WANEISSA SIQUEIRA CAVALCANTE GODOY

**Xerostomia em doença autoimune com envolvimento glandular: estudo
morfométrico das células dendríticas no mecanismo do
comprometimento das glândulas salivares na Síndrome de Sjögren**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutora em Ciências

Programa de Dermatologia

Orientador: Prof. Dr. Marcello Menta Simonsen Nico

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Ferraz da Silva

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Godoy, Wanessa Siqueira Cavalcante
Xerostomia em doença autoimune com envolvimento
glandular : estudo morfométrico das células
dendríticas no mecanismo do comprometimento das
glândulas salivares na Síndrome de Sjögren / Wanessa
Siqueira Cavalcante Godoy. -- São Paulo, 2019.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Dermatologia.
Orientador: Marcello Menta Simonsen Nico.
Coorientador: Luiz Fernando Ferraz da Silva.

Descritores: 1.Síndrome de Sjögren 2.Glândulas
salivares menores 3.Células Dendríticas 4.Linfócitos
T 5.Linfócitos B 6.Centro germinativo

USP/FM/DBD-164/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Dedicatória

Ao *Deus triúno*, criador do universo e de tudo que nele existe. Ao Senhor toda honra, glória, poder, majestade, sabedoria, domínio e louvor pela graça imerecida, pela vida e por conduzir meus passos em todo o caminho percorrido.

Ao meu grande parceiro de vida e sonhos, Sr. *Lucas Mendes Godoy*, por sua beleza interior, capaz de abdicar dos seus próprios sonhos para que eu realizasse os meus. Suas palavras de sabedoria, dedicação, tranquilidade e amor foram essenciais para que eu chegasse até aqui.

Aos meus queridos pais, Sr. *Willian da Silva Cavalcante* e Sra. *Eliane Siqueira*, irmãos, Sr. *Willian da Silva Cavalcante Filho* e Sra. *Carla Valéria Siqueira Melo*, e sobrinho, Sr. *Ryan Roberto Moura*, nada me afastará do amor que sinto por vocês e da gratidão pela educação, sabedoria, aconchego, incentivo, exemplo de vida e princípios de excelência ensinados. Vocês são minha inspiração para a vida!

Minha eterna admiração, amor, amizade, carinho, respeito e gratidão pela vida de vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos

À Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pela valiosa contribuição para minha formação acadêmica.

Ao *Prof. Dr. Marcello Menta Simonsen Nico*, pelo acolhimento em sua equipe e por todo ensino no ambulatório de estomatologia. Obrigada por sanar minhas dúvidas sempre com muita clareza e tranquilidade. Como é bom conhecer um profissional que ama o que faz e o faz com excelência.

À *Profa. Dra Silvia Vanessa Lourenço*, pelo amor e dedicação ao universo acadêmico, por me ensinar como é importante fazer o nosso melhor e acreditar no potencial de sua equipe. Obrigada pela colaboração tão essencial desde o início desta pesquisa. Minha gratidão pela oportunidade que me foi concedida, por todo tempo que passamos juntas, pelos ensinamentos transmitidos e por me propiciar maior deslumbre com a ciência.

Ao *Prof. Dr Luiz Fernando Ferraz da Silva (Burns)*, por sua bondade em me ajudar sempre que precisei, por transmitir seus brilhantes conhecimentos científicos, especificamente, em morfometria e estatística. Obrigada por sua generosidade. Tenho profunda admiração pela pessoa que é.

Aos meus colegas de pós-graduação, Sra. *Ana Hoyos*, Sra. *Camila Gavioli*, Sra. *Cláudia Arruda*, Srta. *Cibele Nagano*, Sra. *Daniela Farias*, Sra. *Fernanda de Paula*, Sra. *Gessica Melo*, Srta. *Giovanna Florezi*, Sra. *Jaciane Fernandes*, Srta. *Jaqueline Vaz*, Sr. *Leonardo Koyama*, Sra. *Luciana Munhoz*, Sra. *Milena Antunes*, Srta. *Raquel Silva*, Sra. *Renata Pereira*, Sr. *Ricardo Hshieh*, Sra. *Sheyla Bologna*, Sra. *Tatiana Teshima*, Srta. *Thais Borguezan* e Srta. *Verônica Otoni*, pela companhia, amizade, palavras de incentivo, contribuições nesta pesquisa e por todo tempo que passamos juntos.

Às professoras *Dra. Cláudia Malheiros Coutinho-Camilo*, *Dra. Mirian Nacagami Sotto* e *Dra. Sandra Gofinet Pasoto* pelas preciosas considerações realizadas durante e após o exame de qualificação, por dedicarem tempo e conhecimento científico para que esta tese ficasse ainda mais digna.

Aos professores, demais colegas e profissionais do Laboratório de Técnicas Imunomoleculares (LIM-06) do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, pelo convívio, pelo carinho e por me permitirem usar toda a infraestrutura necessária. Principalmente à *Dra. Ana Maria Gonçalves Silva*, por não medir esforços em sanar minhas dúvidas quanto à parte técnica desta pesquisa, por seus admiráveis conselhos, exemplos de amor e dedicação. Ao *Prof. Dr. Thales de Brito* por me permitir participar de suas excelentes aulas de anatomia patológica e propiciar um belo aprendizado na área. À *Sra. Francisca de Fátima Valentim*, à *Sra. Marlene Vandes da Silva*, ao *Prof. Dr. Ronaldo Cesar Borges Gryschek*,

à *Dra. Fabiana Martins de Paula* e toda sua equipe pelo incentivo à pesquisa. Me sinto muito honrada pela oportunidade de conviver diariamente com vocês.

Aos demais professores, colegas e profissionais do Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina de São Paulo, em especial, à *Sra. Ruth Eugênio Meneses*, ao *Sr. Marcelo Alves da Silva*, ao *Sr. Rodrigo Nakagawa*, por todo auxílio administrativo. Ao *Sr. Amadeo Ferreira dos Santos*, à *Sra. Rosângela Evangelista de Sousa*, *Sra. Roberta Cristina do Nascimento*, *Sra. Márcia Aparecida Castro* e *Sra. Sandra Maria Silva* por serem impecáveis na atenção aos pacientes e aos pós-graduandos. Me sinto honrada pelo tempo de aprendizado que tive no Hospital das Clínicas de São Paulo.

Aos demais professores, colegas e profissionais técnicos do Departamento de Patologia e do Serviço de Verificação de Óbitos de São Paulo ligados à Faculdade de Medicina de São Paulo, em especial, ao *Dr. Amaro Nunes Duarte Neto* por seus ensinamentos, à *Sra. Sonia Maria Neumayr* por toda atenção e auxílio administrativo, ao *Sr. Reginaldo Silva do Nascimento* e *Sr. Carlos Alberto Santos Lima* pelo cuidado na digitalização de todas as lâminas deste estudo.

A *todos os pacientes* que, por meio de um gesto solene, permitiram com que fossem realizados estudos com seu material biológico, os quais compuseram a casuística desta pesquisa.

Aos *professores* que compõem a banca examinadora desta tese, pela honra em avaliarem esta pesquisa. A presença de vocês agrega ainda mais respeitabilidade e valor a este estudo.

A *todos meus familiares*, em especial, à *Sra. Idenir Andrade*, à *Sra. Márcia Maria Batista*, à *Sra. Marlene Cavalcante*, ao *Dr. Marcos Godoy*, à *Sra. Marli Godoy*, ao *Sr. Robério Cavalcante* e ao *Sr. Roberto Moura* pelas palavras de incentivo e exemplo de perseverança.

Aos *meus amigos*, especialmente, à *Sra. Leci Maria de Jesus*, à *Sra. Daniele Braide Tartaglia*, ao *Sr. Davi Favarato*, ao *Dr. Jairo Ferreira*, à *Sra. Jaqueline Lunz Guio*, à *Sra. Margarida Candido Rodrigues*, e à *Igreja Presbiteriana de Higienópolis (IPH)* por todo auxílio durante essa trajetória e por orarem por mim.

À *Coordenação de Auxílio Pessoal de Nível Superior (CAPES)* pela bolsa de Doutorado no programa Demanda Social.

ΕΠΙΓΡΑΦΕ

Epígrafe

Tudo quanto fizerdes, fazei-o de todo o coração [...]
(Colossenses 3:23 – Versão Almeida Revista e Atualizada)

Normatização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

SUMÁRIO

Sumário

Lista de Figuras

Lista de Quadros

Lista de Tabelas

Lista de Siglas

Lista de Símbolos

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	30
2 OBJETIVOS.....	33
2.1 OBJETIVO GERAL	33
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
3 REVISÃO DE LITERATURA	35
3.1 GLÂNDULAS SALIVARES	35
3.1.1 Histologia das glândulas salivares	35
3.1.2 Morfologia das glândulas salivares maiores	37
3.1.3 Morfologia das glândulas salivares menores	39
3.1.4 Inervação das glândulas salivares	40
3.2 FISILOGIA	42
3.2.1 Composição e funções da saliva	42
3.2.2 Mecanismo de secreção salivar	44
3.3 HIPOSSALIVAÇÃO E XEROSTOMIA	46
3.4 SÍNDROME DE SJÖGREN PRIMÁRIA.....	47
3.4.1 Fisiopatologia e patogenia da Síndrome de Sjögren primária	49
3.4.2 Critérios para a classificação da Síndrome de Sjögren primária	53
3.4.3 Aspectos clínico-sistêmicos da Síndrome de Sjögren primária ..	55
3.4.4 Autoanticorpos circulantes	55
3.4.5 Classificação morfológica da Síndrome de Sjögren com base na histologia das glândulas salivares mucosas	57
3.5 PAPEL DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS NA IMUNOPATOGENESE DA SÍNDROME DE SJÖGREN PRIMÁRIA.....	58
3.6 BIOMARCADORES: DEFINIÇÃO E EXPRESSÃO	65
3.6.1 Marcadores de células dendríticas	65
3.6.1.1 Proteína CD1a.....	65

3.6.1.2 Proteína Langerina	66
3.6.1.3 Proteína CD21	67
3.6.1.4 Proteína CD123 (ILR3- α).....	68
3.6.2 Marcador da imunidade inata	69
3.6.2.1 Proteína CD68.....	69
3.6.3 Marcadores de linfócitos.....	70
3.6.3.1 Proteína CD3 ϵ	70
3.6.4 Proteína CD4	72
3.6.5 Proteína CD8	73
3.6.6 Proteína CD20	74
3.6.7 Proteína Bcl6	75
4 MÉTODOS	78
4.1 CASUÍSTICA.....	78
4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	79
4.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	80
4.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	80
4.4.1 Análise dos focos inflamatórios, gravidade da lesão e de centros germinativos	81
4.5 TÉCNICA IMUNOISTOQUÍMICA	82
4.6 ANÁLISE MORFOMÉTRICA.....	84
4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	93
5 RESULTADOS	96
5.1 DESCRITIVO	96
5.1.1 Dados descritivos categóricos dos grupos caso e controle	96
5.1.2 Dados descritivos contínuos. Comparação dos dados morfométricos entre grupo caso e grupo controle	101
5.1.3 Comparação dos dados morfométricos com a intensidade do infiltrado inflamatório – análise somente do grupo caso.....	115
5.1.4 Comparação dos dados morfométricos com o centro germinativo – análise somente do grupo caso	119
5.1.5 Correlação dos dados morfométricos, ESSDAI, tempo de diagnóstico e escore focal	123
5.1.5.1 CD1a	123
5.1.5.2 Langerina	123
5.1.5.3 CD21	124
5.1.5.4 CD123	124

5.1.5.5 CD3	125
5.1.5.6 CD4	125
5.1.5.7 CD8	125
5.1.5.8 CD20	126
5.1.5.9 CD68	126
5.1.5.10 BCL6	126
5.1.5.12 Escore focal.....	126
5.1.5.11 Índice de atividade da doença – ESSDAI.....	127
6 DISCUSSÃO	132
6.1 LIMITAÇÕES DO ESTUDO	147
6.2 PERSPECTIVAS DO ESTUDO.....	148
7 CONCLUSÕES	150
Anexos.....	152
Anexo A - Critérios diagnósticos da Síndrome de Sjögren baseados no Consenso do Grupo Americano-Europeu (VITALI <i>et al.</i> , 2002)....	152
Anexo B - Critérios diagnósticos da Síndrome, baseados no Consenso <i>Sjögren's International Collaborative Clinical Alliance</i> (SICCA), segundo <i>American College of Rheumatology</i> (Shiboski <i>et al.</i> , 2012)	154
Anexo C - Critérios diagnósticos da Síndrome de Sjögren segundo American College of Rheumatology - ACR - e European League Against Rheumatism – EULAR (Shiboski <i>et al.</i> , 2017).	155
Anexo D - ESSDAI: EULAR Sjögren's Syndrome Disease Activity Index	157
Anexo E - Critérios para laudo padrão do Laboratório de Dermatopatologia do HC-FMUSP.....	160
REFERÊNCIAS.....	163
Apêndices	

LISTAS

Lista de Figuras

Figura 1 - Sistema ductal da glândula salivar.....	36
Figura 2 - Inervação glandular: controle da secreção salivar	41
Figura 3 - Mecanismo de secreção salivar	45
Figura 4 - Esquema do ciclo vicioso da patogenia da SSp.....	51
Figura 5 - Esquema dos fatores que contribuem para a patogenia da alteração da função das glândulas salivares na SSp.	53
Figura 6 - Resposta imunológica inata e reposta imunológica adaptativa.....	59
Figura 7 - Origem hematopoética das células dendríticas mielóides, células de Langerhans e plasmocitoides.....	61
Figura 8 - Mecanismo de envolvimento das células dendríticas na SSp.	64
Figura 9 - Imagem digitalizada inicial de glândula salivar mucosa de paciente com SSp	85
Figura 10 - Seleção da área ductal de glândula salivar mucosa de paciente com SSp	86
Figura 11 - Seleção de todas as áreas ductais existentes em glândula salivar mucosa de paciente com SSp	86
Figura 12 - Área positiva ductal	87
Figura 13 - Soma da área positiva ductal	87
Figura 14 - Soma da área total ductal	88
Figura 15 - Seleção da área glandular em espécime de paciente com SSp ...	88
Figura 16 - Outras áreas glandulares a serem demarcadas em espécime de paciente com SSp	89

Figura 17 - Seleção de todas as áreas de parênquima glandular em espécime de paciente com SSp	89
Figura 18 – Soma da área positiva glandular	90
Figura 19 - Soma da área total glandular	90
Figura 20 – No detalhe, a seleção específica da área glandular	91
Figura 21 - Seleção da área total do espécime do paciente com SSp	91
Figura 22 - Soma da área positiva total do espécime de paciente com SSp...	92
Figura 23 - No detalhe, positividade na região de tecido de substituição, especificamente entre adipócitos	92
Figura 24 - Soma da área total de glândula salivar mucosa de paciente com SSp	93
Figura 25 - Exemplos fotomicrográficos dos graus de intensidade do infiltrado inflamatório	99
Figura 26 - Representações gráficas dos dados morfométricos significantes da comparação entre os grupos caso e controle	104
Figura 27 - Fotomicrografias das proteínas CD1a e Langerina	105
Figura 28 - Fotomicrografias das proteínas CD21 e CD123.....	107
Figura 29 - Fotomicrografias das proteínas CD3 e CD4.....	109
Figura 30 - Fotomicrografias das proteínas CD8 e CD20.....	111
Figura 31 - Fotomicrografias das proteínas CD68 e BCL6.....	113
Figura 32 - Representações gráficas entre os dados morfométricos significantes e a intensidade do infiltrado inflamatório	118
Figura 33 - Representações gráficas dos dados morfométricos significantes da comparação entre a presença e a ausência de centro germinativo	122

Lista de Quadros

Quadro 1: Composição salivar	43
Quadro 2: Órgãos acometidos e manifestações clínicas na SSp.....	48
Quadro 3: Resumo dos protocolos encontrados para cada anticorpo.....	83
Quadro 4: Proposta para classificação de centros germinativos na síndrome de Sjögren	138

