de 50 linfócitos agregados circundando completamente unidades acinares. Observe as alterações morfológicas degenerativas das unidades acinares envolvidas pelas células mononucleares (HE; 200X).

Figura 10

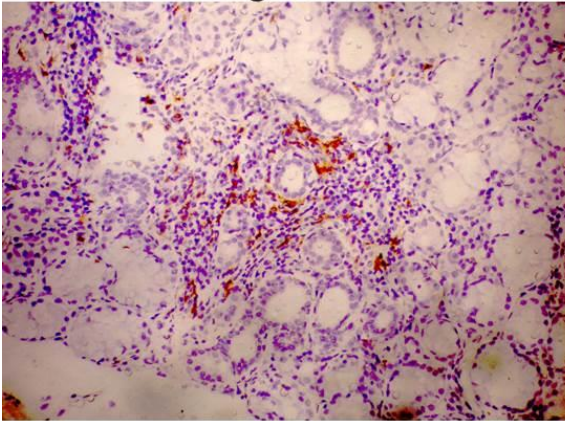


Figura 11

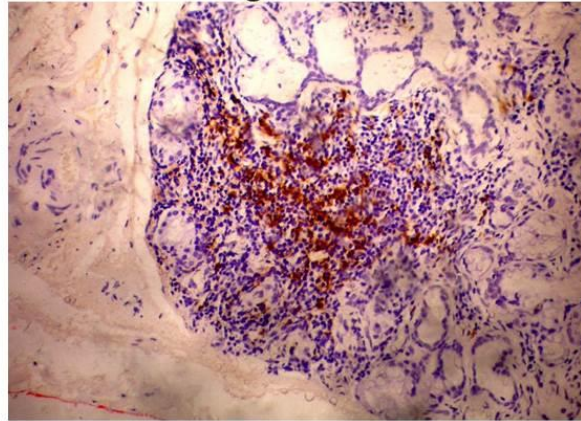


Figura 12

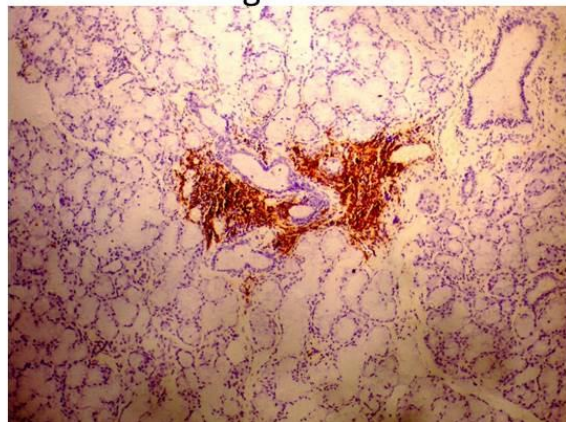


Figura 10: Predominância de linfócitos T (CD3) em até 50%. Observe as células T (CD3) marcadas em marrom pelo cromógeno em quantidade inferior a 50% do foco linfocitário que circunda a estrutura ductal (Imunoistoquímica; 100X). **Figura 11:** Predominância de linfócitos T (CD3) maior que 50% e menor que 75%. Observe as células T (CD3) marcadas em marrom pelo cromógeno em quantidade maior que 50% e menor que 75% do foco linfocitário que circunda as estruturas acinares (Imunoistoquímica; 100X). **Figura 12:** Predominância de linfócitos T (CD3) maior que 75%. Observe as células T (CD3) marcadas em marrom pelo cromógeno em quantidade maior que 75% do foco linfocitário que circunda as estruturas ductais. Observe a dilatação ductal e proliferação epitelial associada (Imunoistoquímica; 100X).

Figura 13

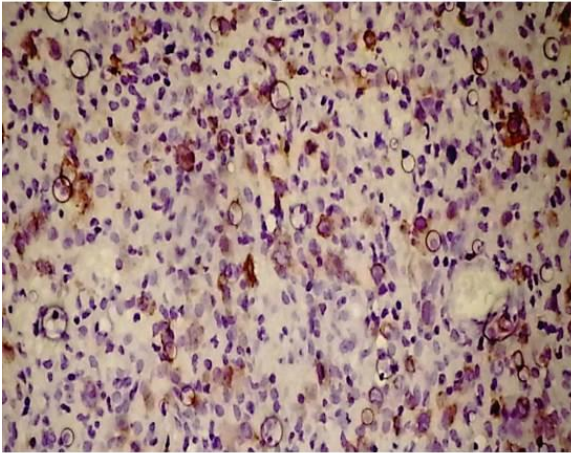


Figura 14

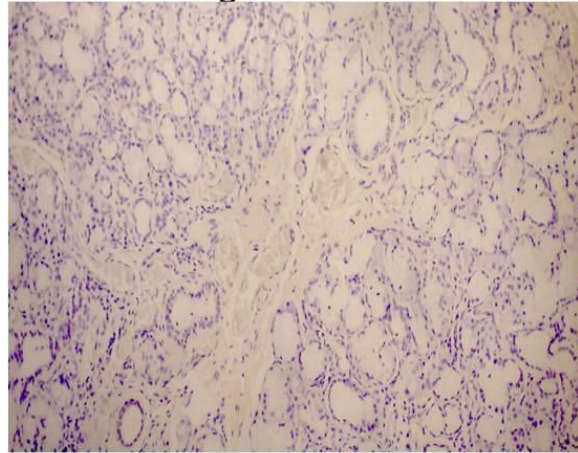


Figura 15

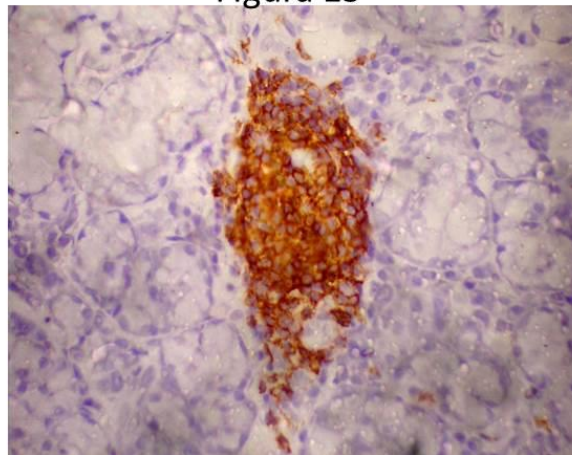


Figura 13: Controle positivo EBV (Linfoma Hodgkin). Observe a marcação em marrom pelo cromógeno indicando positividade para a presença do vírus (Imunoistoquímica; 200X). **Figura 14:** Marcação negativa EBV. Todas as 29 amostras do universo amostral de glândulas salivares menores com laudo sugestivo de SS apresentaram negatividade para a presença do vírus. Note a ausência de marcação em marrom em toda a estrutura glandular (Imunoistoquímica; 100X). **Figura 15:** Marcação positiva EBV do grupo controle. Uma amostra apresentou positividade para a presença viral. Note a marcação citoplasmática em marrom no conglomerado de células mononucleares (Imunoistoquímica; 400X).

6.DISCUSSÃO

6.1 Perfil histológico é infiltrado inflamatório na Síndrome de Sjögren

No presente estudo procurou-se traçar o perfil histológico de 29 casos arquivados no laboratório de patologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da UFAM através de análise qualitativa e semiquantitativa além de buscar relação de tais casos com a presença dos vírus EBV através da PCR e imunistoquímica e CMV apenas através da PCR bem como identificar e a presença de linfócitos T e indicar sua quantidade através de análise semiquantitativa. Buscou-se a investigação da presença de tais vírus por conta de literatura vasta sobre suas possíveis relações com doenças autoimunes.