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Caracterização do grupo caso. Dados sociodemográficos, clínicos, sorológicos e histopatológicos – HCFMUSP – 2015 a 2019	98
Tabela 2 – Caracterização do grupo controle. Dados sociodemográficos – HCFMUSP – 2015 a 2019.....	98
Tabela 3 - Dados descritivos contínuos. Comparação dos dados morfológicos entre os grupos caso e controle. Análise das proteínas CD1a, Langerina, CD21, CD123, CD68, CD3 e CD8 – HCFMUSP – 2015 a 2019 ..	102
Tabela 4 - Dados descritivos contínuos. Comparação dos dados morfológicos entre os grupos caso e controle. Análise das proteínas CD4, CD20, BCL6 – HCFMUSP – 2015 a 2019.....	103
Tabela 5 - Comparação dos dados morfológicos com a intensidade do infiltrado inflamatório (grupo caso) e estatísticas descritivas das análises morfológicas. Análise das proteínas CD1a, Langerina, CD21, CD123, CD68, CD3 e CD8 – HCFMUSP – 2015 a 2019	116
Tabela 6 - Comparação dos dados morfológicos com a intensidade do infiltrado inflamatório (grupo caso) e estatísticas descritivas das análises morfológicas. Análise das proteínas CD3, CD8, CD4, CD20 e BCL6 – HCFMUSP – 2015 a 2019.....	117
Tabela 7 - Comparação dos dados morfológicos com o centro germinativo (grupo caso) e análise descritiva da morfometria. Análise das proteínas CD1a, CD21, CD123, Langerina, CD68, CD3 e CD8 – HCFMUSP – 2015 a 2019 ..	120
Tabela 8 - Comparação dos dados morfológicos com o centro germinativo (grupo caso) e análise descritiva da morfometria. Análise das proteínas CD4, CD20 e BCL6 – HCFMUSP – 2015 a 2019.....	121
Tabela 9 – Correlação entre marcadores de células dendríticas versus outros marcadores do infiltrado inflamatório – HCFMUSP – 2015 a 2019	128
Tabela 10 - Correlação entre marcadores de linfócitos versus outros marcadores do infiltrado inflamatório – HCFMUSP – 2015 a 2019.....	129
Tabela 11 - Correlação entre marcador de macrófagos, de linfócitos B, escore focal e ESSDAI versus marcadores do infiltrado – HCFMUSP – 2015 a 2019	130

Lista de Siglas

ACR: *American College of Rheumatology*

AECG: *American-European Consensus Group*

AMP: monofosfato de adenosina

APC's: *Antigen-Presenting Cells*

Anti-SSA (Ro): Anticorpos contra a proteína Ro

Anti-SSB (La): Anticorpos contra a proteína La

BCL6: *B-Cell Lymphoma 6*

BSA: *Bovine Serum Albumin*

C3: Proteína do Sistema Complemento C3

C4: Proteína do Sistema Complemento C4

CAPPesq: Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

CD: *Cluster of Differentiation*

D: Área Ductal

DAB: Diaminobenzidina

DC's: *Dendritic Cells*

EBV: Vírus Epstein-Barr

Et al.: e colaboradores

ESSDAI: *EULAR-SS Disease Activity Index*

EULAR: *European League Against Rheumatism*

FAN: Fator Antinuclear

fDC's: *Follicular Dendritic Cells*

FMUSP: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

FR: Fator Reumatoide

G: Área Glandular

GC's: *Germinal Centers*

H&E: Hematoxilina-eosina

HC-FMUSP: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

HLA: *Human Leukocyte Antigens*

HLA-B8/DR3/DQ2: *Human Leukocyte Antigens B8/DR3/DQ2*

HLA-B8/DR3: *Human Leukocyte Antigens B8/ DR3*

HTLV-1: *Human T Leukemia Virus-1*

IBM: *International Business Machines*

IFN: interferon

IFN- α : interferon alfa

IFN- γ : Interferon gama

IgA: Imunoglobulina A

IgG: Imunoglobulina G

IgM: Imunoglobulina M

IL-10: Interleucina

IL-17: Interleucina 17

IL-2: Interleucina 2

IMT: Instituto de Medicina Tropical

LC's: *Langerhans Cells*

LIM 6: Laboratório de Técnicas Imunomoleculares 6

MALT: *Mucosa Associated Lymphoid Tissue*

mDC's: *myeloid Dendritic Cells*

MHC: Complexo de Histocompatibilidade Principal

NK: *Natural Killer*

P53: Proteína 53

PBS: *Phosphate Buffer Saline*

pDC's: *plasmacytoid Dendritic Cells*

pH: Potencial Hidrogeniônico

SICCA: *Sjögren's International Collaborative Clinical Alliance*

SPSS do inglês *Statistical Package for the Social Sciences*

SSp: Síndrome de Sjögren primária

TCS: Área de Tecido de Substituição (tecido fibroso e tecido adiposo)

T CD4: Linfócitos T CD4; Linfócitos T *Helper*; Linfócitos T Auxiliares

T CD8: Linfócitos T CD8; Linfócitos T Citotóxicos

TGF- β : Fator Transformador de Crescimento beta

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral alfa

Treg: Linfócitos T reguladores

Tris EDTA: *Ethylenediamine Tetraacetic Acid Buffer*

Lista de Símbolos

% porcentagem

nº número

µm micrômetro

mm milímetro

mm² milímetro quadrado

mm³ milímetro cúbico

cm centímetro

°C graus Celsius

kDa unidade de massa atômica ou kiloDalton

L litros

mL mililitro

mg miligrama

dL decilitro

Na⁺ íon sódio

K⁺ íon potássio

Cl⁻ íon cloreto

HCO₃⁻ bicarbonato

Ca⁺² íon cálcio

Mg⁺² íon magnésio

PO₄⁻³ íon fosfato

SCN⁻ íon tiocianeto

I⁻ íon iodo

NaCl cloreto de sódio

H₂O água

α alfa

β beta

γ gama

δ delta

ε épsilon

ζ zeta

> maior

≥ maior e igual

< menor

≤ menor ou igual

= igualdade (igual a)

- subtração, menos ou negativo

+ mais ou positivo

± mais ou menos

RESUMO

RESUMO

Godoy WSC. *Xerostomia em doença autoimune com envolvimento glandular: estudo morfométrico das células dendríticas no mecanismo do comprometimento das glândulas salivares na Síndrome de Sjögren* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

A Síndrome de Sjögren primária é uma exocrinopatia autoimune que tem como substrato as glândulas lacrimais e salivares. É caracterizada por uma epitelite autoimune com agressão linfomioepitelial que leva à destruição de ductos e ácinos. Ainda há controvérsias sobre a composição do infiltrado inflamatório na doença, especialmente no que tange à participação das células dendríticas na destruição do parênquima glandular. Assim, esse estudo retrospectivo avaliou quantitativamente a participação das células dendríticas em glândulas salivares biopsiadas de pacientes com Síndrome de Sjögren primária. Foram coletadas 30 amostras de glândulas salivares mucosas labiais de pacientes com diagnóstico confirmado de Síndrome de Sjögren primária (**grupo caso**), provenientes dos arquivos do Laboratório de Dermatopatologia da Divisão de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo HC-FMUSP. Também foram coletadas 10 amostras de glândulas salivares mucosas labiais de pacientes sem Síndrome de Sjögren primária (**grupo controle**), no Serviço de Verificação de Óbito de São Paulo do HC-FMUSP. Os aspectos histológicos de todos os espécimes de glândulas salivares incluídos no estudo foram analisados por 2 patologistas para classificar o grau de alteração do parênquima glandular. Estudo imunoistoquímico foi realizado para pesquisa da qualidade do infiltrado inflamatório presente nos espécimes, por meio da identificação das proteínas CD1a, langerina, CD21, CD123, CD68, CD3, CD8, CD4, CD20 e BCL6. Posteriormente foram realizadas análises morfométricas por meio do programa Image-Pro Plus. Foram detectados linfócitos CD3, CD4 CD8 e CD20 positivos em todos os casos, além de células dendríticas CD1a positivas. Nos casos classificados com infiltrado linfomioepitelial moderado e intenso houve ainda a presença de células dendríticas plasmocitóides CD123 positivas e predomínio de linfócitos CD4 e CD20 positivos, especialmente relacionada à presença de centros germinativos, onde foram encontradas células positivas para as proteínas BCL-6 e CD21. Este estudo concluiu que as células dendríticas estavam presentes nas amostras de glândulas salivares de pacientes com síndrome de Sjögren primária, sendo as células dendríticas plasmocitoides CD123 positivas prováveis orquestrantes do processo inflamatório perpétuo na doença.

Descritores: Síndrome de Sjögren; Glândulas salivares menores; Células Dendríticas; Linfócitos T; Linfócitos B; Centro germinativo.

ABSTRACT

ABSTRACT

Godoy WSC. *Xerostomia in autoimmune disease with glandular involvement: morphometric study of dendritic cells in the mechanism of impairment of the salivary glands in Sjögren's Syndrome* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2019.

Primary Sjögren's Syndrome is an autoimmune exocrinopathy mainly characterized by an autoimmune epithelitis with lymphomyoepithelial aggression that leads to the destruction of glandular parenchyma, including salivary and lacrimal glands. There is still controversy about the composition of the inflammatory infiltrate in the disease, especially regarding the participation of dendritic cells in the triggering and perpetuation of the chronic inflammation. Therefore, this retrospective study evaluated quantitatively the participation of dendritic cells in biopsied salivary glands of patients with primary Sjögren's Syndrome. Thirty (30) samples of labial mucous salivary glands of patients with confirmed diagnosis of primary Sjögren's Syndrome (case group) were gleaned from the archives of the the Dermatopathology Laboratory of the Division of Dermatology, Hospital das Clínicas, Medical School of University of São Paulo – HC-FMUSP. Were also collected 10 samples of the labial mucous salivary glands of patients without primary Sjögren's Syndrome (control group) at the post-Morten Verification Service of São Paulo – HC-FMUSP. The histological aspects of all specimens of salivary glands included in the study were analyzed by two pathologists to classify the degree of alteration of the glandular parenchyma. Immunohistochemistry was performed to investigate the quality of the inflammatory infiltrate present in the specimens through the identification of proteins CD1a, Langerin, CD21, CD123, CD68, CD3, CD4, CD8, CD20 and BCL6. Subsequently morphometric analyses were performed by using the Image-Pro Plus technology. Lymphocytes positive for CD3, CD4, CD8 and CD20 were detected in all cases; in addition CD1a positive dendritic cells were detected. In the cases classified with moderate and intense lymphomyoepithelial infiltrate there was also the presence of plasmacytoid dendritic cells CD123 positive. In these cases the predominance of lymphocytes CD4 and CD20 positive was observed, especially related to the presence of germinal centers with positive cells for BCL6 and CD21 proteins. This study concluded that dendritic cells were present in salivary glands samples from patients with primary Sjögren's Syndrome, and plasmacytoid dendritic cells CD123 positive are likely to orchestrate the perpetual inflammatory process in the disease.

Descriptors: Sjögren's syndrome; Salivary glands, minor; Dendritic cells; T-Lymphocytes; B-Lymphocytes; Germinal Center.

1 INTRODUÇÃO

As glândulas salivares são estruturas fundamentais na secreção da saliva, sendo importantes na manutenção da homeostase da cavidade oral (Varga, 2015). Alterações morfofuncionais de glândulas salivares são comuns e inerentes ao envelhecimento e à outras causas, tais como o uso de fármacos, doenças sistêmicas diversas, quimio e radioterapia, entre outros (Sreebny e Schwartz, 1997; Pathel e Shahane, 2014). Dessas, a Síndrome de Sjögren tornou-se índice devido aos sintomas clássicos de xerostomia relacionados às alterações histopatológicas das glândulas salivares.

A Síndrome de Sjögren primária (SSp) é uma doença crônica autoimune de etiologia multifatorial, caracterizada pela produção de autoanticorpos e infiltração e hiperativação linfocitária. Nas glândulas exócrinas, essa infiltração está associada ao dano glandular e à perda de função culminando, principalmente, na xerostomia e xeroftalmia (Asam *et al.*, 2019).

O padrão clássico das alterações glandulares na Síndrome de Sjögren primária é o da “epitelite autoimune”, a qual destrói progressivamente o parênquima glandular. Nessa enfermidade, em suas fases mais avançadas, o infiltrado inflamatório organiza-se em estruturas linfoides terciárias semelhantes a centros germinativos e, por meio da produção de citocinas pró-inflamatórias, são responsáveis pela contínua ativação de linfócitos T e B autorreativos, assim, contribuindo para a modulação imunológica da doença e perpetuação da inflamação crônica (Verstappen *et al.*, 2019).

Além da presença linfoplasmocitária, as Células Dendríticas (DC's) também estão presentes nesse microambiente glandular e coordenam os mecanismos biomoleculares ligados à patogênese da doença. As DC's são conhecidas como as mais potentes apresentadoras de antígenos e capazes de iniciar uma resposta imunológica efetiva, assim, orquestrando um papel central no desenvolvimento das doenças autoimunes (Vogelsang *et al.*, 2006; Goules *et al.*, 2017).

Diante deste cenário e com base na importante função desempenhada pelo infiltrado inflamatório na destruição das glândulas salivares mucosas de pacientes com SSp, o presente estudo se desenvolveu baseado na hipótese de que a presença crescente de células dendríticas no infiltrado inflamatório intraglandular na SSp pode potencializar a apresentação de autoantígenos, desencadeando respostas imunológicas exacerbadas.

OBJETIVOS

---

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a presença das células dendríticas na Síndrome de Sjögren primária em espécimes de glândulas salivares mucosas e correlacionar a sua presença com o grau de comprometimento do órgão.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A) Identificar aspectos morfológicos das glândulas salivares mucosas labiais de pacientes com SSp e sem SSp;
- B) Analisar a quantidade e distribuição de células apresentadoras de antígenos por meio da expressão das moléculas CD1a, Langerina, CD21, CD123 e CD68.
- C) Analisar a quantidade e distribuição dos linfócitos por meio da imunoexpressão dos anticorpos CD3, CD4, CD8 e CD20
- D) Caracterizar a presença de centros germinativos por meio da imunomarcação das proteínas BCL6 e/ou CD21;
- E) Correlacionar os dados obtidos nas análises clínicas, histopatológicas e morfométricas na SSp.

REVISÃO DE LITERATURA

---

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 GLÂNDULAS SALIVARES

3.1.1 Histologia das glândulas salivares

Nos mamíferos, a glândula salivar é estruturalmente composta por unidades secretoras terminais e um sistema de ductos, os quais não possuem somente a função de conduzir a secreção salivar até a cavidade oral, mas também participam ativamente na produção e modificação da saliva, conferindo uma alta especificidade a esse órgão (Tandler, 1993).

As unidades secretoras terminais são compostas por células epiteliais secretoras de saliva, cujo formato assemelha-se a “cachos de uva” (Bowman, 2009), que se abrem, primeiramente, a pequenos e curtos ductos, conhecidos como ductos intercalares (Tandler, 1993).

Os ductos intercalares são compostos por células cuboides simples, que contribuem com componentes macromoleculares para a saliva, dentre eles, lisozima e a lactoferrina. Estes ductos são contíguos com ductos maiores, os estriados, que compõem grande parte do sistema de ductos, estão localizados nos lóbulos glandulares e apresentam função de reabsorção e secreção de eletrólitos da saliva. Eles são formados por células colunares com profundas invaginações e interdigitações da membrana plasmática acompanhadas por numerosas mitocôndrias, o que confere a característica estriada deste ducto. Os ductos estriados confluem para os de maior calibre, os ductos excretores, também conhecidos como ductos interlobulares ou extralobulares, os quais são constituídos por epitélio colunar pseudoestratificado ou estratificado que, por fim, desembocam na cavidade oral e, por isso, são também denominados ductos excretores terminais (Tandler, 1993; Varga, 2015; Proctor, 2016). Todos esses ductos estão ilustrados na Figura 1.

Fonte: Produção da própria autora

Figura 1 - Sistema ductal da glândula salivar. Glândula salivar - o sistema ductal consiste em três principais elementos: ducto intercalar, ducto estriado e ducto excretor

Quanto às unidades secretoras terminais glandulares, elas podem ser constituídas por células serosas e mucosas (Tandler, 1993; Holmberg e Hoffman, 2014).

As células serosas têm formato piramidal, com ápices voltados para o lúmen, o núcleo é esférico e localizado no terço basal da célula. Quando corada em hematoxilina-eosina (H&E), o citoplasma apresenta-se intensamente basofílico e possui vários grânulos secretores eosinofílicos. As células serosas são especializadas na síntese, armazenamento e secreção de saliva com consistência aquosa e rica em proteínas (Tandler, 1993; Whelton, 2010; Nanci, 2013; Katchburian e Arana, 2014; Varga, 2015).

Por outro lado, os ácinos mucosos são especialistas na produção de uma saliva viscosa, rica em mucina, devido às grandes cadeias de carboidratos, que refletem na estrutura celular. Portanto, as células mucosas são piramidais com bordas arredondadas, núcleos achatados e localizados no polo basal, pois os grânulos de secreção mucosa tornam-se volumosos no polo apical, ocupando grande parte do citoplasma celular e provocando o achatamento do núcleo na região basal. Na coloração H&E o ápice celular se cora fracamente, devido ao alto conteúdo de carboidratos (Whelton, 2010; Nanci, 2013; Katchburian e Arana, 2014).

Outros tipos celulares como as mioepiteliais estão distribuídas ao redor das unidades secretoras e dos ductos intercalares, cobrindo-os parcialmente, a fim de facilitarem a secreção salivar por meio de uma contratilidade rítmica, assim, auxiliando o fluxo salivar, conforme pode ser observado na Figura 1 (Tandler, 1993).

A glândula é sustentada por um tecido conjuntivo que fornece suprimento vâsculo-nervoso para os componentes do parênquima glandular e é neste local que células do sistema imunológico inato, como macrófagos e células dendríticas, permeiam entre as células epiteliais glandulares e estão envolvidas na vigilância imunológica, no processamento e apresentação de antígenos aos linfócitos T (Tucker, 2007; Nanci, 2013; Varga, 2015).

3.1.2 Morfologia das glândulas salivares maiores

Nos mamíferos, as glândulas salivares maiores estão dispostas aos pares: glândulas parótidas, submandibulares e sublinguais (Bowman, 2009), as quais são responsáveis pela produção de mais de 90% da saliva em adultos saudáveis (Tucker, 2007; Holmberg e Hoffman, 2014; Katchburian e Arana, 2014; Turner, 2016).

O ducto excretor terminal da parótida é denominado ducto parotídeo, ou ducto de Stensen (ou Stenon), que está localizado lateralmente ao músculo masseter e a 1,5 cm abaixo do arco zigomático. Ele contorna a borda anterior do músculo masseter, atravessa a bola gordurosa de Bichat e, em seguida, o músculo bucinador. O ducto se abre na mucosa jugal, próximo ao segundo molar superior, onde existe uma saliência, a papila parotídea (Tandler, 1993; Carlson, 2000; Madeira, 2013; Holmberg e Hoffman, 2014).

A parótida é completamente envolvida pela fáscia parotídea que envia septos ao interior da glândula, dividindo-a em lóbulos. O suprimento sanguíneo da parótida advém da artéria carótida externa e o retorno venoso ocorre através de veias que terminam na jugular externa (Carlson, 2000; Tucker, 2007; Madeira, 2013; Katchburian e Arana, 2014).

As unidades secretoras terminais da parótida são serosas, ou seja, secretam uma grande quantidade de proteínas como, por exemplo, a amilase. (Nanci, 2013).

A glândula submandibular pode ser dividida em duas partes, uma superficial, situada na fóvea submandibular, e, outra profunda. A parte superficial é maior, arredondada e contínua com seu prolongamento profundo. Medialmente, a glândula está em contato com os músculos milo-hióideo e hioglosso e, entre esses músculos, há um interstício que dá acesso à região sublingual, onde está localizada a parte profunda da glândula e, a esta, o ducto submandibular, também conhecido como ducto de Wharton. Este ducto cruza o nervo lingual superiormente, de lateral para medial e da região posterior para anterior, abrindo-se na carúncula sublingual, ao lado do freio lingual (Carlson, 2000; Madeira, 2013; Holmberg e Hoffman, 2014).

A submandibular é uma glândula mista, sendo, aproximadamente, 80% das suas unidades secretoras terminais constituídas por células serosas e, o restante, em torno de 20%, por células mucosas que são responsáveis por secretarem mucinas, glicoproteínas que fornecem uma consistência viscosa à saliva. Os ductos intercalares são mais curtos e menos numerosos, enquanto que os ductos estriados são mais longos e ramificados (Varga, 2015).

O suprimento sanguíneo arterial provém de ramos da artéria lingual e o retorno venoso por veias que fazem o mesmo trajeto. A inervação é realizada pelo nervo facial (filamentos do nervo corda do tímpano), ramos do nervo alveolar inferior e do tronco simpático (Katchburian e Arana, 2014).

A glândula sublingual é uma glândula mista que contém ácinos serosos e mucosos, entretanto, há predomínio de unidades secretoras mucosas. Os ductos intercalares e estriados são muito curtos nestas glândulas. Elas situam-se no assoalho bucal, sobre o músculo milo-hióideo e fazem saliência na mucosa oral - pregas sublinguais. Possuem formato alongado e achatado, estando em contato com a fóvea sublingual de um lado e com o ducto da glândula submandibular, nervo lingual e músculo genioglosso de outro. Medialmente, o

par de glândulas sublinguais estão em contato por meio de suas extremidades anteriores (Madeira, 2013).

Estas glândulas possuem vários ductos excretores terminais que se abrem lateralmente ao freio lingual, denominados ductos sublinguais menores, ou ductos de Rivinus, que se abrem na prega sublingual, porém, em poucas ocasiões é um só, denominado ducto maior ou ducto de Bartholin (Tandler, 1993; Holmberg e Hoffman, 2014; Katchburian e Arana, 2014).

3.1.3 Morfologia das glândulas salivares menores

Além das glândulas salivares maiores, existem as glândulas salivares menores que estão presentes em toda mucosa que recobre a cavidade oral (Bowman, 2009), exceto na gengiva e na parte anterior do palato duro. Cerca de 600 a 1200 unidades de glândulas salivares menores estão distribuídas na cavidade oral, dentre elas, pode-se destacar: as glândulas labiais, bucais, palatinas e linguais. Elas possuem uma atividade secretora contínua e lenta e, por isso, apresentam papel fundamental na proteção e umedecimento da mucosa oral, especialmente à noite, quando as glândulas salivares maiores têm sua atividade secretora diminuída (Madeira, 2013; Patel e Hoffman, 2014; Varga, 2015).

A maioria delas possui unidades secretoras terminais entremeadas ao tecido conjuntivo das mucosas de revestimento oral e os ductos geralmente se abrem diretamente sobre a superfície mucosa, portanto, estão organizadas em estruturas semelhantes a pequenos lóbulos (Proctor 2016).

As glândulas labiais são pequenas glândulas situadas na submucosa dos lábios superior e inferior. Formam uma camada quase contínua entre a mucosa e o músculo orbicular (Madeira, 2013; Proctor, 2016). Por sua vez, as glândulas bucais estão dispersas irregularmente na submucosa jugal, entre os feixes do músculo bucinador (Madeira, 2013).

As glândulas palatinas formam uma camada na submucosa do palato mole, devido ao fato de estarem densamente agrupadas. Entretanto, apesar de

estarem entremeadas, cada glândula possui seu próprio ducto. No limite posterior da cavidade oral elas ocupam parte do palatoglosso e área posterior do palato duro (Madeira, 2013).

As glândulas linguais consistem de dois conglomerados. Umas são encontradas próximo ao dorso da língua, especificamente, na base das papilas circunvaladas. Cada papila circunvalada consiste de uma saliência central circundada por uma parede circular. Entre ambas, existe um espaço com 2 a 3 mm de profundidade, na qual se abrem glândulas salivares menores puramente serosas, conhecidas como glândulas de von Ebner, as quais desempenham importante papel na limpeza do sulco dessas papilas, devido a sua secreção extremamente fluida. Enquanto o outro conglomerado localiza-se na região anterior da língua, próxima ao ápice (Madeira, 2013; Nanci, 2013; Katchburian e Arana, 2014; Proctor, 2016).

3.1.4 Inervação das glândulas salivares

Os nervos e os vasos sanguíneos penetram na estrutura glandular juntamente com o ducto principal, caminham paralelamente aos ramos ductais e, por fim, alcançam os ácinos (Varga, 2015).

O sistema nervoso autônomo controla a secreção salivar, assim, o processo de secreção das glândulas salivares maiores é regulado tanto pelo sistema nervoso simpático quanto pelo parassimpático. Por outro lado, o processo de secreção das glândulas salivares menores é menos dependente do controle neuronal, as quais espontânea e continuamente secretam um pequeno volume de saliva, principalmente à noite, oferecendo lubrificação e conforto contínuo à cavidade oral (Varga, 2015; Proctor, 2016).

Durante a ingestão de alimentos, devido à estimulação dos diferentes mecanorreceptores presentes nos botões gustativos, ocorre o aumento do fluxo salivar. Desta forma, os nervos aferentes - nervos glossofaríngeo, facial e trigêmeo - conduzem esses sinais ao núcleo do trato solitário presente no tronco encefálico que, por sua vez, envia fibras nervosas aos núcleos salivatórios

superior e inferior. Destes saem fibras nervosas parassimpáticas eferentes via nervos corda do tímpano e lingual para o gânglio submandibular que inervam as glândulas submandibulares e sublinguais. A glândula parótida é suprida pelas fibras nervosas parassimpáticas eferentes via nervos glossofaríngeo e auriculo-temporal, que fazem sinapse no gânglio ótico (Madeira, 2013; Nanci, 2013; Proctor, 2016). Essa complexa via de inervação está esquematicamente ilustrada na Figura 2.

Fonte: Modificado de Proctor (2016)

Figura 2 - Inervação glandular: controle da secreção salivar. O reflexo salivar inicia-se pela detecção dos sabores dos alimentos por receptores presentes nas papilas gustativas e mecanorreceptores distribuídos por toda mucosa oral (tato, pressão e dor). Os sinais são transmitidos por meio dos nervos sensitivos aferentes (verdes) aos núcleos salivatórios, de onde os nervos eferentes parassimpáticos (azuis) conduzem sinais às glândulas salivares. Os nervos simpáticos eferentes (vermelhos) surgem da medula espinhal torácica. Os nervos dentro do sistema nervoso central (preto) inervam os centros salivares e influenciam os sinais emitidos às glândulas. **Nota:** V: nervo trigêmeo; VII: nervo facial; IX: nervo glossofaríngeo

A estimulação do sistema nervoso parassimpático aumenta o volume salivar. Por outro lado, o estímulo simpático leva, primeiramente, ao aumento do fluxo salivar e, posteriormente, à redução da salivação e à sensação de boca seca (xerostomia), frequentemente observadas durante situações que geram medo e ansiedade. Os impulsos simpáticos se originam na medula espinhal, fazem sinapse no gânglio cervical superior e fornecem o suprimento nervoso às glândulas salivares. Portanto, as estimulações simpática e parassimpática atuam simultaneamente nas células secretoras por meio da contração das células mioepiteliais, conduzindo a secreção salivar do lúmen acinar e sistema de ductos até à cavidade oral (Proctor, 2016).

3.2 FISILOGIA

3.2.1 Composição e funções da saliva

A saliva é um fluido complexo formado a partir da secreção das glândulas salivares maiores e menores, sendo 98% composta por água. A sua composição restante é rica em eletrólitos, proteínas, carboidratos, enzimas, anticorpos, entre outros (veja Quadro 1). É produzida na quantidade aproximada de 1L a 1,5L por dia, com característica incolor, viscosa, e, pH entre 6 e 7 (Greabu *et al.*, 2009; Whelton, 2010; Katchburian e Arana, 2014; Varga, 2015).

Cerca de 90% do fluido salivar é secretado pelas glândulas salivares maiores e, aproximadamente, 10% pelas menores. A secreção salivar produzida pela glândula parótida é fluida/aquosa e rica em amilase e, por isso, ajuda a remover partículas de alimento da cavidade oral. Por outro lado, a secreção das glândulas submandibular e sublingual é mista e rica em mucinas, entretanto, há predomínio de secreção mucosa na glândula sublingual e, por fim, as glândulas salivares menores produzem principalmente secreção mucosa, ou seja, viscosa/espessa, ajudando a formar o bolo alimentar que será deglutido (Greabu *et al.*, 2009; Holmberg e Hoffman, 2014; Varga, 2015; Turner, 2016).

Quadro 1 - Composição salivar

Componentes	Características
<i>Volume</i>	1-1,5L/por dia
<i>Eletrólitos</i>	Na ⁺ , K ⁺ , Cl ⁻ , HCO ₃ ⁻ , Ca ⁺² , Mg ⁺² , (PO ₄) ⁻³ , SCN ⁻ , I ⁻ e F ⁻
<i>Proteínas/ peptídeos</i>	Amilase, proteínas ricas em prolina, mucinas, histatina, cistatina, peroxidase, lisozima, lactoferrina, defensinas e catelicidinas-LL37
<i>Imunoglobulinas</i>	IgA, IgG e IgM
<i>Orgânicos</i>	Moléculas de glicose, aminoácidos, ureia, amônia, ácido úrico e lipídios
<i>Outros</i>	Fator de crescimento epidérmico, insulina, proteínas ligadas ao monofosfato de adenosina cíclico (AMP cíclico) e albumina sérica

Fonte: Modificado de Nanci (2013)

Diversas funções são desempenhadas pela saliva como, por exemplo, proteger a cavidade oral contra agentes infecciosos, lubrificar e manter a integridade dos dentes por meio da remineralização (película salivar adquirida), auxiliar na digestão, mastigação e deglutição de alimentos, na fala e gustação (Tucker, 2007; Nanci, 2013; Holmberg e Hoffman, 2014; Proctor, 2016).

Brevemente, a ação antimicrobiana, antifúngica e antiviral da saliva ocorre às expensas das mucinas, aglutininas e outras proteínas como lisozima, lactoferrina, peroxidase e inibidor de proteases, pois produzem uma barreira contra os micro-organismos que colonizam a cavidade oral. A principal imunoglobulina da saliva (IgA) causa aglutinação dos agentes infecciosos, assim, prevenindo sua adesão à mucosa oral e facilitando sua eliminação (Varga, 2015; Turner, 2016).

A saliva ainda contribui para uma outra função importante que é a digestão de alimentos. Com o aumento do fluxo salivar e das enzimas como a amilase e lipase, inicia-se o processo de remoção de alimentos remanescentes e o processo de digestão. As propriedades de umedecimento e lubrificação da saliva, características das mucinas, permitem a formação e a deglutição do bolo alimentar (Nanci, 2013; Varga, 2015).

As glândulas de von Ebner permitem a saliva desempenhar seu importante papel na limpeza do sulco das papilas circunvaladas, assim, atuando na gustação (Proctor, 2016).

Devido ao fato da saliva ser um dos fluidos mais acessíveis do corpo humano e abrigar um amplo espectro de informações biológicas, ela vem sendo utilizada como ferramenta para o diagnóstico, monitoramento da evolução de doenças e prognóstico. Assim, permitindo a avaliação e monitoramento da saúde oral e sistêmica, como o *status* de doenças, exposição ambiental a agentes infecciosos e uso abusivo ou terapêutico de drogas (Greabu *et al.*, 2009; Zimmermann *et al.*, 2010).

3.2.2 Mecanismo de secreção salivar

O movimento do fluido salivar ocorre às expensas do gradiente de concentração, assim, os íons presentes no tecido conjuntivo atravessam os ácinos em direção ao lúmen, como descrito a seguir e ilustrado na Figura 3:

Fonte: Produção da própria autora

Figura 3 - Mecanismo de secreção salivar. Primeira etapa: secreção do fluido primário isotônico rico em $NaCl$. Segunda etapa: reabsorção de $NaCl$ e secreção de K^+ e HCO_3^-

O mecanismo de secreção salivar envolve o transporte de íons como sódio (Na^+), potássio (K^+) e cloreto (Cl^-), por meio da bomba de Na^+/K^+ e canal de Cl^- . Devido ao menor gradiente de concentração intracelular dos íons Ca^{2+} , os íons Na^+ e Cl^- passam através da membrana basolateral do epitélio acinar e, concomitantemente, pela membrana apical, permitindo também o movimento de influxo da água para o interior do lúmen glandular via canal de aquaporina 5, processo conhecido como transporte transcelular, ou por meio das junções “tight”, processo paracelular. Logo, a saliva produzida pelas células acinares é uma saliva isotônica. Entretanto, quando a saliva percorre o sistema ductal, em baixa velocidade, os íons Na^+ e Cl^- são quase completamente removidos e HCO_3^- e K^+ são secretados, tornando o fluido salivar hipotônico ao chegar à cavidade oral (Delporte, 2013; Varga, 2015; Turner, 2016).