Por sua natureza autoimune, a SS tem como característica a progressiva agressão do sistema imunológico contra glândulas exócrinas. Sob tal ponto de vista, glândulas salivares são extensivamente atacadas por possuírem auto antígenos que desencadeiam atividade inflamatória destrutiva levando o indivíduo portador da condição ao quadro de xerofthalmia. A biópsia da glândula salivar menor é considerada por Vitalli e colaboradores (2002) uma ferramenta importante no diagnóstico da SS, porém apesar do procedimento cirúrgico ser simples, o mesmo não é uma rotina do clínico, além do que o diagnóstico histológico de tal doença necessita de cuidadosa análise de um patologista com experiência nesse tipo de análise, o que infelizmente não é uma rotina em laboratórios de patologia (PEREIRA, et al. 2014). Em nosso estudo, das 29 amostras iniciais, 9 foram descartadas por razões diversas como ausência de foco, escore focal insuficiente e material insuficiente para análise. Tais

critérios de exclusão nos levaram a concluir dois possíveis aspectos: 1) necessidade de conhecimento sobre a doença pelo patologista a respeito da consideração a respeito de “foco” como denso agregado de 50 ou mais células linfocitárias que usualmente estão localizados em região periductal e perivascular (DANIELS, et al., 2011); 2) a lâmina reanalisada não condiz com o diagnóstico estabelecido nos laudos, pois em alguns casos, como a lâmina original não foi localizada, a reanálise foi feita em lâmina de recorte, a qual pode ter perdido o material de interesse num corte mais aprofundado. De tal forma que como consideração diagnóstica limitante há de se considerar que a análise de um único corte pode mascarar a resultados. Dessa forma recomenda-se sempre a possibilidade de análise de outros cortes em maior profundidade, pois possíveis agregados linfocitários condizentes com a doença estariam presentes em outras profundidades. Isso reporta a necessidade de cortes seriados e esgotamento do material glandular a fim de se analisar a glândula como um todo. Daniels e colaboradores (2011) chamam atenção para possível falha na elaboração do escore focal e tentativa de aplicá-lo em casos onde não há o padrão específico inflamatório para SS. Ainda, existe a possibilidade de falso positivo por conta de material insuficiente para análise. Sob esse tópico, é necessário destacar que o cirurgião executor da biópsia deve ter o conhecimento prévio sobre o mínimo recomendável para investigação satisfatória a respeito da SS (3 a 5 glândulas salivares menores). O envio de apenas uma glândula ou de fragmentos pode induzir o patologista não familiarizado com o diagnóstico da condição a superestimar o escore focal levando a um laudo errôneo. Realizar a investigação histológica seguindo certos parâmetros preconizados por Daniels e colaboradores (2011) é procedimento importante para realizar correto diagnóstico da SS. A identificação primária do foco linfocitário é condição preponderante para o avanço na análise qualitativa das glândulas salivares menores sob suspeita de processo autoimune.

Sobre esse aspecto, Vivino e colaboradores (2002) declaram a importância da análise semiquantitativa da glândula salivar menor, que infelizmente não é executada ou não é realizada da maneira correta. Em nossa metodologia, seguimos o seguinte padrão: leitura do relatório clínico (buscando informações sobre a quantidade de glândulas salivares menores enviadas para análise, checagem em microscópio óptico (aumento de 50X) para a contagem do número de glândulas salivares presentes na lâmina original em HE, pesquisa sobre a presença de foco linfocitário e contagem (aumento de 50X, 100X, 200X). Em seguida, seguiu-se com a investigação de alterações morfológicas acinares, infiltração gordurosa, presença de fibrose e ectasia ductal. Em seguida, realizou-se a contagem do número de focos e da quantidade de células linfocitárias presentes (esta sendo semiquantitativa), sua localização (periductal, perivascular e periacinar) e mensuração da área glandular presente para realização do escore focal. Tais parâmetros metodológicos são apoiados pela literatura no contexto qualitativo e semiquantitativo. Entretanto, o SICCA (Sjögren's International Collaborative Clinical Alliance) preconiza o uso de uma grade na ocular do microscópio ("*eyepiece grid*") e "*stage micrometer*" para calibragem e mensuração associado a microscópio óptico especialmente destinado a essa finalidade. Acreditamos que apesar de adequado, tal recomendação não reflete o dia-a-dia de um laboratório convencional de patologia médica ou bucal, sendo nosso método mais adequado a realidade dos serviços comumente disponíveis a população. Centros brasileiros de estudo sobre a SS, como a Universidade Federal do Espírito Santo (sob a coordenação da Prof^a Dr^a Valéria Valim) fazem uso de tal metodologia e tem divulgado em reuniões para diagnóstico da SS na comunidade acadêmica brasileira.

No que tange o achado histológico principal da SS ser o foco linfocitário, outras alterações histológicas podem estar presentes no contexto da glândula salivar menor. Apesar disso, em outra esfera, autores têm se dedicado ao estudo da glândula salivar menor na SS apresentando a lesão linfoepitelial benigna estrita a outras alterações diversas do foco linfocitário. Neville e colaboradores (2009) a dignifica com base nas definições de Daniels e colaboradores (2011) sobre a mesma devendo estar dentro dos limites de um infiltrado linfocitário presentes a ácinos de aparência normal, com lóbulos com ausência de dilatação ductal. Entretanto, sabe-se que achados diversos como hiperplasia e ectasia ductal, fibrose, proliferação vascular e progressiva substituição do tecido glandular por tecido gorduroso não são achados incomuns (BARCELLOS, et al., 2005). Corroborando com este padrão, em nosso estudo 100% das amostras analisadas (n=20) apresentaram tais alterações. Sobre esse assunto, existem investigações sobre possíveis relações entre tais achados e padrões clínicos laboratoriais da doença (PEREIRA et al., 2014). Um interessante estudo semelhante realizado por Llamas-Gutierrez e colaboradores (2014) demonstrou que atrofia acinar estaria relacionado com a presença de escore focal maior ou igual a 1 em pacientes com SS através de tratamento estatístico na análise de seus resultados. No presente estudo, 78% das amostras analisadas (n=19) apresentaram atrofia acinar. Todas as amostras que apresentaram tal resultado possuíam escore focal maior ou igual a 1. Ainda, os autores também demonstraram alta frequência de fibrose (68%) em pacientes com SS, concluindo que outros achados histológicos podem coexistir com a lesão linfoepitelial benigna, sendo a atrofia acinar presente em grande parte quando também havia presença de escore focal maior ou igual a 1. Para os autores, infiltração gordurosa e dilatação ductal seriam achados relacionados com a idade do indivíduo. Entretanto, por sua natureza estritamente histológica, a presente pesquisa não pode informar a significância clínica de tais achados.