3.3 HIPOSSALIVAÇÃO E XEROSTOMIA

A sensação de boca seca é um importante sintoma relacionado a diversas condições do paciente, desde o envelhecimento até situações patológicas.

Embora os termos hipossalivação e xerostomia sejam, usualmente, utilizados como sinônimos possuem, de fato, significados diferentes. A hipossalivação é um achado objetivo da diminuição da produção do fluxo salivar, enquanto que a xerostomia é definida como a sensação subjetiva de boca seca, embora esta seja frequentemente acompanhada da hipofunção glandular (Sreebny e Schwartz, 1997; Plemons *et al.*, 2014).

A xerostomia acomete, principalmente, a população senil devido ao aumento da utilização de medicamentos e à susceptibilidade a doenças sistêmicas, além da senescência glandular (Sreebny e Schwartz, 1997; Pathel e Shahane, 2014). Dentre os medicamentos pode-se citar: sedativos, anti-histamínicos, antiparkinsonianos, anti-hipertensivos e antidepressivos (Sreebny e Schwartz, 1997; Bowman, 2009; Turner, 2016). Os efeitos xerogênicos dessas drogas aumentam à medida em que elas são consumidas regularmente.

A hipossalivação apresenta sinais clínicos como: perda do brilho e secura da mucosa oral, aparência pálida e fina da mucosa, fissuras e lobulações no dorso lingual, atrofia das papilas filiformes, queilite angular, candidose - principalmente no palato e na língua, maior susceptibilidade à cárie dental e dificuldades em funções como a fala, a mastigação e a deglutição (Sreebny e Schwartz, 1997; Bowman, 2009; Mavragani e Moutsopoulos, 2010).

A doença índice relacionada com a hipossalivação e xerostomia é a SSp. Nesse grupo de pacientes, a redução do fluxo salivar pode ser considerada como um biomarcador da hipofunção das glândulas salivares (Bowman, 2009; Proctor, 2016; Turner, 2016). Nessa doença, a diminuição ou perda da secreção salivar é causada pela destruição do parênquima glandular, principalmente, em decorrência da inflamação crônica que destrói a estrutura das glândulas salivares. A patogenia e mecanismos de interação da inflamação com as glândulas salivares requerem pesquisas complementares para que haja melhor

compreensão desse fenômeno, bem como novas estratégias de tratamento dos pacientes (Proctor, 2016).

3.4 SÍNDROME DE SJÖGREN PRIMÁRIA

A SSp é uma exocrinopatia autoimune que tem como substrato, em especial, as glândulas lacrimais e salivares, culminando com os sintomas de xerofthalmia e xerostomia (Asam *et al.*, 2019). Entretanto, a complexidade da doença leva também às múltiplas manifestações sistêmicas (Ramos-Casals *et al.*, 2014) (Quadro 2). Tais manifestações clínicas são ainda de difícil avaliação objetiva, ocasionando um alto grau de subdiagnóstico (Mavragani e Moutsopoulos, 2010; Jonsson *et al.*, 2011).

Em 2002, foi publicado o primeiro consenso internacional sobre os critérios de classificação desta enfermidade (*The American-European Consensus Group – AECG - criteria*) (Vitali *et al.*, 2002). Com a aplicação destes critérios, a prevalência dessa síndrome na população geral é estimada entre 0,1 a 0,5% (Bowman *et al.*, 2004; Sánchez-Guerrero *et al.*, 2005). Embora pessoas de todas as idades possam ser afetadas, a SSp tem maior incidência nos indivíduos entre a quarta e quinta décadas de vida, sendo as mulheres mais acometidas do que os homens, numa proporção de 9:1 (Bell *et al.*, 1999; Bowman *et al.*, 2001; García-Carrasco *et al.*, 2002; Rozman *et al.*, 2004).

Por este motivo, disfunções hormonais parecem fazer parte da fisiopatologia no desenvolvimento da SSp (Ainola *et al.*, 2017). Fatores ambientais, como infecções virais prévias também são implicados, como infecções pelo vírus Epstein-Barr (EBV), HTLV-1 (*human T leukemia vírus-1*), Coxsackievirus, Citomegalovirus e, talvez, o vírus da hepatite C (Delaleu *et al.*, 2008; Lucchesi *et al.*, 2014). Infecções bacterianas (*Helicobacter pylori*) já foram relacionadas como potenciais desencadeadores da resposta imune ao tecido glandular, devido a sua frequente concomitância em pacientes com a SSp (Abe *et al.*, 1999; Aragona *et al.*, 1999). O principal agente infeccioso envolvido é o vírus EBV, cujo material genético pode ser extraído de amostras teciduais provenientes de material de biopsia de glândulas salivares menores (Mariette *et*

al., 1991). Autores demonstraram a maior frequência e maiores concentrações séricas do anticorpo *anti-EBV early antigen diffuse* (anti-EA-D), o qual está associado à replicação viral, nos pacientes com SSp sem uso de glicocorticoides ou agentes imunossupressores comparativamente a indivíduos controles com similar idade média, sexo e raça, sugerindo uma reatividade anormal a este patógeno nos indivíduos com esta doença (Pasoto *et al.*, 2013).

Quadro 2 - Órgãos acometidos e manifestações clínicas na SSp

Órgão	Manifestação
Pele	▪ Xerose ▪ Vasculite (púrpura) ▪ Eritema anular ▪ Eritema nodoso, livedo e outros
Músculos e articulações	▪ Artralgia e artrite ▪ Fibromialgia ▪ Miopatia
Sistema gastrointestinal	▪ Disfagia ▪ Hipomobilidade esofageana ▪ Gastrite atrófica ▪ Linfoma
Trato respiratório	▪ Xerotraquéia ▪ Doença pulmonar intersticial (pneumonite intersticial linfocítica) ▪ Bronquiolite ▪ Linfoma
Sistema cardiovascular	▪ Pericardite ▪ Bloqueio átrio-ventricular total congênito (lúpus neonatal)
Sistema nervoso	▪ Polineuropatia periférica ▪ Neuropatia craniana ▪ Esclerose múltipla-símile
Sistema maxilo-mandibular	▪ Pouco conhecidos

Fonte: Modificado de Vissink *et al.* (2012)

3.4.1 Fisiopatologia e patogenia da Síndrome de Sjögren primária

Evidências documentais apontam para a classificação da SSp como uma doença autoimune devido à presença de múltiplos autoanticorpos circulantes - principalmente os anticorpos anti-SSA (Ro) e anti-SSB (La), predomínio no sexo feminino, associação da doença com HLA-B8/DR3, associação com outras doenças sistêmicas e órgão-específicas e as alterações inflamatórias das glândulas salivares e lacrimais (Ramos-Casals *et al.*, 2010; Shiboski *et al.*, 2017). O alvo inflamatório na doença é primordialmente o epitélio das glândulas lacrimais e salivares, e, por isto, alguns autores (Barrera *et al.*, 2013; Mavragani e Moutsopoulos, 2014) cunharam o termo “epitelite autoimune” à destruição do parênquima glandular na SSp, cujos mecanismos iniciais podem estar relacionados à quebra da homeostase na arquitetura glandular – estrutura célula-célula e célula/matriz extracelular.

Além destes fatores exógenos, vários fatores endógenos podem estar relacionados com o desenvolvimento da SSp – em particular, a apresentação de antígenos endógenos, fatores hormonais e genéticos. O hapotipo HLA-B8/DR3/DQ2, combinado com o gene C4A nulo, está presente em cerca de 50% dos casos. Os fatores endógenos e exógenos supracitados podem, portanto, estar envolvidos na patogenia da doença, mas não há a identificação de um único fator presente (Fox, 2005; Mavragani e Moutsopoulos, 2014).

Dados encontrados no exame das glândulas afetadas podem indicar mecanismos envolvidos no desenvolvimento e progressão das alterações inflamatórias da SSp. Os linfócitos T CD4⁺ são predominantes no infiltrado e, assim como em outras doenças inflamatórias, sugerem que a secreção da interleucina 17 (IL-17) possa ser um importante fator catalizador da inflamação no tecido glandular. Além disso, os linfócitos B e plasmócitos presentes no infiltrado inflamatório do parênquima glandular parecem favorecer o depósito exagerado de imunoglobulinas, especialmente IgG e IgA, o que pode perpetuar os efeitos autoimunes da doença (Jonsson *et al.*, 2011).

Existem ainda várias evidências de que os linfócitos B têm um importante papel na patogenia da doença. Neste aspecto, hipergamaglobulinemia e a

presença de autoanticorpos são características laboratoriais frequentemente encontradas nos pacientes com a SSp, a qual é uma doença associada a eventos linfoproliferativos que podem culminar com o desenvolvimento de um linfoma (Tzioufas e Vougarelis, 2007). Este panorama inflamatório pode ainda levar à formação de complexos imunes, os quais podem afetar as paredes dos vasos sanguíneos levando a vasculites de pequenos vasos, que geram alterações cutâneas (primordialmente púrpura), mononeurites e glomerulonefrite. Assim, neste contexto multifatorial, o modelo de mecanismo de doença na SSp incorpora alterações genéticas, histopatológicas e sorológicas com repercussões locais e sistêmicas, que podem compreender os seguintes passos:

1. agressão inicial ao epitélio glandular (epitelite com alterações arquiteturais);
2. apoptose com expressão dos autoantígenos SS-A (Ro) e SS-B (La) na superfície glandular (Yannopoulos *et al.*, 1992);
3. produção de citocinas pela glândula danificada, pelas células mononucleares infiltrantes e também pelo epitélio glandular, o que resulta no aumento dos níveis de quimiocinas na parede de pequenos vasos intraglandulares (dano endotelial), promovendo em consequência a migração linfocitária (Mavrargani e Moutsopoulos, 2014);
4. produção de autoanticorpos anti-SSA (Ro) e anti-SSB (La) por linfócitos B sob a influência de linfócitos T auxiliares (linfócitos T CD4 *helper*) (Routsias e Tzioufas, 2007);
5. formação de complexos proteicos que serão apresentados por células dendríticas apresentadoras de antígenos (Jonsson *et al.*, 2011);
6. produção de interferon gama (IFN- γ) pelas células apresentadoras de antígenos, o que perpetua a resposta inflamatória e secreção de metaloproteinases, as quais irão alterar o parênquima glandular (apoptose) e o estroma (Barrera *et al.*, 2013).

Este complexo mecanismo se transforma então em um ciclo vicioso até a completa destruição do parênquima glandular e subsequente fibrose (Figuras 4 e 5). A destruição glandular pode ocorrer por meio da ação de perforina e granzima, bem como pela ativação da via extrínseca da apoptose (Fas/FasL). As alterações morfoarquiteturais produzidas por estes mecanismos resultam em alterações nas aquaporinas, moléculas importantes no transporte de água e macromoléculas, o que altera consideravelmente a qualidade e quantidade da saliva, levando à xerostomia, ainda antes da destruição completa do parênquima das glândulas afetadas (Barrera *et al.*, 2013).

Fonte: Modificado de Barrera *et al.*, 2013

Figura 4 - Esquema do ciclo vicioso da patogenia da SSp

A xerostomia decorrente da SSp é, portanto, decorrente de causa complexa e apenas parcialmente elucidada. Neste aspecto, a disfunção das glândulas salivares na SSp é atribuída principalmente à infiltração linfocitária progressiva no ducto salivar que leva à reação inflamatória causando atrofia acinar e fibrose do parênquima glandular e a consequente xerostomia (Guobis *et al.*, 2008). A perda de ácinos, extensa fibrose e linfocitose periductal refletem a cronicidade da doença (Work, 1981). A resposta autoimune desencadeada contra o parênquima glandular é direcionada para as ribonucleoproteínas SSA (Ro), as quais possuem duas cadeias proteicas de 52 e 60 kDa (citoplasmática), e SSB (La) (nuclear) de 48 kDa. O mecanismo que pode ser o responsável pelo

processo autoimune é a apoptose das células epiteliais, em que autoantígenos intracelulares são expostos ao sistema imune na superfície das bolhas apoptóticas (Tapinos *et al.*, 1999). Estudos de amostras de biopsias das glândulas lacrimais e salivares menores de pacientes com a SSp revelam infiltração por linfócitos, predominantemente do subgrupo dos linfócitos T CD4⁺ com fenótipo CD45RO e expressão do receptor dos antígenos dos linfócitos T $\alpha\beta$ (Fox *et al.*, 1982; Ohyama *et al.*, 1995), associado à destruição do tecido acinar, com consequente diminuição na produção das lágrimas e saliva, respectivamente. Evidências crescentes mostram que a apoptose esteja claramente implicada na destruição da glândula salivar na SSp (Manganelli *et al.*, 1997; Kong *et al.*, 1998; Al-Maini *et al.*, 2000; Jimenez *et al.*, 2002; Kühtreiber *et al.*, 2003; Sisto *et al.*, 2006, 2007). A destruição do tecido acinar também pode relacionar-se à apoptose mediada por Fas (também conhecido como CD95), um dos mecanismos extra-mitocondriais de apoptose (Hayashi *et al.*, 2004; Ogawa *et al.*, 2005; Nakamura *et al.*, 2005, 2007).

Com base na frequente discrepância entre o grau de lesão acinar na biopsia e a diminuição fisiológica da produção de saliva, as citocinas antissecretoras produzidas por estes linfócitos T parecem desempenhar algum papel na xerostomia, em particular o IFN- γ , assim como a interleucina-2 (IL-2) e IL-10 (Brookes *et al.*, 1996; Fox *et al.*, 1999; García-Carrasco *et al.*, 2001; Bertorello *et al.*, 2004; Ogawa *et al.*, 2005). Além disso, estudos prévios demonstraram expressão anormal do fator transformador de crescimento-beta (TGF- β) no tecido glandular salivar dos pacientes com SSp, sugerindo sua participação na patogênese da doença (Kizu *et al.*, 1996).

Um estudo afirma a existência de importante dissociação entre as alterações glandulares na SSp e os sintomas clínicos. Esta dissociação mostra evidências de que mecanismos alternativos possam contribuir ativamente para o sintoma de xerostomia. Estes mecanismos incluem a indução da apoptose das células epiteliais pelo infiltrado inflamatório e suas citocinas, alterações na distribuição das aquaporinas e inibição de neurotransmissores por meio de autoanticorpos dirigidos aos receptores muscarínicos, levando à quebra da homeostasia glandular (Mavragani e Moutsopoulos, 2014). Autores ainda

relatam que a ligação de autoanticorpos ao receptor muscarínico tipo 3 inibe a ação da aquaporina-5, uma das principais moléculas relacionadas com canais de troca de água nas glândulas salivares, levando a profundas alterações na secreção salivar (Mavragani e Moutsopoulos, 2014).

Para finalizar, Pijpe *et al.* (2007) mostraram que a função das glândulas salivares na SSp deteriora quanto maior o tempo da doença, independente do uso de glicocorticoides ou das drogas antirreumáticas mais comumente empregadas.

Fonte: Modificado de Barrera *et al.*, 2013

Figura 5 - Esquema dos fatores que contribuem para a patologia da alteração da função das glândulas salivares na SSp

3.4.2 Critérios para a classificação da Síndrome de Sjögren primária

A complexidade da SSp indica que a melhor forma de abordar o problema é a conduta multidisciplinar. Com o intuito de abalizar as diversas especialidades envolvidas com o manejo da doença, desde os anos de 1965, cerca de onze recomendações para inclusão de critérios de classificação foram propostas por grupos de pesquisadores.

Uma das classificações da Síndrome de Sjögren foi revisada em 2002 e consistiu no consenso do Grupo Americano-Europeu (AECG). Esta classificação foi adotada pela maioria dos estudos publicados, tendo sido citada mais de 1500 vezes na literatura indexada (Vitali *et al.*, 2002; Rasmussen *et al.*, 2014).

Em 2012, o *American College of Rheumatology* (ACR) endossou os novos critérios para a classificação da doença propostos pelo grupo *Sjögren's International Collaborative Clinical Alliance* (SICCA) (Shiboski *et al.*, 2012). Estes critérios eram concentrados em 3 alterações centrais: a queratoconjuntivite sicca, a sialadenite e os fatores sorológicos (Anexo B).