Quanto a localização do foco linfocitário, a literatura mundial é concordante sobre o mesmo se apresentar de maneira usual circundando ductos e vasos sanguíneos (SICCA website, SOUSA, et al., 2012). Observamos tal informação se confirmar em nosso estudo, pois 90% das amostras analisadas (n=18) apresentaram o foco periductal como o mais prevalente, seguido do foco perivascular com 85% dos casos estudados (n=17). De maneira incomum, tem-se a região periacinar surgindo com 35% dos casos analisados (n=7). Na presente análise, podemos inferir fatores como confluência de focos com a ação linfocítica e epitelial produtoras de citocinas (FNT) reconhecidamente responsáveis por destruição tecidual (FOX, et al., 1994; BUOMBA, et al., 1995) que com o avançar da lesão, circundariam os ácinos provocando nos mesmos alterações morfológicas, já que os mesmos não são estruturas-alvo na SS. Centros germinativos também não são estruturas incomuns encontradas em glândulas salivares menores de pacientes com SS. Em revisão sistemática a respeito do assunto realizada por Risselada e colaboradores (2013), os autores declaram que aproximadamente 5% de pacientes portadores de pSS apresentam tal condição, que é identificada microscopicamente em lâminas confeccionadas em HE por grandes agregados de células linfocitárias organizadas perifericamente a um centro claro de células que se aproximam a células proliferativas dendríticas foliculares. Na presente análise, não encontramos a presença de tais estruturas o que em termos de prognóstico é um dado bom para tais pacientes que gentilmente concordaram em participar do estudo, visto que a presença de tais estruturas é um fator de risco para o surgimento de linfoma. Entretanto, vale destacar aqui as limitações de nossa pesquisa, pois técnicas biomoleculares de marcação (como a imunoistoquímica) podem demonstrar dados precoces no que se concerne a evidenciação de tais células claras através de reação com anti-CD21 ou anti-CD23. Em outro estudo, Risselada e colaboradores (2014) relacionaram o escore focal com

risco de desenvolvimento de Linfoma Não –Hodgkin. Segundo os autores, o escore focal ≥ 3 contribuiria para o desenvolvimento de neoplasia maligna linfoide. Em nossa análise observamos 15% (n=3) dos casos estudados apresentando escore focal ≥ 3 . Aprofundada investigação posterior de dados clínicos nesses três casos em cruzamento com esta informação podem gerar resultados interessantes em linhas de pesquisas futuras a respeito de tal assunto.

Ainda sobre o perfil infiltrado inflamatório na SS, a literatura relata grandes quantidades de plasmócitos produtores de imunoglobulinas de IgG e IgM como parte do perfil da condição. No presente estudo foi possível observar a presença razoável de plasmócitos como descrito por Lane e colaboradores (1983) e Speight e colaboradores (1990). Nosso estudo apontou que em 80% das amostras estudadas (n=16) houve presença notável de plasmócitos, apesar da predominância populacional de linfócitos. Estudos tem buscado significância para esses dados. Os próprios autores citados buscaram correlacionar tais dados com possíveis perfis evolutivos da doença na tentativa de traçar prognósticos para a mesma. A presença de plasmócitos é um indicativo de consequente presença de células B, pois é sabido que os plasmócitos surgem a partir da ativação de células B. Apesar da literatura relatar a predominância de linfócitos T como parte importante do perfil inflamatório na SS, sabe-se que tal atividade é regulada por intrincada rede de citocinas que envolvem participação não somente de células T CD4+ e CD8+, mas também células B e plasmócitos. A respeito disso, modelos tem sido propostos para explicação a respeito do aparato evolutivo inflamatório na SS. Szabo e colaboradores (2014) falam a respeito da importância das células T CD4+ no recrutamento de células B e evolução de centros germinativos em SS. Bombardieri e colaboradores (2013) correlacionam o aumento

populacional de células B com a presença notável de plasmócitos e produção de imunoglobulinas do tipo IgM como sendo uma característica comum em doenças autoimunes como a AR, tireoidite e SS. No presente estudo, além de se confirmar a participação dos plasmócitos no contexto da SS, demonstrou também que de todas as mostras válidas, 40% das amostras analisadas demonstraram a presença majoritária de linfócitos T (marcador anti-CD3) em grau 2 e 3 na análise semiquantitativa da imunoistoquímica. Tais dados podem refletir em aspectos de evolução do foco linfocitário em posterior centro germinativo - e como certas linhas de pesquisa tem demonstrado - indícios histológicos de prognóstico para curso clínico da SS. Entretanto, 20% das amostras (n=4) apresentaram um equilíbrio presencial entre linfócitos e plasmócitos (15% das amostras analisadas (n=3) sendo que 5% (n=1) apresentou predominância de plasmócitos. Tal resultado infere a possibilidade de tais casos analisados estarem relacionados com a Doença da IgG4. Tal condição é definida como uma entidade distinta com características clínicas e patológicas diversas manifestações através de densa infiltração de plasmócitos do tipo IgG4 em glândulas salivares e lacrimais que podem clinicamente ser semelhantes com Tumor de Kütnner e pseudotumor orbital inflamatório. Fibrose e lesões tumefativas comumente estão associadas e tais estruturas. Alguns pacientes podem apresentar envolvimento sistêmico grave com envolvimento de outros órgãos como pâncreas, aorta, rins e trato biliar. Estudos clínicos aprofundados seriam necessários para o estabelecimento da condição como medição de níveis séricos de IgG4, imunoistoquímica para anti-IgG4 e CD138, bem como negatividade para níveis séricos elevados de anti-Ro/SS-A e anti-La/SS-B e pesquisa do sexo dos pacientes, haja vista que tal condição é predominante em homens (YAMAOTO, et al., 2004). Todos os casos analisados foram de indivíduos do sexo feminino.

6.2 EBV e CMV na Síndrome de Sjögren

A SS tem sido foco de diversos estudos apontando certas possibilidades quanto à sua etiopatogênese. Fatores hormonais e ambientais –tais quais infecções virais têm sido indicadas na literatura científica como possíveis coadjuvantes para o desequilíbrio da resposta imune de indivíduos acometidos pela doença. Classicamente, os vírus EBV e CMV tem sido associados como possíveis gatilhos para o estabelecimento da SS. Sobre isso, estudos têm demonstrado resultados controversos (MARIETTE et al., 1991; KARAMERIS et al., 1992; MAITLAND & SCULLY, 1994; RIVERA et al., 2003; BARZILAI et al., 2007). Wen (et al., 1996) identificou a presença do genoma do vírus EBV (proteínas EBER1, BZLF1, BALF2, gp350/220) em amostras de glândulas salivares de pacientes chineses com SS através de hibridização *in situ* e imunistoquímica tanto em linfócitos como em células epiteliais ductais. Isso corrobora com o modelo apresentado na dissertação de Giovelli (2013) onde a autora descreve de maneira resumida a possibilidade participativa das células epiteliais ductais das glândulas exócrinas no contexto de recrutamento, ativação e diferenciação das células imunes. Dessa forma, a partir da presença viral tais células passariam a produzir citocinas que retroativariam as células epiteliais em um ciclo vicioso de perpetuação do processo de resposta imunológica exacerbada. Porém, Venables e colaboradores (1989) em um estudo com 12 glândulas salivares de pacientes diagnosticados com pSS detectou através de hibridização *in situ* o DNA do vírus EBV em apenas 2 amostras. Em contrapartida, o autor obteve positividade para o DNA viral em 6 dos 10 casos usados como grupo controle. Tais evidências tem sugerido controvérsia a respeito da participação do vírus EBV no estabelecimento da SS. Pois se por um lado a infecção persistente por vírus EBV está associada de maneira

consolidada a algumas neoplasias malignas, seu papel como coparticipante no desenvolvimento de doenças autoimunes ainda permanece assunto de investigação científica. Para contribuir de maneira controversa sobre tal assunto, o estudo, de um universo de 20 glândulas salivares emblocadas em parafina pacientes com laudo sugestivo de SS, todas as amostras (100%) foram negativas para a presença do vírus EBV através do uso de imunistoquímica (LMP1). Na análise considerou-se como negativo o resultado para a presença do vírus EBV com menos de 20% de marcações na arquitetura morfológica das glândulas salivares menores bem como descartou-se locais fora das áreas de interesse (linfócitos e ductos). Através da técnica da PCR (proteína EBNA1) nossos resultados demonstraram apenas uma amostra (amostra nº 8, datada do ano de 2012) positiva para o vírus EBV (5% das amostras investigadas). Tais resultados apesar de controversos podem inferir a influência de fatores como a qualidade do material utilizado para estudo (tecido conservado em parafina) e tempo de conservação (ano de 2011 a 2014) bem como a quantidade de DNA analisado e pureza (LIBÓRIO et al. 2005). A EBNA1 (do inglês *Epstein-Barr Nuclear Antigen1*) é uma proteína de latência responsável pela manutenção viral, indicando infecção de longos períodos o que configura a presença viral em seu estado de latência. Quanto ao grupo controle, apenas uma amostra (12,5% de um universo de 8 amostras) foi positiva para a presença do vírus EBV (proteína LMP1) através da técnica de imunistoquímica. A marcação foi positiva em grupos de linfócitos. A LMP1 (do inglês *Latent Membrane Protein1*) é categorizada como uma proteína de latência responsável pela imortalização de células B de memórias infectadas, impedindo apoptose e promovendo a persistência da infecção viral. Tanto EBNA1 e LMP1 são marcadores de certas neoplasias malignas linfoides. Tal resultado evidencia que em nosso estudo, não foi encontrado relação entre SS e a infecção por vírus EBV. O resultado positivo detectado em uma

amostra do grupo controle (a saber glândulas salivares provenientes de remoção cirúrgica de fenômeno de extravasamento de muco), pode ser evidência sobre a presença incidental do vírus EBV, estando presente de maneira latente em linfócitos e eventualmente em células epiteliais.

Da mesma forma, ao longo de anos estudos tem tentado ligar o vírus CMV à SS. Entretanto da mesma maneira, os resultados têm sido no mínimo controversos. Scully (1990) realizou testes sorológicos através da técnica ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunosobert Essay*) em pacientes com aSS, não encontrando diferenças entre os níveis de anticorpos virais do grupo de indivíduos doentes e grupo controle. Do mesmo modo um interessante estudo realizado por Origgi e colaboradores (1988) sugeriram que o vírus EBV e não o vírus CMV possa eventualmente desempenhar algum papel do estabelecimento da SS. Em um universo de 20 pacientes com pSS e 20 indivíduos para grupo controle, o autor investigou a presença de anticorpos virais concluindo que não houve diferenças de níveis de anticorpos entre grupo controle e grupo de doentes para o vírus CMV. Porém, em se tratando de anticorpos EBV positivo, os níveis foram mais altos para o grupo pSS que o grupo controle. Dessa forma o autor sugere que o vírus EBV de alguma forma está envolvido na patogênese da SS. Já Newkirk e colaboradores (1994) obtiveram resultados divergentes dos outros autores investigando a presença viral (vírus EBV, CMV e HHV 6) em pacientes com AR e aSS à AR através de análise de amostras de sangue periférico, células epiteliais descamativas e saliva pela técnica da PCR, além da pesquisa de anticorpos virais e autoanticorpos. Nesse estudo, os indivíduos portadores de AR e aSS à AR apresentaram níveis elevados de células infectadas em amostras recolhidas da saliva (duas vezes mais que o grupo controle). No estudo, todas as amostras estudadas (100% de 20 casos) através da técnica da PCR apresentaram resultado negativo para a presença do vírus

CMV. Tal resultado sugere a não participação do vírus na SS, porém deve-se considerar a possível influência de fatores diversos responsáveis por esse quadro, tais como qualidade do material estudado, tecido glandular conservado em parafina, tempo de conservação, quantidade de DNA obtido na extração e pureza.

7.CONCLUSÕES

- Alterações histopatológicas da glândula salivar menor, tais como alterações acinares, infiltração gordurosa, fibrose e ectasia ductal são relativamente frequentes em pacientes portadores de SS.
- A predominância de linfócitos sobre plasmócitos no infiltrado inflamatório focal de pacientes portadores de SS demonstra que o linfócito é a figura celular mais importante na patogênese da doença.
- Sugere-se semelhança quantitativa de linfócitos Tem relação aos B no infiltrado inflamatório mononuclear como componente do foco linfocitário de pacientes portadores de SS.
- Sugere-se que não exista importante relação entre a presença dos vírus EBV e CMV na etiopatogenia da SS.

8. REFERÊNCIAS

ABE T. et al. Decreased tear lactoferrin concentration in patients with chronic hepatitis C. *Br J Ophthalmol*, Brasil, v.6, n. 83, p. 684-7 jan/feb 1999.

ALBUQUERQUE, A.C.L. et al. Síndrome de Sjögren: Relato de caso. *Com. Sau Cien*, Brasil, V.1, n. 19, p. 71-77. out/nov. 2008.

ARAGONA P. et al. Presence of antibodies against *Helicobacter pylori* and its heatshock protein 60 in the serum of patients with Sjogren's syndrome. *J Rheumatol*, Spain, v. 6, n. 26, p. 1306-11. nov/dez 1999.

BAODONG, Q. et al. The Association between TNF- α , IL-10 Gene Polymorphisms and Primary Sjögren's Syndrome: A Meta-Analysis and Systemic Review *PLoS One*. USA, v. 5, n. 8 p. 34-41. mar/apr. 2013

BARBIERI, R.; CHIEREGHIN, A. Síndrome de Sjögren. *Temas de Reumatologia Clínica*. Brasil, v.3, n. 10, p. 88-93.set. 2009.

BARCELLOS, et al. Histopathology and Immunopathology in Minor Salivary Glands of Patients with Sjögren's Syndrome (SSj). *Rev Bras Reumatol*, v. 45, n. 4, p. 215-23, jul./ago., 2005

BARROS, G.C.M. Síndrome de Sjögren - Impacto na cavidade oral dos pacientes. Monografia apresentada a Universidade Fernando Pessoa. Porto/ Portugal. 2010.

BARZILAI O, SHERER Y, RAM M, IZHAKY D, ANAYA JM, SHOENFELD Y: Epstein-Barr virus and cytomegalovirus in autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci*, Israel. v. 11, n. 08, p. 567-577, apr/may, 2007.

BOMBARDIERI, M. et al. The role of viruses in autoreactive B cell activation within tertiary lymphoid structures in autoimmune disease. *J of Leuk Biol*, Italy, v. 94, n. 118, p. 1191-99, dec, 2013.

BRAS-SILVA P.H. Recrutamento de Células Dendríticas e Linfócitos T imaturos reguladores (T reg) em lesões associadas ao Vírus Epstein-Barr (EBV): papel da citocina MIP3a. TESE DE DOUTORADO. USP- 2009.

BUOMBA. et al. Cytokine mRNA expression. In the labial salivar gland tissues from patients with primary Sjögren's Syndrome. *Br J Rheumatol*, Brasil, v. 34, n. 52, p. 326-33, fev/mar, 1995.

BUSAMIA B. et al. Assessing the determination of salivary electrolytes and anti-Ro and anti-La antibodies for the diagnosis of Sjögren's Syndrome (SS). *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. Argentina, v. 1, n. 15, p. 437-40, may, 2010.

CARROL V. A., et al. Natural Killer Cells Regulate Murine Cytomegalovirus-Induced Sialadenitis and Salivary Gland Disease. *J Virol*. USA, v. 4, n. 86, p. 2132-42, feb, 2012.