A comparação entre as duas formas de classificação (2002 e 2012) mostrou que nenhum sistema foi absoluto para a classificação da enfermidade. Ambos possuíam problemas na sensibilidade e especificidade dos critérios, pois estes dependiam ainda de considerações subjetivas e da experiência clínica do avaliador.

Portanto, em 2017, o *American College of Rheumatology* (ACR) e a *European League Against Rheumatism* (EULAR) validaram um consenso metodológico internacional que foi um “divisor de águas” para o diagnóstico precoce da doença, reunindo um conjunto de critérios objetivos para classificação da SSp, assim, pacientes com sinais e sintomas sugestivos da síndrome podem ser precocemente diagnosticados com base na soma da pontuação dos critérios objetivos, a saber: exames sorológicos positivos (score 3), sialadenite focal linfocítica (score 3), critérios objetivos orais (score 1) e oculares (score 1). Logo, os pacientes que apresentarem score ≥ 4 preenchem os critérios para o diagnóstico de SSp (Shiboski *et al.*, 2017).

Esta nova classificação mostrou ter alta sensibilidade (96%) e especificidade (95%) em comparação com as demais formas de classificação (2002 e 2012), o que a torna um método bem aceito para a classificação da SSp. Entretanto, ela ainda não exime a experiência clínica do avaliador diante dos diversos casos (Shiboski *et al.*, 2017).

3.4.3 Aspectos clínico-sistêmicos da Síndrome de Sjögren primária

A caracterização sistêmica dos órgãos de pacientes acometidos pela enfermidade é realizada com base no Índice de Atividade da Doença EULAR (ESSDAI) e objetiva medir o nível de atividade da doença conforme os diversos órgãos são acometidos (Seror *et al.*, 2015; 2015).

Quarenta por cento dos pacientes (n=921) apresentaram manifestações sistêmicas do ESSDAI nos domínios constitucional, linfadenopatia, glandular, articular, cutâneo, pulmonar, renal, muscular, sistema nervoso periférico e central, hematológico e biológico, sendo que a maioria dos pacientes apresentou dano glandular e o articular (Ramos-Casals *et al.*, 2014).

Para o diagnóstico adequado do quadro clínico é fundamental uma abordagem interdisciplinar dos pacientes com SSp, não somente objetivando aliviar os sintomas locais, mas também buscando realizar um acompanhamento clínico das suas possíveis complicações, já que estas são geralmente eventos tardios no curso da síndrome (Ramos-Casals *et al.*, 2014; Stefanski *et al.*, 2017).

3.4.4 Autoanticorpos circulantes

Os autoanticorpos circulantes parecem exercer papel fundamental na patogenia da doença. Autoanticorpos órgão específicos podem ser detectados nos soros dos pacientes com SSp e são importantes na prática clínica como marcadores diagnósticos de doenças endócrinas e gastrointestinais autoimunes associadas. Destas, as doenças tireoidianas, principalmente o hipotireoidismo, são as mais frequentes nos pacientes com SSp (15,8% dos casos), mas também podem ocorrer hepatite crônica ativa (2,6%), cirrose biliar primária (1,8%), anemia perniciosa (1,8%) e doença celíaca (0,9%) (Lazarus e Isenberg, 2005). De fato, evidenciando o amplo espectro de alterações imunológicas humorais que podem ser encontradas nos pacientes com SSp, os anticorpos marcadores de tais doenças, como antitireoperoxidase (anti-TPO) (tireoidites), anticélulas parietais gástricas (anemia perniciosa), antimitocôndria (cirrose biliar primária), antimúsculo liso (hepatites autoimunes) (Nardi *et al.*, 2006) e antiendomísio

(doença celíaca) (Iltanen *et al.*, 1999) podem ser detectados nos soros destes pacientes.

Além disso, vários autoanticorpos não órgão específicos apresentam relevância clínica, auxiliando no diagnóstico da SSp e também com implicações prognósticas. Os anticorpos antinucleares (FAN) podem ser detectados em cerca de 70% dos pacientes com SSp, mais comumente com padrão de imunofluorescência indireta pontilhado fino e associados com a presença dos anticorpos anti-SSA (Ro)/SSB (La) (Toda, 2002; Routsias e Tzioufas, 2007). Estes últimos, apesar de não específicos, são os autoanticorpos mais comuns nos pacientes com SSp (presentes em cerca de 60 - 90% (Ro) e 30 - 60% (La) dos casos, respectivamente, dependendo da técnica empregada para sua detecção) e constituem um dos principais critérios propostos para o diagnóstico desta síndrome (Shiboski *et al.*, 2012). Além disso, os autoanticorpos anti-SSA (Ro) e anti-SSB (La) são associados com maior prevalência de manifestações sistêmicas e maior intensidade do infiltrado linfocítico em glândulas salivares (Harley *et al.*, 1986).

O fator reumatóide (FR), detectado em cerca de 40 - 50% dos pacientes com SSp, também foi associado à severidade da lesão das glândulas salivares (Routsias e Tzioufas, 2007). Crioglobulinas são encontradas em aproximadamente 20% destes pacientes, os quais apresentam maior frequência de manifestações sistêmicas, particularmente vasculite e maior risco de desenvolvimento de linfoma (Tzioufas e Voulgarelis, 2007).

Mas, além das possíveis correlações clínicas, é interessante que os múltiplos autoanticorpos possam ter um papel relevante na etiopatogenia da SSp através do mecanismo de mimetismo molecular. Tal hipótese está vinculada à participação de agentes virais no desenvolvimento desta doença. O EBV é capaz de modificar o sistema imune do hospedeiro, levando à ativação policlonal dos linfócitos B com consequente aumento da produção de anticorpos. Finalmente, o EBV pode causar o desenvolvimento de autoanticorpos circulantes e, através do mecanismo de mimetismo molecular, desencadear uma resposta imune inapropriada contra células e moléculas próprias do organismo (Harley *et al.*, 2006).

Em indivíduos infectados, o EBV utiliza a cavidade oral para se disseminar devido ao seu tropismo pelas glândulas salivares (Lucchesi *et al.*, 2014).

Um estudo em pacientes com SS afirmou ter observado a associação entre a expressão do EBV e estruturas linfoides ectópicas (centros germinativos) presentes no interior das glândulas salivares, assim, os autores concluíram que essas estruturas servem como nichos de latência e reativação do EBV, podendo contribuir para a ativação dos linfócitos B (Croia *et al.*, 2014). Estas características biológicas do EBV estimularam os estudos sobre a possível participação desses na etiopatogenia desta doença.

Postula-se que a indução de autoimunidade por agentes infecciosos possa ser decorrente de mimetismo molecular - *epitope spreading* - ativação de linfócitos T por superantígenos microbianos e/ou ativação de linfócitos por vírus linfotrópicos (Pasoto *et al.*, 2014).

3.4.5 Classificação morfológica da Síndrome de Sjögren com base na histologia das glândulas salivares mucosas

As glândulas salivares parecem exercer papel central na SSp, ou seja, não apenas representam um foco de lesão, mas como parecem ter um papel no desencadeamento da doença. Assim, alguns autores consideram a doença como uma “epitelite glandular autoimune” (Barrera *et al.*, 2013; Mavragani e Moutsopoulos, 2014). O principal achado morfológico que reforça esta linha de pensamento é a presença de agregados de leucócitos mononucleares ao redor dos ductos e ácinos (Guellec *et al.*, 2013; Mavragani e Moutsopoulos, 2014). Este achado, aliado a conceitos modernos sobre a patogenia da doença, alçaram a biopsia das glândulas salivares a um patamar importante na elaboração diagnóstica.

É consenso a realização da biopsia para diagnóstico nas glândulas salivares mucosas labiais. Este procedimento também é útil para a exclusão de outras condições passíveis de causar xerostomia (Vitali *et al.*, 1993; 2002; Hochberg, 2001). Sua morbidade é baixíssima em relação à biopsia de glândulas

salivares maiores, principalmente após o estabelecimento da técnica de retirada individual das glândulas através de uma incisão (Greenspan *et al.*, 1974), diferente do que era feito anteriormente com retirada de um fusão de mucosa (Chisholm e Mason, 1968).

De acordo com os critérios aceitos pelo ACR (Shiboski *et al.*, 2012), os aspectos histopatológicos observados nas glândulas salivares mucosas labiais são considerados compatíveis com a SSp se o escore focal inflamatório é maior ou igual a 1 foco de linfócitos por 4 mm² em pelo menos 4 lóbulos glandulares representados (sendo considerado como foco o agregado de pelo menos 50 linfócitos) (Vitali *et al.*, 2002; Daniels *et al.*, 2011).

Como descrito em detalhes, a inflamação parece ser ponto central nas alterações glandulares da SSp. Assim, dentre os vários atores inflamatórios, a participação das células dendríticas ainda necessita maior esclarecimento e este estudo visa a melhor compreensão da relação dessas células na glândula doente.

3.5 PAPEL DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS NA IMUNOPATOGENESE DA SÍNDROME DE SJÖGREN PRIMÁRIA

A imunologia é o estudo das respostas imunes e de eventos celulares e moleculares que ocorrem após a detecção de microorganismos e outras macromoléculas. Sob certas situações, mesmo moléculas próprias podem elicitar respostas imunes, caracterizando a reação de autoimunidade (Abbas *et al.*, 2015).

Os mecanismos de defesa dos pacientes são constituídos pela imunidade inata e imunidade adquirida (Figura 6). A imunidade inata é composta por células fagocíticas (neutrófilos e macrófagos), células dendríticas, células *Natural Killer* (NK), além de proteínas plasmáticas (proteínas do sistema complemento). Ela é responsável pela defesa inicial contra infecções, estando preparada para bloquear a entrada de microorganismos e eliminar rapidamente aqueles que conseguiram ultrapassar a barreira epitelial, a mucosa gástrica e/ou trato respiratório, além de estimular a resposta imunológica adquirida. Esta, por sua

vez, se desenvolve posteriormente e proporciona uma defesa mais especializada e eficaz contra as infecções (Abbas *et al.*, 2015).

Fonte: Modificado de Abbas *et al.*, 2015

Figura 6 - Resposta imunológica inata e resposta imunológica adaptativa. A resposta imunológica inata fornece defesa imediata contra os microorganismos invasores, enquanto que a resposta imunológica adaptativa se desenvolve tardiamente e necessita da ativação linfocítica.

Existem dois tipos de imunidade adquirida, a saber: imunidade humoral e imunidade celular. A imunidade humoral é mediada por anticorpos que são produzidos pelos plasmócitos, células oriundas dos linfócitos B, e têm a função de impedir que patógenos presentes nas mucosas e sangue tenham acesso e colonizem as células e os tecidos conjuntivos do hospedeiro. A defesa contra esses microorganismos intracelulares é conhecida como imunidade celular e é mediada pelos linfócitos e Células Apresentadoras de Antígenos (APC's, do inglês, *Antigen-Presenting Cells*) (Abbas *et al.*, 2015).

As APC's estão presentes na pele, trato gastrointestinal e trato respiratório. Possuem função de reconhecer, capturar, transportar os antígenos para os tecidos linfoides periféricos, apresentando-os aos linfócitos T

(Banchereau *et al.*, 2000). As proteínas presentes nas superfícies das APC's, conhecidas como moléculas do Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC), são codificadas pelos genes do sistema Antígeno Leucocitário Humano (HLA, do inglês, *Human Leukocyte Antigens*) e estão intimamente relacionadas às doenças autoimunes. Na SSp, além dos fatores ambientais e hormonais que se fazem presentes, postula-se que o *locus* HLA seja um forte componente genético que predispõe ao desenvolvimento da doença (Teos e Alevizos, 2017). No entanto, mais estudos são necessários para elucidar os demais fatores genéticos e epigenéticos envolvidos na desregulação da resposta imune inata e da resposta imune adaptativa, como ocorre nos pacientes com SSp (Teos e Alevizos, 2017).

Assim como os vírus e bactérias, outro componente importante na modulação imunológica são as células epiteliais ductais e acinares, fundamentais na patogênese da SSp, pois são capazes de produzir citocinas próinflamatórias, promover a atração linfocitária e perpetuar as reações crônicas inflamatórias, evento conhecido como a epitelite autoimune (Mavragani e Moutsopoulos, 2014).

Nesse contexto, as células dendríticas (DC's, do inglês *Dendritic Cells*) surgem como possíveis participantes na patogênese dessa doença (Vogelsang *et al.*, 2006). Essas células são conhecidas como um dos tipos de APC e são capazes de interligar a resposta imune inata à resposta imune adaptativa e, por isso, têm ganhado mais atenção devido ao seu potencial papel nas doenças autoimunes (Jonsson *et al.*, 2011; Qian e Cao, 2018). São conhecidas como as mais potentes APC's, devido a sua capacidade de iniciar uma resposta imune efetiva (Vogelsang *et al.*, 2006). Ao mesmo tempo, desempenham um papel central na manutenção da tolerância a autoantígenos, por meio de DC imaturas em órgãos linfoides periféricos e da ativação de linfócitos T regulatórios (Treg) (Vogelsang *et al.*, 2006; Jonsson *et al.*, 2011; Hovav, 2014).

Uma desregulação funcional nos níveis das citocinas como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon alfa (IFN- α) poderiam influenciar o estágio de maturação das DC, levando à estimulação de células T autorreativas, ao invés de anergia (inativação) ou deleção, e, permitindo a apresentação de

autoantígenos às células T autorreativas, induzindo, portanto, a ativação imunológica aberrante como observada na SSp. As evidências sugerem um papel central controlador das DC's no início das doenças autoimunes, inclusive na SSp (Vogelsang *et al.*, 2006; Ozaki *et al.*, 2010).

As DC's abrangem uma população celular heterogênea, pois são fenotípica e funcionalmente diferentes, compostas por dois principais subtipos: DC's mielóides (mDC), que também incluem as Células de Langerhans (LC's, do inglês *Langerhans Cells*); e DC's plasmocitoides (pDC's), ambas de origem hematopoética (Figura 7) (Vogelsang *et al.*, 2006; Jonsson *et al.*, 2011; Hovav, 2014; Abbas *et al.*, 2015).

Fonte: Produção da própria autora

Figura 7 - Origem hematopoética das células dendríticas mielóides, células de Langerhans e plasmocitoides

As mDC's, também conhecidas como DC's convencionais ou clássicas, são apresentadoras de antígenos profissionais, estão presentes nos tecidos periféricos em estado imaturo, onde são capazes de englobar e processar antígenos, transportando-os via sistema linfático para os órgãos linfoides periféricos e expondo-os aos linfócitos T virgens, os quais se diferenciarão em linfócitos T efetores. Além disso, produzem várias citocinas e quimiocinas importantes para a ativação dos linfócitos T, dessa forma atuando no início e manutenção das respostas imunes primárias (Vogelsang *et al.*, 2006; Hovav, 2014).

As pDC's são conhecidas por sua habilidade de secretar IFN- α , citocina fundamental em vários processos de regulação imunológica. Assim, as pDC's poderiam influenciar na patogênese da SSp pela ativação de várias outras células do sistema imunológico a partir de alterações de secreção desta citocina (Vogelsang *et al.*, 2006; Jonsson *et al.*, 2011; Hovav, 2014).

As células de Langerhans (LC's, do inglês *Langerhans Cells*), descritas por Paul Langerhans em 1868, são oriundas de precursores embrionários que se estabelecem na pele antes do nascimento. Elas representam as DC's nos epitélios e nos linfonodos de drenagem da pele, também estão presentes na mucosa oral normal e inflamada. Possuem longos processos da membrana citoplasmática, semelhantes aos dendritos dos neurônios, que caracterizam seu aspecto estrelado. Seu processo de maturação se dá após o contato com o antígeno. As funções dessas células são semelhantes às das mDC's (Schroeder e Theilade, 1966; Wright-Browne *et al.*, 1997; Hillen *et al.*, 2014).

Também existem as células dendríticas foliculares (fDC's, do inglês *Follicular Dendritic Cells*), de origem mesenquimal, que estão localizadas em folículos linfoides primários e secundários, onde formam um agregado de fDC's, capazes de apresentar antígenos aos linfócitos T que, por sua vez, estimulam a expansão clonal dos linfócitos B, podendo resultar na formação de centros germinativos (GC's, do inglês *Germinal Centers*). Estes estão relacionados a uma forte ativação do sistema imunológico e dano tecidual (Bowman, 2009; Gonzalez *et al.*, 2011; Hillen *et al.*, 2014). A formação de GC's ectópicos na SSp

é um fator que pode indicar o desenvolvimento de linfoma (Sutcliffe, 2006; Bowman, 2009).

Assim como as DC's, os macrófagos também atuam como as APC's (Abbas *et al.*, 2015). De fato, são componentes sensoriais centrais do sistema autoimune e fonte de várias citocinas e quimiocinas. Os macrófagos também compõem o infiltrado inflamatório em lesões de glândulas salivares menores de pacientes com a síndrome e sua quantidade está aumentada em lesões severas, caracterizando um infiltrado inflamatório difuso e, frequentemente, encontrado próximo do epitélio ductal (Manousakis, 2007; Christodoulou *et al.*, 2010).

Em pacientes com manifestações autoimunes, frequentemente, as células T autorreativas escapam do mecanismo de tolerância central. Uma infecção viral inicial ou a presença de imunocomplexos contendo autoantígenos poderia estimular as pDC's, recrutadas dos vasos sanguíneos a secretarem IFN- α no interior de glândulas salivares. Este aumento do nível de IFN- α pode levar à maturação das mDC. Em um indivíduo predisposto a esse tipo de fenômeno, as DC's podem levar à estimulação dos linfócitos T autorreativos e proliferação de autoanticorpos produzidos por linfócitos B autorreativos (Vogelsang *et al.*, 2006). O mecanismo de envolvimento das células dendríticas na SSp está ilustrado na Figura 8.

Fonte: Produção da própria autora

Figura 8 - Mecanismo de envolvimento das células dendríticas na SSp. Diante de uma infecção viral ou presença de imunocomplexos ocorre a migração das células dendríticas (pDC e mDC), presentes em vasos sanguíneos, para o interior da glândula salivar. Nos linfonodos regionais, a célula dendrítica madura apresenta o antígeno aos linfócitos T e B autorreativos que sofrerão expansão clonal e produzirão anticorpos

Um estudo demonstrou que há uma correlação entre a redução da quantidade de mDC's em vasos sanguíneos e a duração da síndrome *sicca* em pacientes com SSp. Parece haver uma migração de DC's imaturas dos vasos para o interior das glândulas salivares, sugerindo que esse evento é comum na fase inicial da SS, mas não na sua manutenção, uma vez que o número de mDC's nos vasos é naturalmente restaurado ao longo curso da doença (Ozaki *et al.*, 2010). As células mDC's, portanto, podem desempenhar papéis importantes na patogênese da *sicca* em pacientes com SS por iniciar as respostas imunológicas dos linfócitos T auxiliares 1 (do inglês *T helper 1* ou Th1) (Ozaki *et al.*, 2010).

Christodoulou *et al.*, em seu trabalho de 2010, embasados em um estudo morfométrico, observaram que as células inflamatórias (linfócitos-T totais, bem como seus subgrupos, linfócitos T CD4, Treg, linfócitos B, macrófagos e DC's) de glândulas salivares menores, em pacientes com SSp, variaram de acordo com a gravidade da lesão em leve, intermediária e grave. Nas lesões leves predominaram os linfócitos T totais e linfócitos T CD4⁺. Enquanto nas lesões graves predominaram células B. Nas lesões intermediárias predominaram as células Treg positivas para FOXP3. A incidência de linfócitos T diminuiu de acordo com o grau de infiltração (número de focos), enquanto a incidência de linfócitos B aumentou. Além disso, observaram que a incidência de macrófagos está associada à gravidade da lesão, quanto maior a gravidade, maior é a quantidade de macrófagos. Ao passo que o número de DC's diminui com a gravidade da lesão.

3.6 BIOMARCADORES: DEFINIÇÃO E EXPRESSÃO

3.6.1 Marcadores de células dendríticas

3.6.1.1 Proteína CD1a

A proteína CD1a é um membro da família de antígenos CD1 (CD1a, CD1b, CD1c, CD1d) que está estruturalmente relacionada às proteínas do MHC não polimórfico expressa em associação com a β 2-microglobulina (Martin *et al.*, 1987; Layre *et al.*, 2014). A CD1a apresenta uma cadeia glicosilada pesando 49 kDa (Van de Rijn *et al.*, 1983). Sua função é mediar a apresentação de antígenos lipídicos e glicolipídicos de origem autógena ou microbiana aos linfócitos T (Layre *et al.*, 2014).

A molécula CD1a tem sido identificada principalmente na membrana plasmática das células de Langerhans e células dendríticas interdigitantes (Krenács *et al.*, 1993).

A presença de DC CD1a⁺ em infiltrado inflamatório de glândulas salivares menores de pacientes com SSp foi sugerida como provável biomarcador para o

diagnóstico histopatológico. Uma avaliação histopatológica e imunoistoquímica demonstrou que de 34 espécimes provenientes de biopsias de glândulas salivares menores, 20 apresentavam DC CD1a⁺ distribuídas difusamente, nas quais o infiltrado linfocítico estava presente em 90% deles, mostrando forte correlação entre a presença dessas células e o infiltrado inflamatório (Van Blokland *et al.*, 2000).

3.6.1.2 Proteína Langerina

A langerina é uma lectina tipo C transmembrânica do tipo II associada à formação de grânulos de Birbeck nas células de Langerhans, as quais são DC's da epiderme - distribuídas ao redor de folículos pilosos e ductos de glândulas sebáceas (Jimbow *et al.*, 1969) - e mucosa (Schroeder e Theilade, 1966). É constituída por porções intracitoplasmáticas (43 aminoácidos com uma estrutura rica em prolina), transmembranar (com 20 aminoácidos), e uma porção extracelular contendo um domínio lectina (Valladeau *et al.*, 2003).

Nas LC's, especificamente no interior dos grânulos de Birbeck, a langerina está presente em conjunto com a molécula CD1a. A langerina serve para internalizar glicolipídios microbianos nos grânulos de Birbeck, em que os glicolipídios são carregados para dentro da molécula CD1a, facilitando assim a apresentação de antígeno por esta molécula aos linfócitos T. A langerina exerce ainda um papel funcional no início da resposta imunológica do hospedeiro às infecções (Hunger *et al.*, 2004).

Oxholm *et al.*, em 1986, observaram, por meio da técnica de dupla marcação de imunofluorescência direta, que espécimes provenientes de mucosa de lábio inferior de pacientes em investigação para SSp expressavam, simultaneamente, LC's (OKT6) e depósitos de imunoglobulinas (IgG e IgA) na região de epitélio da mucosa oral. Os autores afirmaram que as LC's não são células fagocíticas, mas desempenham um papel fundamental como APC. Em 1985, os mesmos autores também observaram numerosas células OKT6 positivas em dispersas no parênquima glândular de um espécime proveniente de uma paciente com diagnóstico de SSp. Quanto à localização, LC's não

estavam apenas dispersas entre as demais células mononucleares, mas também foram encontradas entre células epiteliais acinares, apresentando morfologia pouco estrelada. Por fim, os autores concluíram que as LC's são células imunorreativas, com alta capacidade de apresentação de antígenos, mas seu significado patogenético em tecido glandular de paciente com SSp permanece desconhecido, necessitando mais pesquisas nesta área.

3.6.1.3 Proteína CD21

A CD21 (também conhecida como receptor 2 do complemento [CR2], receptor do C3d, ou receptor do vírus EBV) é uma glicoproteína da membrana celular encontrada na superfície de linfócitos B, com peso molecular de aproximadamente 140 kDa. Essa proteína faz a ligação do vírus EBV aos linfócitos B nas infecções por esse vírus (Bohnsack e Cooper, 1988; Moore *et al.*, 1989). A proteína CD21 permite ao sistema complemento realizar a ativação e maturação dos linfócitos B, sendo sua expressão, portanto, essencial para o funcionamento dos linfócitos B (Molina *et al.*, 1990).

A CD21 tem um domínio citoplasmático curto e sua sinalização é dependente da presença da molécula co-sinalizadora CD19, a qual também é essencial para a ativação das células B, sendo expressa nessas células (Pringle *et al.*, 2012).

Além dos linfócitos B, a CD21 também é expressa em fDC's (Liu *et al.*, 1997) e células epiteliais (Birkenbach *et al.*, 1992).

As fDC's ectópicas e linfócitos B foram observados - por meio da imunoexpressão das proteínas CD21, CD23, CD35 e IgD - em glândulas salivares menores de pacientes com SSp, morfologicamente agrupadas em estruturas semelhantes aos GC's encontrados nos linfonodos regionais (Jonsson e Skarstein, 2008). Os GC's ectópicos têm sido associados ao alto risco de transformação maligna, haja vista que pacientes com SSp possui risco 16 à 44 vezes maior de desenvolver linfoma non-Hodgking (Theander *et al.*, 2006). A presença de GC ectópico sugere que haja uma contínua apresentação de

antígenos aos linfócitos B e ativação da resposta imunológica (Jonsson e Skarstein, 2008).

3.6.1.4 Proteína CD123 (ILR3- α)

A ILR3-alfa (ILR3- α , do inglês, *Interleukin 3 Receptor*) é uma proteína pertencente a um receptor heterodimérico, também conhecida como CD123. Esse receptor composto por duas subunidades, a saber: ILR3-alfa, com peso molecular de 70kDa, e ILR3-beta, com 120kDa, sendo ambas essenciais para a sinalização e interdependentes (Kosugi *et al.*, 1995).

Os imunomarcadores da proteína CD123 (ILR3- α) são capazes de distinguir as células dendríticas plasmocitoides (pDC's) das mDC's e de seus subtipos (Dzionek *et al.*, 2000). Apesar da pequena quantidade das pDC's nos tecidos saudáveis, elas podem ser facilmente recrutadas dos vasos sanguíneos após uma inflamação, pois possuem uma variedade de funções inflamatórias e tolerogênicas (Reizis *et al.*, 2011; Haniffa *et al.*, 2012).

As pDC's são células da imunidade inata e são as principais responsáveis pela produção de interferon (IFN) tipo I em resposta a ácidos nucleicos estranhos (Zhao *et al.*, 2016). Possuem papel no estímulo da produção de células hematopoiéticas de múltiplas linhagens, incluindo granulócitos, monócitos/macrófagos, megacariócitos e linfócitos B, assim atuando como elo entre a resposta imune inata e adaptativa (Reizis *et al.*, 2011).

Embora a ILR3- α (CD123) desempenhe importante papel no sistema imunológico, sua estimulação excessiva ou expressão aberrante pode contribuir para condições patológicas (Sun *et al.*, 1996). Nesse contexto, as pDc's parecem estar envolvidas na patogênese da SSp (Wildenberg *et al.*, 2008). Elas possuem influência na patogênese da SSp pela ativação de várias outras células do sistema imunológico a partir de alterações de secreção do IFN- α (Vogelsang *et al.*, 2006).

Nessa síndrome, as pDC's estão diretamente associadas aos linfócitos B, principalmente em infiltrados inflamatórios intensos de glândulas salivares

menores, caracterizando seu papel central na imunopatogênese da SSp. As pDC's produzem o IFN- α que, por sua vez, induz a produção da quimioquina CXCL13 pelos macrófagos e esta última estimula a infiltração de linfócitos B em direção às glândulas salivares menores em pacientes com SSp. Logo, observar a presença dessas células nos infiltrados é importante não só para o diagnóstico da SSp, mas também para futuras decisões terapêuticas (Zhao *et al.*, 2016).

3.6.2 Marcador da imunidade inata

3.6.2.1 Proteína CD68

A CD68 é uma glicoproteína transmembranar do tipo I, com peso molecular de 110 kDa e sequência similar a da família das ubiquitinas, expressas em proteínas transportadoras presentes em membranas lisossômicas ou plasmáticas, conhecidas como LAMP-1. É uma proteína pertencente à família de moléculas semelhantes às mucinas hematopoiéticas (Holness e Simmons, 1993).

A expressão dessa proteína ocorre em células mononucleares pertencentes à linhagem fagocítica como: monócitos/macrófagos, osteoclastos, células de Kupffer, granulócitos (eosinófilos, basófilos e neutrófilos) e seus precursores. Ela está intensamente expressa no interior de compartimentos endossomais e possui alta capacidade de se deslocar rapidamente para a membrana plasmática, onde postula-se que ela participe da adesão celular e da apresentação do antígeno (Kurushima *et al.*, 2000).

Manoussakis *et al.*, 2007, objetivando avaliar o perfil de expressão de macrófagos (CD68) e DC's (S100) em espécimes de glândula salivar de pacientes com SSp observaram uma grande quantidade de macrófagos dispersos ou agregados na região periductal, principalmente em centros germinativos, e uma infiltração intraepitelial das DC's. Esses achados sugeriram uma forte expressão local de fatores quimiotáticos para APC's e intensa interação entre essas células e as do epitélio ductal.

Dessa forma, a alta taxa de infiltração de macrófagos em lesões de SSp está relacionada ao desenvolvimento de linfomas (Christodoulou *et al.*, 2010). Logo, os macrófagos exercem um papel central na patogênese da síndrome, pois além de atuarem na apresentação de antígenos, são capazes de perpetuarem o processo inflamatório, consequentemente, aumentando a probabilidade de eventos linfoproliferativos em lesões severas de SSp (Manoussakis *et al.*, 2007, Christodoulou *et al.*, 2010).

3.6.3 Marcadores de linfócitos

3.6.3.1 Proteína CD3ε

A proteína CD3 é um complexo de co-receptor da célula T (TCR) constituído de 6 polipeptídeos com 4 cadeias CD3 transmembranares distintas (γ gama, δ delta, ϵ épsilon e ζ zeta) que auxiliam na ativação da célula T citotóxica. Em humanos, o complexo CD3 apresenta uma cadeia CD3 γ , uma cadeia CD3 δ e duas cadeias CD3 ϵ , as quais se associam ao receptor de célula T e à cadeia ζ para gerarem o sinal de ativação dos linfócitos T (Clevers *et al.*, 1988; Su *et al.*, 2009).

A proteína CD3 ϵ possui massa molecular de 20 kDa (Pessano *et al.*, 1985) e é expressa no citoplasma de células *Natural Killer* (NK) e em membranas celulares da maioria dos linfócitos T (Lanier *et al.*, 1992; Su *et al.*, 2009).

O complexo molecular CD3 é composto por várias cadeias polipeptídicas, cuja função é traduzir o sinal antigênico da membrana celular ao núcleo do linfócito T. Quando um receptor-antígeno heterodímero é, especificamente, ativado pelo antígeno apresentado, por meio do MHC classe II, os linfócitos T sofrem a expansão clonal. Na SSp, a expressão dos linfócitos CD3⁺ é normal, no entanto, sua função está moderadamente reduzida, provavelmente devido a um defeito na sinalização intracelular (Dauphinée *et al.*, 1989).

Celenligil *et al.*, em 1990, estudaram pacientes com SSp e controles saudáveis, examinando características fenotípicas e a distribuição dos linfócitos

imunoreguladores, por meio da análise do infiltrado inflamatório perivascular (técnica de imunofluorescência) e das glândulas salivares mucosas labiais (técnica da imunoperoxidase), respectivamente. Os autores observaram que nos pacientes com SSp o número total de linfócitos T CD3⁺ ($769 \pm 66/\text{mm}^3$) perivasculars foi menor do que no grupo controle ($1025 \pm 90/\text{mm}^3$), sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Em contrapartida, as amostras de glândulas salivares mucosas, desses mesmos pacientes, revelaram a presença de um infiltrado inflamatório denso, predominantemente composto por linfócitos TCD3⁺, TCD4⁺ (*helper*), TCD8⁺ e linfócitos B, que se localizavam na região periductal, sendo composto por linfócitos e células plasmocitoides. Além disso, os espécimes de pacientes com a síndrome exibiram atrofia acinar, dilatação ductal, avançada atrofia, fibrose e substituição do tecido glandular por tecido adiposo. Os autores concluíram que todo esse processo de injúria que ocorre na SSp é mediado pela imunidade celular e que futuros estudos poderão facilitar a elucidação da patogênese da doença, desde que incluam a análise do infiltrado inflamatório em glândulas salivares.