CHISHOLM D. M.; MASON D. K. Labial salivary gland biopsy in Sjögren's disease. *J Clin Pathol. UK*, v.2, n. 21, p.656-60, oct, 1968.

CISTERNA R. et al. Association between HIV and other DNA viruses *in vitro*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis. Italy*, v.14, n. 26, p. 591-6, jan, 1995.

COBB B. L. et al. Genes and Sjogren Syndrome. *Rheum Dis Clin N Am*, Ukraine, v.34, n. 67, p. 847-868, jun, 2008.

COROMINAS H. et al. Enfermedades Sistémicas autoinmunitarias: Síndrome de Sjogren. *Reumatología Clínica. Chile*, 2008; v. 4, n. 1, p. 22-27, agos, 2008.

COUGEROT A. Insuffisance progressive et atrophie des glandes salivaires et muqueuses, nasale, laryngee, vulvaire."Secheresse" de la bouche, des conjunctives, etc. *Bull Soc Fr Derm Syph, Lyon*, v. 32, n. 45, p. 376-379, jul, 1925.

CRAWFORD H. Biology and disease associations of Epstein-Barr virus. *Phil Trans R Soc Lond B, UK*, n.356, p. 461-73, apr/may, 2001.

CUELLO; P. et al. Chemokine expression and leucocyte infiltration in Sjögren Syndrome. *Br J Rheumatol. Brasil*, n.37, p. 779-83, nov/dez, 1998.

DANIELS T. et al. Associations between salivary gland histopathologic diagnoses and phenotypic features of Sjögren's syndrome among 1,726 registry participants. *Arthr Rheum, USA*, n. 63, p. 2021–2030, sep/oct, 2011.

DANIELS TE. et al. Sjögren International Clinical Collaborative Alliance Disponível em http://sicca.ucsf.edu/Labial_Salivary_Gland_Assessment.doc. Acesso em 10 de setembro de 2014.

DE FRANÇA T. et al. Salivary shedding of Epstein-Barr virus and cytomegalovirus in people infected or not by human immunodeficiency virus 1. *Clin Oral Investig. Brasil*, v. n. 2, p. 659-64, abr/mai, 2012.

DE WILDE P. et al. Aberrant expression pattern of the SS-B/La antigen in the labial salivary glands of patients with Sjögren Syndrome. *Arthritis Rheum. Canadá*, n. 39, p.783-91, nov, 1996.

DOLCETTI S et al. Characteristics of EBV-infected cells in HIV-related lymphadenopathy: implications for the pathogenesis of EBV-associated and EBV-unrelated lymphomas of HIV-seropositive individuals. *Int J Cancer, USA*, n. 63, p. 652-9, 1995.

EBERT. C. Gastrointestinal and hepatic manifestations of Sjogren syndrome. *J Clin Gastroenterol. USA*, v. 46, n. 1, p. 25-30, jan, 2012

ESCH T. R. Pathogenetic factors in Sjogren's syndrome: recent developments. *Crit Rev Oral Biol Med, Rep. Tech*, v. 12 n. 3, p. 244-51, feb, 2001.

FELBERG, S.; DANTAS, P.E.C. Diagnóstico e tratamento da Síndrome de Sjögren. Arquivos Brasileiros de Oftalmologia. Brasil, v. 69, n. 6, p. 959-963, jan/fev, 2006.

FERNANDES, J. et al. Xerostomia in Sjögren's syndrome and lupus erythematosus: a comparative histological and immunofluorescence study of minor salivary glands alterations. Journal of Cutaneous Pathology, USA, v. 37, n. 4, p. 432-8, apr, 2010.

FOX C.P. et al. Deciphering the role of Epstein-Barr virus in the pathogenesis of T and NK cell lymphoproliferations J Virol, USA, n. 55, p. 347-351, 2001.

FOX R. et al. Detection of Epstein-Barr virus-associated antigens and DNA in salivary gland biopsies from patients with Sjögren syndrome. J Immunol, USA, n. 137, p. 3162-8, 1986.

FOX, R. I. et al. Cytokine mRNA expression. In salivar gland bipsies of Sjögren's Syndrome. J Immunol, n. 152, p. 5532-39, 1994.

GIOVELLI, RAQUEL ALTOÉ. Análise histológica retrospectiva de glândula salivar menor em pacientes com Síndrome Seca. [Dissertação de Mestrado]. Espírito Santo; Centro de Ciências da Saúde; Universidade Federal do Espírito Santo; 2013.

GLEESON M. J. et al. Benign lymphoepithelial lesion: a less than benign disease. Clin Otolaryngol, USA, n. 11 p. 47-51, 1986.

GODWIN J. T. Benign lymphoepithelial lesion of the parotid gland (adenolymphoma, chronic inflammation, lymphoepithelioma, lymphocytic tumor, Mikulicz's disease): Report of eleven cases. Cancer, UK, n. 5:p. 1089-1103, 1952.

GOMES, R.S. et al. Síndrome de Sjögren Primária. Rev. Bras. Clínica Médica. Brasil, v. 8, n. 3, p. 254-265, mar/abr, 2010.

GROSS, A. J. et al., EBV and systemic lupus erythematosus: a new perspective. J. of Immun. v. 174 n. 11 p. 6599-607 2005.

HADDEN W. B. On "Dry Mouth" or suppression of the salivary and buccal secretions. Transc Clin Soc Lond , UK, n. 21, p. 176, 1888.

HAJEER A. H, Hutchinson IV. TNF-alpha gene polymorphism: clinical and biological implications. Microsc Res Tech. Rep Tech, v. 1, n. 50, p. 216-28, aug, 2000.

HALENIUS A. et al. Human cytomegalovirus and autoimmune disease. Biomed Res Int, USA, v. 10, n. 11, p. 72-78, apr, 2014.

HARLEY J. B. et al. Anti-Ro (SS-A) and anti-La (SS-B) in patients with Sjogren's syndrome.Arthritis Rheum, USA, v. 29, n. 2, p. 196-206, 1986.

HENDERSON, D. et al., Epstein-Barr virus coded BHRF1 protein, a viral homologue of Bcl-2, protects human B cells from programmed cell death. Proc. Of the Nat. Acad. Of Sci. of the USA. v 90, n 18, p. 8479-483, 1993.

HUDNALL S. D. et al. Distribution and phenotype of Epstein-Barr virus-infected cells in human pharyngeal tonsils. Modern Pathol, USA, n. 18, p. 519-27, 2005.

INOUE H. et al. Possible involvement of EBV-mediated alpha-fodrin cleavage for organ-specific autoantigen in Sjogren's syndrome. J Immunol, Japan, n. 166, p. 5801-9, 2001.

INOUE H; et al. Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Induction of EBV Reactivation as a Risk Factor for Sjogren's Syndrome, J Immunol, Japan, n. 188: p. 4654-4662, 2012.

INOUE H; et al. Analysis of antibody titers to Epstein-Barr virus nuclear antigens in sera of patients with Sjögren's syndrome and with rheumatoid arthritis. J. of Inf. Dis. v. 164 n. 1 p. 22-8. 1991.

IOACHIM H. et al. EBV-associated primary lymphomas in salivary glands of HIV-infected patients. Pathol Res Pract, n. 194, p. 87-95, 1998.

IWAKIRI D. et al. Epstein-Barr virus (EBV)-encoded small RNA is released from EBV-infected cells and activates signaling from Toll-like receptor3 J Exp Med, v. 206, n. 10, p. 2091-2099, 2010.

JIN JO, YOU Q. T Cell-Associated Cytokines in the Pathogenesis of Sjögren's Syndrome. J Clin Cell Immunol. v. 26, n. 9, p. 56-63, feb, 2013.