Em 2010, Christodoulou *et al.*, avaliaram a distribuição dos principais tipos de células do infiltrado inflamatório em espécimes de glândulas salivares mucosas de pacientes com SSp, com distintos graus de intensidade, tais como: lesões leves, intermediárias ou graves. Os autores observaram que os linfócitos T CD3⁺ apresentavam-se bastante evidentes nas amostras de SSp estudadas, chegando a compor, juntamente com os linfócitos B, mais de 90% do infiltrado inflamatório (variação de 24,37% a 75,25% - média 47,08% para linfócitos T). Além disso, os linfócitos T CD3⁺ estavam predominantemente localizados ao redor de ductos e também em arquitetura perivascular, enquanto os linfócitos B localizavam-se no centro. Essa disposição celular foi mais evidente em lesões graves, em que o infiltrado estava organizado em GC's. Concluíram ainda que os linfócitos T totais (CD3⁺) estão presentes, principalmente, em lesões com grau leve, enquanto nas lesões severas há predominância dos linfócitos B.

3.6.4 Proteína CD4

A CD4 é uma glicoproteína, com peso molecular de 55 kDa, que possui 4 domínios tais como imunoglobulinas (D1-D4) e expressa-se na superfície de linfócitos T auxiliares (*helper*) durante seu desenvolvimento, atuando como co-receptora (Isobe *et al.*, 1986; Parnes, 1989).

Ela auxilia o receptor do linfócito T a se comunicar com a célula apresentadora de antígeno através de uma interação com as principais moléculas do MHC classe II. Essa interação potencializa a tradução do sinal mediante a interação entre a cauda citoplasmática do CD4 e a tirosinaquinase de proteína específica ao linfócito (Isobe *et al.*, 1986; Veillette *et al.*, 1988), que por fim resulta na proliferação e diferenciação dos linfócitos T (Parnes, 1989; Miceli e Parnes, 1993).

Em 2015, Sudzius *et al.* se propuseram a avaliar, por meio da citometria de fluxo, alterações na distribuição da população linfocítica perivascular de 52 pacientes com SSp, destes 29 possuíam anti-SSA e/ou anti-SSB⁻ e 23 anti-SSA e/ou anti-SSB⁺, além de 28 pacientes saudáveis (controle). Os autores observaram que a contagem absoluta de linfócitos TCD4⁺ era significativamente menor em ambos os grupos com SSp do que no controle, sendo que a contagem absoluta de linfócitos TCD4⁺ foi significativamente menor ao redor de vasos sanguíneos de pacientes com autoanticorpos positivos do que no grupo de pacientes com autoanticorpos negativos. Este fato é explicado devido à migração de células que compõem o infiltrado mononuclear para o interior de glândulas como, por exemplo, as glândulas salivares menores em pacientes com SSp e a sua prevalência varia de acordo com a gravidade da doença. Por fim, os autores afirmaram que esta linfocitopenia ao redor de vasos sanguíneos também pode ser geneticamente determinada e são enfáticos quanto à necessidade de estudos complementares que avaliem, por meio da imunoistoquímica, a distribuição da população celular em glândulas salivares, concomitantemente, à análise vascular.

Seguindo esta linha de pensamento, autores observaram, por meio de citometria de fluxo e imunoistoquímica, que houve predominância do infiltrado

linfocítico composto por linfócitos T, majoritariamente dos linfócitos T CD4⁺, em espécimes de glândulas salivares mucosas. No entanto, eles não souberam explicar a natureza exata da atração desses linfócitos em torno de ductos e no interstício glandular (Celengil *et al.*, 1990) e nem dinâmica celular existente (Sudzius *et al.*, 2015).

3.6.5 Proteína CD8

CD8 é uma glicoproteína de superfície celular co-receptora da célula T, com massa molecular de 68 kDa e que se expressa como homodímero ligado ao dissulfeto de dois monômeros CD8 α ou como um heterodímero de CD8 α e CD8 β (Devine e Kavathas, 1999; Gao e Jakobsen, 2000). Na maioria das vezes é expressa como heterodímero pelos timócitos e linfócitos T citotóxicos. Na forma de homodímero é expressa por uma proporção de células T e NK (Sun e Kavathas, 1997).

Esses receptores CD8 α e β interagem com ligantes, por exemplo, o MHC classe I, na superfície externa da célula, com proteínas dentro da célula (tirosinaquinase p56^{lck}), e possivelmente com proteínas na mesma superfície celular (Devine e Kavathas, 1999; Gao e Jakobsen, 2000).

Quanto à função, a proteína CD8 desempenha um papel nas interações do antígeno com o linfócito T citotóxico e também na sinalização dos linfócitos T (Sun e Kavathas, 1997).

O papel dos linfócitos T citotóxicos é evidenciar os autoantígenos e atuar na eliminação infecção aguda por meio da destruição de células infectadas. Na SSp, os linfócitos T CD8⁺ constituem cerca de 15% de todo infiltrado mononuclear (Sudzius *et al.*, 2015), entretanto, não há diferença entre a quantidade dos linfócitos T CD8 e a variação de severidade da lesão (Christodoulou *et al.*, 2010).

Sabe-se que a granzima A, uma serina protease contida em grânulos especializados de células citolíticas, foi primariamente observada em linfócitos TCD8⁺, mas sua expressão também foi verificada em linfócitos T CD4⁺ (Susan

et al., 1994; Xanthou, 1999). Os autores observaram que a expressão de granzima A estava diretamente correlacionada com o alto escore focal e com a alta atividade clínica da doença. Portanto, a expressão de granzima A desempenhou um papel fundamental na destruição da glândula salivar na SSp, haja vista que uma grande quantidade de linfócitos agrupados em focos inflamatórios foi capaz de promover a destruição glandular (Susan *et al.*, 1994).

3.6.6 Proteína CD20

A CD20, também conhecida como molécula B1, é uma fosfoproteína não glicosilada presente na superfície de linfócitos B, sejam nos precursores dos linfócitos B ou nos linfócitos B maduros. Nos linfócitos B não ativados, a CD20 aparece na forma não fosforilada com peso molecular de 33 kDa. Após a fosforilação a CD20 adquire um peso molecular variando de 35 a 37 kDa, sendo assim uma fosfoproteína dominante nos linfócitos B ativados (Tedder *et al.*, 1988).

Pesquisas têm sugerido que a proteína CD20 possui um papel direto na regulação do fluxo (transportadora) de íons Ca^{+2} transmembranares dos linfócitos B, indicando uma possível função dessa proteína como reguladora da proliferação e diferenciação dos linfócitos B em células plasmocitoides (Tedder e Engel, 1994; Léveillé *et al.*, 1999).

Histopatologicamente, o envolvimento glandular na SSp é caracterizado pelo acúmulo focal de linfócitos, especialmente ao redor de ductos e, em muitos casos, surgem estruturas que se assemelham a GC's, (Celengil *et al.*, 1990; Salomonsson *et al.*, 2003). Esses infiltrados são compostos, predominantemente, por linfócitos TCD4+. Como resultado, a patogênese da SSp foi, durante muitos anos, atribuída aos linfócitos T (Susan *et al.*, 1994; Xanthou *et al.*, 1999). No entanto, o surgimento de estratégias terapêuticas para diminuição da quantidade dos linfócitos B revelou-se notavelmente eficaz, inclusive quando comparadas à terapia contra linfócitos T, indicando um papel fundamental dos linfócitos B na imunopatogênese da SSp (Hamza *et al.*, 2012).

Seguindo esta linha de pensamento, sabe-se que nesta síndrome existem sinais clássicos de hipergamaglobulemia e aumento da produção de autoanticorpos como anti-Ro/SSA e anti-La/SSB que evidenciam a hiperativação dos linfócitos B (Lee *et al.*, 2016; He *et al.*, 2017) e que, juntamente com os autoantígenos, citocinas, quimicinas e com as demais células do infiltrado inflamatório, são capazes de perpetuar a resposta inflamatória crônica, contribuindo para a destruição tecidual e para a perda de função como ocorre nas glândulas salivares de pacientes com SSp.

Em, aproximadamente, ¼ dos casos em que ocorre a expansão clonal dos linfócitos B é possível observar a presença de GC em órgãos alvo e, aproximadamente, 5 a 10% desses podem progredir para o linfoma MALT (*Mucosa Associated Lymphoid Tissue*), um tumor de linfócitos B (Salomonsson *et al.*, 2003; Theander *et al.*, 2006; Hamza *et al.*, 2012).

Recentemente Denescu *et al.* (2017), objetivando avaliar, por meio da imunistoquímica, o padrão de atividade de células imunológicas presentes em glândulas salivares de pacientes com SSp, observou que em metade dos casos avaliados foi possível detectar a expressão da proteína CD20 associada a um importante infiltrado linfocítico periductal em espécimes com escore focal moderado e intenso. Salientando, portanto, a relação dessas células com o grau de severidade das lesões e seu papel crucial na perpetuação da doença.

3.6.7 Proteína Bcl6

A BCL6 (do inglês, *B-cell lymphoma 6*), codificada pelo gene de mesmo nome, é uma fosfoproteína nuclear de 95 kDa pertencente à família de fatores de transcrição “dedo” de zinco. É composta por um domínio BTB N-terminal/POZ. Devido às mutações somáticas no gene que codifica esta fosfoproteína, tem sido sugerido que ela seja fundamental na repressão de genes envolvidos no controle da ativação linfocítica, diferenciação e apoptose no interior dos centros germinativos. Um exemplo disso é a sua atividade na supressão da proteína p53 em linfócitos B, impedindo que esses linfócitos entrem em apoptose (Pasqualucci *et al.*, 2003; Jardin *et al.*, 2007).

A molécula BCL6 está expressa em linfócitos B maduros presentes em centros germinativos não neoplásicos e neoplásicos. Devido à desregulação nos níveis dessa proteína, ela aparece em grandes proporções em linfomas, inclusive o não-Hodgkin, que representam um grupo heterogêneo de neoplasias linfoides com diferentes apresentações, evoluções, prognósticos e tratamentos (Pasqualucci *et al.*, 2003; Jardin *et al.*, 2007; Haacke *et al.*, 2018).

A grave complicação da SSp é, exatamente, o desenvolvimento de linfoma não-Hodgkin, especialmente do linfoma MALT, haja vista que as pacientes com esta síndrome apresentaram um risco relativo de 43,8 vezes maior para o desenvolvimento de linfoma do que população em geral (Kassan *et al.*, 1978), sendo que entre 5 a 10% dessas podem, de fato, desenvolver esta complicação fatal (Sutcliffe, 2006). A razão de mortalidade entre pacientes com diagnóstico de SSp quanto à presença e ausência de linfoma foi de 3,25 e 1,08, respectivamente, sugerindo uma menor expectativa de vida para o primeiro grupo (Voulgarelis *et al.*, 2012).

O estudo de Theander *et al.*, (2011), evidenciou a importância da avaliação da presença de GC's durante a fase de diagnóstico da SSp, uma vez que os espécimes de glândulas salivares menores dos pacientes avaliados puderam prever o desenvolvimento do linfoma. Logo, observar a presença de centros germinativos é fundamental para o prognóstico desses pacientes.

Recentemente, Haacke *et al.* (2017) afirmaram que é fundamental a avaliação de estruturas semelhantes a GC's por meio de imunomarcadores, tais como o BCL6 e o CD21 (fDC's) em espécimes de glândulas salivares mucosas, de modo que os GC's possam ser bem caracterizados e assim possibilitem sua real compreensão clínica por meio de biopsias de glândulas salivares de pacientes com SSp.

Considerando as lacunas ainda existentes acerca do mecanismo fisiopatológico do infiltrado inflamatório na Síndrome de Sjögren, o presente estudo pretende, com base na hipótese postulada, responder a seguinte indagação: as células dendríticas são parte efetiva do infiltrado inflamatório glandular na Síndrome de Sjögren primária?

4 MÉTODOS

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) sob número do parecer 982.743 (Apêndice A).

4.1 CASUÍSTICA

O estudo é observacional retrospectivo com um delineamento longitudinal em pacientes com SSp atendidos no HC-FMUSP, no período de 2007 a 2017.

A amostra foi composta por 30 espécimes de glândulas salivares mucosas labiais de pacientes com SSp (**grupo caso**) provenientes dos arquivos do Laboratório de Dermatopatologia da Divisão de Dermatologia do HC-FMUSP (Apêndice B). Os pacientes foram diagnosticados previamente com base nos critérios propostos pelo *American-European Consensus Group Criteria*, 2002 (Vitali *et al.*, 2002) (Anexo A), *American College of Rheumatology*, 2012 (Shiboski *et al.*, 2012) (Anexo B) e pelo *American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism*, 2016 (Shiboski *et al.*, 2017) (Anexo C) para o diagnóstico inequívoco de SSp.

Também foram coletadas 10 amostras de glândulas salivares mucosas labiais (**grupo controle**) de pacientes sem SSp, no momento da autópsia realizada no Serviço de Verificação de Óbito de São Paulo do HC-FMUSP (Apêndice C). Buscou-se o pareamento das amostras conforme os dados de sexo e idade.

Dos prontuários foram coletados dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes no momento da coleta da biópsia, tais como: idade, sexo, raça/cor, critério subjetivo de olho seco e boca seca, sorologia e outros dados de exames laboratoriais. O índice de atividade da doença (ESSDAI, do inglês, *EULAR-SS Disease Activity Index* – Anexo D) também foi determinado com base na data da

coleta da biopsia e cada domínio foi calculado a partir do auxílio da reumatologista, docente da FMUSP, responsável pelo ambulatório de SSp da Divisão de Reumatologia do HCFMUSP. O ESSDAI foi categorizado em baixa atividade (ESSDAI <5), moderada atividade ($5 \leq \text{ESSDAI} \leq 13$) e alta atividade (ESSDAI ≥ 14), conforme proposto por Seror et al. (2016). O tempo de diagnóstico foi calculado com base nos anos de coleta da biopsia e de fechamento de critérios diagnósticos subjetivos, tais como olho seco e boca seca. Dos laudos necroscópicos foram coletados dados como sexo, idade, raça/cor, doença principal e causa do óbito.

Foram realizados cortes histológicos de 3 μ m dos espécimes para a subsequente coloração de hematoxilina-eosina (H&E), a fim de se analisar os aspectos teciduais e celulares dos espécimes incluídos no estudo, dentre eles: o número de focos inflamatórios, o escore focal e a intensidade do infiltrado inflamatório. Além do H&E, também foram realizados outros cortes histológicos para as análises imunoistoquímicas.

Toda a etapa laboratorial foi realizada no Instituto de Medicina Tropical (IMT), no laboratório de técnicas imunomoleculares – LIM 06.

4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

No grupo caso foram incluídas amostras de pacientes de ambos os sexos, com idade a partir de 18 anos, cujos espécimes de glândulas salivares realizadas para o seu diagnóstico prévio estivessem armazenados nos arquivos do Laboratório de Dermatopatologia da Divisão de Dermatologia do HC-FMUSP.

No grupo controle foram incluídas amostras de glândulas salivares mucosas labiais de pacientes com idade a partir de 18 anos, de ambos os sexos e sem SSp, cuja autópsia foi realizada no Serviço de Verificação de Óbito de São Paulo do HC-FMUSP.

4.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Prontuários ou laudos necroscópicos sem indícios de doença autoimune sistêmica e registro de outras enfermidades passíveis de causar xerostomia, tais como tratamentos radioativos prévios na cabeça e pescoço, infecção por hepatite C, síndrome da imunodeficiência adquirida, linfoma preexistente, sarcoidose, amiloidose, hemocromatose e doença enxerto-versus-hospedeiro. Além de prontuários com dados incompletos e espécimes insuficientes para as análises.

4.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Foram realizados cortes histológicos de 3µm dos espécimes para a subsequente coloração de H&E, objetivando a análise histológica dos casos incluídos nesta pesquisa.

As lâminas foram submetidas a uma sequência de hidratação com o propósito de remover a parafina, com xilol quente e frio durante 30 e 5 minutos, respectivamente. E em seguida, foram submetidas à cadeia descendente de etanol 100%, 95% e 70% (durante 2 minutos cada), lavadas em água destilada e coradas em hematoxilina de Harris por 5 minutos.

Posteriormente, os cortes foram lavados em água corrente para remoção do excesso do corante e corados com eosina durante 8 minutos, lavados em água corrente para remoção do excesso do corante e, finalmente, desidratados duas vezes em sequência ascendente de álcoois 70%, 95% e 100%, e, xilol, seguidos da montagem com resina ERV-MOUNT (*EasyPath*) para o exame sob microscópio de luz.