KANEGANE, H. et al., Viral interleukin-10 in chronic active Epstein-Barr virus infection. J. of Inf. Dis, v. 176, n. 1, p. 254-7, 1997.

KARAMERIS A. et al. P. Detection of the Epstein Barr viral genome by an in situ hybridization method in salivary gland biopsies from patients with secondary Sjögren's syndrome. Clin Exp Rheumatol. v. 10, n. 4, p. 327-32, jul/aug, 1992.

KRONBICHLER A. et al. Renal involvement connective tissues in autoimmune diseases. BMC: Medicine v.11, n. 95, p. 1741-7015, 2013.

LANE, H.C. et al. Presence of intracytoplasmatic IgG in the lymphocytic infiltrates of the minor salivary glands of patients with primary Sjögren's Syndrome. Clin Exp Rheumatol n. 1, p. 237-9, 1983.

LARRARTE, J. P. M.; PINEDA, Y. R. Síndrome de Sjogren. Revista Cubana de Medicina Cuba, v. 49, n. 2, p. 61-76, 2010.

LEÓN J. E, et al. Submandibular and sublingual glands involvement in advanced acquired immunodeficiency syndrome (AIDS): an autopsy-based study. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. v. 108, n. 2, p.216-26, aug, 2009.

LEÓN, J. E. Estudo histopatológico, imunoistoquímico e de hibridização in situ das glândulas submandibular e sublingual em pacientes autopsiados com aids em fase avançada TESE DE DOUTORADO. UNICAMP. 2009.

LERNER M. R .et al. Two small RNAs encoded by Epstein-Barr virus and complexed with protein are precipitated by antibodies from patients with systemic lupus erythematosus. *J. Leukoc. Biol.* v. 78, n. 2, p. 805-9, feb, 1988.

LIBÓRIO, TN. E et al. Evaluation of the genomic DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded oral samples archived for the past 40-year. *J Bras Patol Med Lab, Brasil*, v. 41, n. 6,p. 405-10, dez. 2005

LLAMAS-GUTIERREZ, FJ. et al. Histopathological environment besides the focus score in Sjögren's syndrome. *Int J Rheum Dis.* v. 10, n. 11, p. 56-65, oct, 2014.

LOPES F.F. et al. Estudo sobre xerostomia, fluxo salivar e enfermidades sistêmicas em mulheres na pós-menopausa. *Revista Gaúcha de Odontologia, Brasil*, v. 56, p. 2, p. 127-130, 2008.

LUCHESE, et al. The role of viruses in autoreactive B cell activation within tertiary lymphoid structures in autoimmune diseases. *J. Leukoc. Biol.* n. 94, p.1191–1199, 2013.

MAITLAND N.J.; SCULLY C. Frequency of EBV-DNA detection in Sjögren syndrome. *Am J Med*, n. 96, p. 97-8, 1994.

MANOUSSAKIS M. N.; DIMITRIOU I. D.; KAPSOUGEORGOU E.K. et al. Expression of b7 costimulatory molecules by salivary gland epithelial cells in patients with (primary) Sjögren syndrome. *Arthritis Rheum*, n. 42 p. 229-39, 1999.

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

MANOUSSAKIS M. N. et al. Detection of human-specific anti-La (SSB) autoantibodies in patients with rheumatoid arthritis. *J Autoimmun*, v. 8, n. 6, p. 959-69, 1995.

MARGAIX-MUÑOZ, M. et al. Sjögren's syndrome of the oral cavity. Review and update. *Med. Oral Patol. Cir Bucal. Brasil*, v. 4, n. 7, p. 325-330, jul, 2009.

MARIETTE X. et al. Detection of Epstein-Barr virus DNA by in situ hybridization and polymerase chain reaction in salivary gland biopsy specimens from patients with Sjögren's syndrome. *Am J Med*, v. 90, n. 3, p. 286-94, mar, 1991.

MARTIN R.et al. Burkitt's lymphoma: The Rosetta Stone deciphering Epstein-Barr virus biology *Semin Cancer Biol*, v. 19, n. 6, p. 377–388, dec, 2009.

MAVRAGANI C. P.; MOUTSOPOULOS H. M. The Geoepidemiology of Sjogren Syndrome. *Autoimmunity Reviews*, n. 9, n. 305-310, 2010.

MENELAOS et al. The Role of Epithelial Cells in the Pathogenesis of Sjögren's Syndrome. *Clinic Rev Allerg Immunol*, v. 32 p. 225–230, 2007.

MIKULICZ J. H. Über eine eigenartige symmetrische Erkrankung der Tränen- und Mundspeicheldrüsen. *Beitr Chir Fortschr Gewidmet Theodor Bilroth*, Stuttgart, p. 610-630, 1892.

MISSALA I. e al. A Systematic Literature Review of the Association of Lipoprotein (a) and Autoimmune Diseases and Atherosclerosis. *Int J Rheumatol*, p. 1-10, 2012.

MIYASSAKA, et al. Possible involvement of Epstein-Barr virus (EBV) in polyclonal B-cell activation in Sjögren's syndrome. *J. of Autoim*, v. 2, n.4, p. 427-432. 1989.

MORAES, M. et al. Síndrome de Sjögren: Conceitos atuais e manejo das manifestações orais. *Brasília Médica. Brasil*, v. 47, n. 2, p. 238-243, 2010.

MORGAN W.; CASTLEMAN B. A clinicopathologic study of Mikulicz's disease. *Am J Pathol*, n. 29, p. 471-503, 1953.

MOUSOPOULOS H. Sjogren Syndrome or Autoimmune Epitelitis? *Clinic Rev Allerg Immunol*, n. 32, p. 199–200, 2007.

MULOCK A.W. Keratitis filamentosa and chronic arthritis. *Trans Ophthal Soc, UK*, n. 47, p. 88, 1927.

MUNZ, C. J. D. Lunemann, et al. Antiviral immune responses: triggers of or triggered by autoimmunity? *Nat. Rev. Immunol.* n. 9, p. 246–258, 2009.

NAGATA Y. et al., Activation of Epstein-Barr virus by saliva from Sjögren's syndrome patients. *Imm.* v. 111, n. 2, p. 223-9, 2004.

NEVILLE, B.W.; DOUGLAS D.D.; ALLEN, C.M.; et al. *Patologia Oral & Maxilofacial*. 3.ed. Rio de Janeiro:Editora Guanabara Koogan, 2009.

NEWKIRK M. M. et al. Detection of cytomegalovirus, Epstein-Barr virus and herpes virus-6 in patients with rheumatoid arthritis with or without Sjögren's syndrome. *Br J Rheumatol. Brasil*, v. 33n. 4, p. 317-22, apr, 1994.

OGBUREK, K.U. et al. Up-regulation of SIBLING proteins and correlation with cognate MMP expression in oral cancer. *Oral Oncol*, v. 43, n. 9, p. 920-32, feb, 2007.

ORIGGI L, et al. Antibodies to Epstein-Barr virus and cytomegalovirus in primary Sjogren's syndrome. *Boll Ist Sieroter Milan, Italy*, v. 67, n. 4, p. 265-74, 1988.

PASOTO, S. G. et al. EBV reactional serological profile in primary Sjögren's syndrome: an underlying trigger of active articular involvement? *Rheum. Int.* v. 2, n.2, p. 101-9, 2013.

PEREIRA, D.-L. et al. Clinical and laboratorial profile and histological features on minor salivary gland from patients under investigation for Sjögren's syndrome. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal, Brasil*, v. 19, n. 3, p. 237-41, may, 2014.

PFLUGFELDER, S. C. et al. Epstein –Barr virus and the lacrimal gland pathology of Sjögren's syndrome. *Am. J. of Pat.* v. 143, n.1, p. 49-64, 1993.

POOLE, D. B. et al., Lupus-like autoantibody development in rabbits and mice after immunization with EBNA-1 fragments. *J. of Autoimm.* v. 311, n. 4, p. 362-71, 2008.

REICHLIN M, REICHLIN M. W. Autoantibodies to the Ro/SS-A particle react preferentially with the human antigen. *J Autoimmun.* v. 2, n. 4, p. 359-65, 1989.

RISSELADA, et al. The role of ectopic germinal centers in the immunopathology of primary Sjögren's syndrome: a systematic review. *Semin Arthritis Rheum*, v. 42, n. 4, feb, p. 368-76, 2013.

RIVERA H. et al. Histopathological analysis and demonstration of EBV and HIV p-24 antigen but not CMV expression in labial minor salivary glands of HIV patients affected by diffuse infiltrative lymphocytosis syndrome. *J Oral Pathol Med*, n. 32, p.431-7, 2003.

ROESCHER, N. et al. Cytokines in Sjögren's Syndrome. *Oral Dis.* v. 15, n. 8, p. 519-526, nov, 2009.

ROSEN A, CASCIOLA-ROSEN L. Autoimmune Tissue Damage Altered Autoantigen Structure in Sjögren's Syndrome: Implications for the Pathogenesis of Autoimmune Tissue Damage. *Crit Rev Oral Biol Med.* n. 15, p. 156-164, 2004.

SAITO, I et al. Detection of Epstein-Barr virus DNA by polymerase chain reaction in blood and tissues biopsies from patients with Sjögren's syndrome. *J. of exp. Med.* v. 169, n. 6, p. 2191-8. 1989

SASAKI, R.T.; RICCI, T.C.; LIMA-ARSATI, Y.B.O.; BASTING, R.T. Alterações bucais em pacientes com Síndrome de Sjögren. *Arquivos em Odontologia, Belo Horizonte/MG.* v. 42, n. 3, p. 161-256, jul/set, 2006.

SCHAFFER A. et al. Mikulicz's disease. A report of ten cases. *Amer J Dis Child.* N. 34, p. 327-346, 1927.

SCOFIELD H. et al. Immunization with short peptides from the sequence of the systemic lupus erythematosus-associated 60-kDa Ro autoantigen results in anti-Ro ribonucleoprotein autoimmunity. *J Immunol.* v. 156, n. 10, p.4059-66, 1996.

SCOFIELD, A. M. et al, Relation of Sensory Peripheral Neuropathy in Sjögren Syndrome to Anti-Ro/SSA JCR: *Jour of Cl Rheumatol*, v. 18 .n. 6, p. 290-293, 2012.

SCOTT, J. Qualitative and quantitative observations on the histology of human labial salivary glands obtained post mortem. *J Biol Buccale.* v. 8, n. 3, p. 187-200, sep, 1980.

SCULLY C. Sjögren's syndrome: no demonstrable association by serology of secondary Sjögren's syndrome with cytomegalovirus. *J Oral Pathol Med*, v. 19, n. 1, p. 43-4, jan, 1990.

SHILLITOE E. J, et al. Antibody to cytomegalovirus in patients with Sjogren's syndrome: as detected by enzyme linked immunosorbent assay. *Arthritis Rheum*, n. 25, p. 260-5, 1982.

SHOENFELD Y. et al. The mosaic of autoimmunity: prediction, autoantibodies, and therapy in autoimmune diseases—2008. *Isr Med Assoc J*, Israel, n. 10, p. 13–19, 2008.

SILVA, L.F.G. Estudo sobre o fluxo salivar e xerostomia em mulheres na pré e pós-menopausa. *Pesq. Bras. Odontoped. Clín. Integr. Brasil*, v. 7 n. 2, p. 125- 129, 2007.

SILVEIRA KSAB. Estudo da expressão dos auto-antígenos SS-A/Ro (polipeptídeos 52kda e 60kda) e SS-B/La (polipeptídeo 48kda) e de seus RNAs mensageiros em glândulas salivares menores de pacientes com síndrome de Sjögren. [Tese de Doutorado]. São Paulo; Escola Paulista de Medicina; Universidade Federal de São Paulo; 2006

SJÖGREN H. S. Zur Kenntniss der Keratoconjunctivitis sicca (Keratitis follicularis bei hypofunktion der Tranen-drusen). *Acta Ophthalmol*, p. 151-162, 1933.

SOARES M. S. et al. Avaliação do fluxo salivar, xerostomia e condição psicológica em mulheres com síndrome da ardência bucal. *Revista de Odontologia da UNESP, Brasil*, v. 37, n. 4, p. 15-19, 2008.

SOUZA, P. et al. Diagnostic Approaches to Sjögren's Syndrome: a Literature Review and Own Clinical Experience. *J Oral Maxillofac Res*, v. 3, n. 1, p. 87-93, jan/mar, 2012.

SPEIGHT, P. M. et al. Quantification of plasma cells in labial salivary glands: increased expression. F IgM in Sjögren's Syndrome. *J Oral Pathol Med* n. 199, p. 126-30, 1990.

ST CLAIR E.W. et al. Temporal correlation of antibody responses to different epitopes of the human La autoantigen, v. 85, n. 2, p. 515-21, 1990.

SZABO, K. et al. The Histopathology of Labial Salivary Glands in Primary Sjögren's Syndrome: Focusing on Follicular Helper T Cells in the Inflammatory Infiltrates. v. 14, n. 3, p. 631-642, 2014.

TELENTI A. et al. Epstein-Barr vírus infection in HIV-positive patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, n. 12, p. 601-609, 1993.

TENGNÉR P. et al. Detection of anti-Ro/SSA and anti-La/SSB autoantibody-producing cells in salivary glands from patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum*. v. 41, n. 12, p. 2238-48, 1998.

TINCANI A. et al. Novel aspects of Sjögren's syndrome in 2012 *BMC Medicine*, v. 11 n. 93, p. 203-215, 2013.

TODA M. et al. Sjögren's Syndrome (SS) and Epstein-Barr virus (EBV) reactivation, *Oc. Immu. and Inflamm.* v. 2, n. 2, p. 101-9, 1994.

TRIANAFYLOPOULOU A, MOUTSOPOULOS H. Persistent viral infection in primary Sjogren Syndrome: Review and Perspectives. *Clinic Rev Allerg Immunol.* n. 32, p. 210-214, 2007.

TZIOUFAS A. et al. Clinical, immunological, and immunogenetic aspects of autoantibody production against Ro-SSA, La-SSB and their linear epitopes in primary Sjögren's syndrome *Ann Rheum Dis*, n. 61, p. 398–404, 2002.

TZIOUFAS A. et al. Autoantibodies to La/SSB in patients with primary Sjögren's syndrome (pSS) are associated with upregulation of La/SSB mRNA in minor salivary gland biopsies (MSGs). *J Autoimmun.* v. 13, n. 4, p. 429-34, dec, 1999.

VALIM V. et al. Primary Sjögren's syndrome prevalence in a major metropolitan area in Brazil. *Rev Bras Reumatol. Brasil*, v. 53, n. 1, p.24-34, feb, 2013.

VAN DE BERG P. J. et al. Cytomegalovirus induces systemic immune activation characterized by a type 1 cytokine signature. *J Infect Dis*, n. 202: p. 690-699, 2010.

VAN VOOREN J. P. et al. Acute Sjögren-like syndrome as the first manifestation of a generalized CMV infection in a patient with AIDS. *J Laryngol Otol.* v. 109, n. 11, p. 1113-4, 1995.

VARANI S.; LANDINI P. L. Cytomegalovirus induced immunopathology and its clinical consequences. *Hepesviridae.* V. 3, n. 3, p. 6-20, 2011.

VENABLES P. J. et al. Persistence of Epstein-Barr virus in salivary gland biopsies from healthy individuals and patients with Sjögren's syndrome. *Clin Exp Immunol.* v. 75, n. 3, p. 359-64, mar, 1989.

VITALI, C. et al. Preliminary criteria for the classification of Sjögren's syndrome. Results of a prospective concerted action supported by the European Community. *Arthritis Rheum*, n. 36 p. 340-7, 1993.

VITALI, C. et al. The European Study Group on Classification Criteria for Sjögren's Syndrome. Classification criteria for Sjogren's Syndrome: a revised version of the european criteria proposed by The American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis*, n. 61, p. 554- 558, 2002.

VIVINO F. B. et al. Change in final diagnosis on second evaluation of labial minor salivary gland biopsies. *J Rheumatolog*, v. 12, n, 33, p. 344-357, 2012.

WEN S. et al Association of Epstein-Barr virus (EBV) with Sjögren's syndrome: differential EBV expression between epithelial cells and lymphocytes in salivary glands. *Am J Pathol.* v. 149, n. 5, p. 1511-1523, nov, 1996.

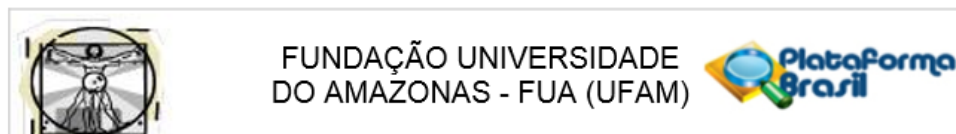
WHITCHER J.P. et al. A simplified quantitative method for assessing keratoconjunctivitis sicca from the Sjögren's Syndrome International Registry. *Am J Ophthalmol.* v. 149, n. 3, p. 405-15, 2010.

WUCHERPFENNING K. W. et al., Mechanisms for the induction of autoimmunity by infectious agents. *J. of Clin. Invest.* v. 108, n. 8, p. 1097-104, 2001.

YAMAOTO M, et al. Clinical and pathological characteristics of Mikulicz's disease (IgG4-related plasmacytic exocrinopathy). *Autoimmun Rev.* v. 4 n. 4, p. 195-200, apr, 2005.

ZENONE, T. Parotid gland non-Hodgkin lymphoma in primary Sjögren syndrome, *Rheumatol Int.* v. 32, n. 5, p. 1387-90, may, 2013.

ZHU J. Cytomegalovirus infection induces expression of 60 KD/Ro antigen on human keratinocytes. *Lupus . Rev.* v. 4, n. 5, p. 396-406, 1995.

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

Título da Pesquisa: Estudo da Glândula Salivar Menor em pacientes com Síndrome de Sjögren: análise histopatológica do infiltrado inflamatório e associação com o vírus EBV

Pesquisador: Antonio Jorge Araujo de Vasconcelos II

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 39573214.2.0000.5020

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 925.177

Data da Relatoria: 16/12/2014

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Tendo em vista as solicitações atendidas, somos de parecer favorável a aprovação

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

MANAUS, 22 de Dezembro de 2014

Assinado por:
Eliana Maria Pereira da Fonseca
(Coordenador)



ANEXO B

FICHA DE ANÁLISE

No PC: _____

HISTOLOGIA (HE):

GRAU DE INFILTRADO INFLAMATÓRIO:

- 0 Ausência de alterações histológicas
- 1 Infiltrado em grau leve
- 2 Infiltrado em grau moderado
- 3 Formação de um foco
- 4 Formação de mais de um foco

Presença EBV

SIM

NÃO

()

()

Localização: _____

Linfócito

B

(localização) _____

Linfócito

T

(localização): _____



ANEXO C

Ficha “Estudo da glândula salivar menor de pacientes com Síndrome de Sjögren: análise histopatológica, caracterização do infiltrado inflamatório e associação com o vírus EBV”,

IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE

Número do registro na

FAO: _____

Número do registro no

estudo: _____

Sexo: _____ Raça: _____ Procedência:

Data e local de Nascimento: _____

Idade: _____

Doença auto-imune

presente: _____

História familiar de doença auto-

imune: _____

DADOS PARA CHECAGEM SOBRE A DOENÇA

Dados complementares importantes:

Doença auto-imune isolada () Qual?

Testes objetivos:

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

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

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

Presença do fator reumatóide: () Positivo () Negativo

Biópsia: _____

ANEXO D

Critérios de classificação para Síndrome de Sjögren

I. Sintomas oculares: resposta positiva para pelo menos uma das seguintes questões:

Você tem olho seco, diariamente, persistentemente, há mais de 3 meses?

Você tem a sensação recorrente de areia nos olhos?

Você necessita do uso de lágrima artificial mais de 3 vezes ao dia?

II. Sintomas orais: resposta positiva para pelo menos uma das seguintes questões:

Você tem sensação de boca seca, diariamente, há mais de três meses?

Você tem inchaço das glândulas salivares, recorrente ou persistente, enquanto adulto?

Você frequentemente ingere líquidos para facilitar a deglutição, principalmente de alimentos secos?

III. Sinais oculares: resposta positiva para pelo menos um dos seguintes testes:

Teste de Schirmer (realizado sem anestesia): ≤ 5 mm em 5 minutos

Escore de rosa bengala ou outro escore ocular: ≥ 4 de acordo com o escore de van Bijsterveld's

IV. Alterações histológicas: escore focal* ≥ 1 na biópsia de glândulas salivares menores.

Foco é definido como aglomerado de pelo menos 50 células mononucleares, enquanto que escore focal é definido como número de focos por 4 mm² de tecido glandular*.

V. Envolvimento da glândula salivar: resposta positiva para pelo menos um dos seguintes testes:

Cintilografia da glândula salivar: mostrando atraso na captação, redução da concentração e/ou atraso na excreção do contraste.

Sialografia de parótida: com a presença de sialectasias difusas (padrão pontilhado, cavitário ou destrutivo), sem evidencia de obstrução nos ductos maiores.

Fluxo salivar não estimulado: $\leq 1,5$ mL em 15 minutos

VI. Autoanticorpos: presença de pelo menos um dos seguintes autoanticorpos séricos:

Anti-Ro (SS-A)

Anti-La (SS-B)

Regras para Classificação

pSS: em pacientes sem doenças associadas, a forma primária pode ser definida segundo um dos itens abaixo:

Presença de pelo menos 4 critérios, dos 6, desde que o critério IV ou o VI sejam positivos.

Presença de pelo menos 3 dos 4 critérios objetivos (III, IV, V e VI)

aSS: pacientes com doença estabelecida do tecido conjuntivo e:

Presença do critério I ou II mais pelo menos dois dos seguintes critérios: III, IV e V.

Critérios de exclusão:

Radioterapia de cabeça e pescoço no passado;

Hepatite C;

Síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA);

Linfoma pré-existente;

Sarcoidose;

Doença enxerto *versus* hospedeiro;

Uso de fármacos anticolinérgicos (desde que os sintomas clínicos estejam presentes por período menor do que 4 vezes a meia vida do fármaco).

American- European Consensus Group (VITALI et al. 2002)