4.4.1 Análise dos focos inflamatórios, gravidade da lesão e de centros germinativos

Os casos incluídos nesse estudo foram classificados quanto à quantidade de focos inflamatórios de acordo com Daniels *et al.* (2011) e conforme sugerido por Shiboski *et al.* (2017) no recente consenso metodológico internacional para classificação de SSp, realizado pelo *American College of Rheumatology* (ACR) e a *European League Against Rheumatism* (EULAR). Para isso, foi quantificado o número de focos inflamatórios de cada espécime corado em H&E, bem como a área total glandular presente em cada caso (Apêndice D).

Um dos critérios propostos nesta classificação (Anexo C) é a sialadenite linfocítica focal, caracterizada pelo escore focal ≥ 1 focos/4mm² presentes no tecido glandular (sendo considerado como foco o agregado de pelo menos 50 linfócitos) (Tarpley *et al.*, 1974; Shiboski *et al.*, 2017). Assim, as amostras de glândulas salivares menores labiais foram classificadas quanto ao número de focos inflamatórios em: <1, 1 ou >1 (Daniels *et al.*, 2011), com base na fórmula matemática descrita a seguir para o cálculo do escore focal:

[Escore focal é igual a 4 vezes o número de focos do caso dividido por área tecidual total em mm² – (EF= 4 x nº focos/área total)].

As lesões presentes em glândulas salivares menores foram classificadas quanto à intensidade do infiltrado inflamatório conforme proposto por Tarpley *et al.* (1974) em: infiltrado inflamatório leve, moderado e intenso. O infiltrado inflamatório leve era composto por um ou dois agregados inflamatórios, o moderado era composto por 3 ou mais agregados de células mononucleares por lóbulo e o infiltrado inflamatório intenso era caracterizado por um infiltrado difuso com destruição parcial ou total do tecido acinar (com ou sem fibrose).

As demais análises morfológicas foram realizadas, simultaneamente, por dois pesquisadores em microscópio óptico. Critérios adicionais para análise dos espécimes foram considerados, tais como citados no Anexo E.

4.5 TÉCNICA IMUNOISTOQUÍMICA

Novos cortes com espessura de 3µm obtidos dos mesmos espécimes selecionados foram submetidos à técnica imunoistoquímica, por meio da técnica imunoperoxidase, para a detecção das proteínas: com os anticorpos CD1a, Langerina, CD21, CD123, CD68, CD3, CD8, CD4, CD20cy e BCL6.

Os cortes foram pré-aquecidos durante 30 minutos a 60°C e desparafinizados em dois banhos de xilol à temperatura ambiente por 15 minutos cada. Em seguida, os cortes foram reidratados em cadeia descendente de etanol - 100% e 95% respectivamente - e imersos em solução de hidróxido de amônia 10% durante 10 minutos para remoção dos pigmentos formólicos.

Detalhes sobre a recuperação antigênica de cada anticorpo estão descritos no Quadro 3.

Após os banhos de 5 minutos em água corrente e destilada, os cortes foram imersos duas vezes em solução de peróxido de hidrogênio 10 volumes por 10 minutos cada, a fim de se bloquear a peroxidase endógena. Para o bloqueio das proteínas inespecíficas os espécimes foram incubados com o reagente *Protein Block* (Lote: LHL 150331 - *Ultravision Detection System – ThermoScientific- Thermo Scientific, Fremont, CA, USA*) por 20 minutos.

Posteriormente, os cortes foram incubados com anticorpo primário diluído em solução de 1% de BSA (Lote: 11H0115 - *Sigma Chemical – St. Louis, MO, USA*) em PBS pH 7,4. Demais informações sobre soros primários e etapas específicas do protocolo estão descritas no Quadro 3. O período de incubação dos anticorpos primários foi de 12 horas (*overnight*), em temperatura de 4°C.

Conforme detalhado no Quadro 3, diferentes tecidos foram utilizados como controle positivo das reações imunoistoquímicas, sendo considerado controle negativo quando a incubação foi realizada apenas soro não reagente e controle positivo quando o anticorpo primário foi utilizado na incubação.

Quadro 3 - Resumo dos protocolos encontrados para cada anticorpo

Anticorpo primário	Procedência e clone	Título	Recuperação antigênica	Anticorpo secundário e procedência	Controle
CD1a	Dako 010	1:800	Tampão Tris-EDTA pH 9,0/ <i>Steamer</i>	<i>Ultravision LP detection system/ Thermo Scientific Ref. TL -125 - HL</i>	Tonsila
Langerina	<i>Cell marque</i> 12D6	1:200	Tampão Tris-EDTA pH 9,0/ <i>Steamer</i>	<i>HiDef HRP Mouse/Rabbit polymer detection system/ Cell Marque Ref. 954D-20</i>	Pele
CD21	<i>Cell marque</i> 2G9	1:100	Tampão Tris-EDTA pH 9,0/ <i>Steamer</i>	<i>HiDef HRP Mouse/Rabbit polymer detection system/ Cell Marque Ref. 954D-20</i>	Tonsila
CD123	<i>Cell marque</i> 6H6	1:50	Tampão Tris-EDTA pH 9,0/ <i>Steamer</i>	<i>Ultravision LP detection system/ Thermo Scientific Ref. TL -125 - HL</i>	Pele
CD68	Dako M814	1:1000	Tampão citrato pH 6,0/ <i>Steamer</i>	<i>Ultravision LP detection system/ Thermo Scientific Ref. TL -125 - HL</i>	Tonsila
CD3ε	Dako F7.2.38	1:100	Tampão Tris-EDTA pH 9,0/ <i>Steamer</i>	<i>Ultravision LP detection system/ Thermo Scientific Ref. TL -125 - HL</i>	Tonsila
CD8	Dako C8/144B	1:200	Tampão Tris-EDTA pH 9,0/ <i>Steamer</i>	<i>Ultravision LP detection system/ Thermo Scientific Ref. TL -125 - HL</i>	Tonsila
CD4	<i>Cell marque</i> (SP35)	1:75	Tampão Tris-EDTA pH 9,0/ <i>Steamer</i>	<i>Ultravision LP detection system/ Thermo Scientific Ref. TL -125 - HL</i>	Tonsila
CD20cy	Dako L26	1:600	Tampão Tris-EDTA pH 9,0/ <i>Steamer</i>	<i>Ultravision LP detection system/ Thermo Scientific Ref. TL -125 - HL</i>	Tonsila
BCL6	<i>Cell marque</i> EP278	1:1000	Tampão Tris-EDTA pH 9,0/ <i>Steamer</i>	<i>Ultravision LP detection system/ Thermo Scientific Ref. TL -125 - HL</i>	Tonsila

Fonte: Produção da própria autora

Os procedimentos descritos a seguir foram sempre precedidos de dois banhos em PBS, com pH 7,4, durante 5 minutos cada.

Após a incubação com o anticorpo primário, os espécimes foram incubados com dois reagentes *Primary Antibody Enhanced*, e *HRP Polymer*

(Lote: LHL 150331 - *Ultravision Detection System* – *Thermoscientific- Thermo Scientific, Fremont, CA, USA*) por 20 e 30 minutos, respectivamente, e em temperatura ambiente.

Na reação de revelação, os espécimes foram incubados com a solução reveladora 3,3' diaminobenzidina (DAB) (Lote: HDX 100920 - *Thermo Scientific, Fremont, CA, USA*) que evidencia a reação por meio da coloração acastanhada.

Em seguida, os espécimes foram banhados em água corrente e destilada, levemente contracorados com hematoxilina de Carazzi por 2 minutos e, novamente, banhadas em água corrente e destilada para remoção do excesso de corante.

Posteriormente, os cortes foram desidratados em cadeia ascendente de etanóis, diafanizados em três banhos de xilol e montados em resina ERV-MOUNT (Lote: EP-51-05042 – *EasyPath* - Erviegas LTDA, SP, BRA) para o exame ao microscópio de luz.

4.6 ANÁLISE MORFOMÉTRICA

A análise morfométrica foi realizada a partir do escaneamento das lâminas processadas pela técnica imunoistoquímica no equipamento o Pannoramic 250 *Flash* (3DHISTECH – n. série P250-010806, Budapeste, Hungria), com a resolução óptica de 1,63 pixel/micrômetro. A magnificação da objetiva Plan-Apochromat utilizada foi de 40 vezes e o tipo da câmera acoplada foi a CIS VCC-FC60FR19CL.

Em seguida, foi realizada exportação de todas as imagens com auxílio do programa Pannomarc *Viewer* (V1.15.4.43061, Budapeste, Hungria) para formato TIFF e, posteriormente, para o formato JPEG por meio do programa de edição de imagens - Adobe Photoshop (v. 2017.0.0, Adobe Systems, EULA, USA). O número de imagens geradas em cada caso estudado variou de acordo com a área tecidual total.

A etapa de padronização de cores foi realizada a partir da calibração do programa *Image-Pro Plus* (V 4.5.0.29 para Windows 98/NT/2000, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) com base na resolução da imagem.

Posteriormente, foram quantificadas áreas ductais, glandulares e de tecido de substituição positivas e totais, em cada amostra de glândula salivar mucosa labial de pacientes com SSp e sem a doença, para as seguintes proteínas: CD1a, Langerina, CD21, CD123, CD68, CD3, CD4, CD8, CD20cy e BCL6.

A análise da presença e ausência dos GC's foi realizada por meio da observação da imunomarcação com os anticorpos BCL6 e/ou CD21. Na literatura há várias formas de análise dos GC's, desde análise em H&E (Theander *et al.*, 2011), análise por meio do CD21 (Jonsson *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2016; He *et al.*, 2017), análise por meio do BCL6 (Haacke *et al.*, 2017) e análise concomitante do CD21 e BCL6 (Haacke *et al.*, 2018).

Detalhadamente, os dados morfométricos foram coletados com o auxílio do programa *Image-Pro Plus*. Nas imagens analisadas foram inicialmente delineadas as áreas de ductos nas quais foi aplicado o espectro de cor previamente padronizado para cada proteína incluída no estudo. A área positiva foi registrada, bem como a área total ocupada pelos ductos.

Fonte: Produção da própria autora

Figura 9 - Imagem digitalizada inicial de glândula salivar mucosa de paciente com SSp

Cada ducto foi selecionado e adicionado separadamente. A ferramenta de zoom e as barras de rolagem vertical e horizontal foram utilizadas para observar a presença de lúmen ductal.

Fonte: Produção da própria autora

Figura 10 - Seleção da área ductal de glândula salivar mucosa de paciente com SSp

Fonte: Produção da própria autora

Figura 11 - Seleção de todas as áreas ductais existentes em glândula salivar mucosa de paciente com SSp

O padrão de cor desejado foi selecionado e foi obtida a soma da área positiva ductal e a soma da área ductal total.

Fonte: Produção da própria autora
Figura 12 - Área positiva ductal

Fonte: Produção da própria autora
Figura 13 - Soma da área positiva ductal

Fonte: Produção da própria autora
Figura 14 - Soma da área total ductal

Em seguida, foram delineadas as áreas glandulares nas quais foi aplicado o espectro de cor previamente padronizado para cada proteína detectada. A área positiva foi registrada bem como a área total ocupada pelas glândulas.

Todas as áreas de tecido glandular foram minuciosamente observadas com auxílio da ferramenta zoom. Planejar e visualizar mentalmente as áreas selecionadas foi de suma importância, pois não era possível apagar o que foi previamente selecionado e adicionado, a não ser que reiniciasse toda a análise.

Fonte: Produção da própria autora
Figura 15 - Seleção da área glandular em espécime de paciente com SSp

Fonte: Produção da própria autora

Figura 16 - Outras áreas glandulares a serem demarcadas em espécime de paciente com SS

Fonte: Produção da própria autora

Figura 17 - Seleção de todas as áreas de parênquima glandular em espécime de paciente com SS

A soma da área positiva glandular e da área glandular total foram obtidas por meio da seleção do padrão de cor desejado.

Fonte: Produção da própria autora

Figura 18 – Soma da área positiva glandular

Para obter o valor real da área positiva e da área total glandular foram aplicadas duas equações, respectivamente, em que: área positiva glandular real = área positiva da glândula - área positiva ductal, ou seja, **(APGR= APG - APD)** e área total glandular real= área total da glândula - área total ductal, ou seja, **(ATGR= ATG - ATD)**.

Fonte: Produção da própria autora

Figura 19 - Soma da área total glandular

Fonte: Produção da própria autora

Figura 20 – No detalhe, a seleção específica da área glandular

Também foi mensurada a área de tecido de substituição a partir da área total de glândulas e ductos associados, então, foi aplicado o espectro de cor previamente padronizado. A área positiva e total ocupadas pelo tecido de substituição foram registradas.

Fonte: Produção da própria autora

Figura 21 - Seleção da área total do espécime do paciente com SSp

A partir da seleção do padrão de cor desejado foi obtido o valor da área total positiva e área total da biopsia, respectivamente.

Fonte: Produção da própria autora

Figura 22 - Soma da área positiva total do espécime de paciente com SSP

Fonte: Produção da própria autora

Figura 23 - No detalhe, positividade na região de tecido de substituição, especificamente entre adipócitos

Para obter o valor real da área positiva e da área total do tecido de substituição foi necessário aplicar duas equações, respectivamente, em que: [área positiva real do tecido de substituição = área positiva total da biopsia - área positiva glandular, ou seja, **(APRTS= APTB - APTG)**, e, área real do tecido de substituição= área da biopsia - área total glandular, ou seja, **(ARTS= AB - ATG)]**.

Fonte: Produção da própria autora

Figura 24 - Soma da área total de glândula salivar mucosa de paciente com SSg

Os valores provenientes das análises morfométricas foram anotados manualmente e em tabelas informatizadas. Posteriormente, nova fórmula de adição foi aplicada com o objetivo de encontrar os valores exatos de cada caso incluído nesta pesquisa, pois diversas imagens em JPEG foram geradas para viabilizarem as análises quantitativas.

4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os resultados obtidos através das análises das amostras coradas em H&E e submetidas à técnica de imunoistoquímica foram testados estatisticamente. O pacote estatístico foi o IBM SPSS *Statistics*, versão 17.0.

A análise dos dados foi composta por uma análise descritiva, em que as variáveis categóricas foram expressas por suas frequências absolutas e relativas. A distribuição das variáveis quantitativas foi avaliada mediante a

determinação de suas medidas de posição central (média e mediana) e dispersão (desvio padrão e intervalo interquartilico).

Para comparar os dados morfométricos entre os grupos, centro germinativo e severidade do infiltrado inflamatório foram utilizados os *testes t* para as médias e *ANOVA*, quando os dados tinham distribuição normal, ou testes não-paramétricos de *Mann-Whitney* e *Kruskal-Wallis* quando a normalidade dos dados foi rejeitada pelo teste de *Shapiro-Wilk*.

Foi considerado nível de significância de 5% em todos os testes bicaudais.

RESULTADOS

---

5 RESULTADOS

5.1 DESCRITIVO

5.1.1 Dados descritivos categóricos dos grupos caso e controle

As Tabelas 1 e 2 mostram a distribuição das variáveis sociodemográficas, clínicas, sorológicas e histopatológicas.

Resumidamente, no grupo caso, diagnosticado com Síndrome de Sjögren primária, 28 doentes eram do sexo feminino (93,0%) e 27 pacientes eram da raça branca - 25 mulheres e 2 homens (90%) (Tabela 1; Apêndice E). Nesse grupo, 18 doentes foram diagnosticados a partir da 5ª década de vida (60,0%) (Tabela 1).

No grupo controle, que foi pareado segundo a idade com grupo caso, foram incluídas 9 mulheres e 1 homem. Quatro indivíduos eram brancos e 6 indivíduos tinham idades a partir dos 49 anos (60,0%) (Tabela 2).

No grupo caso, o registro dos critérios subjetivos oral e ocular presentes nos prontuários demonstrou que a xerostomia e a xeroftalmia estavam presentes em 28 casos dos casos (93,3%). Quanto aos dados sobre os critérios objetivos, os prontuários registraram hipossalivação em 20 doentes (66,7%) e xeroftalmia em 18 doentes (60,0%) (Tabela 1). Desses, 13 apresentaram ambos os sintomas concomitantemente (Apêndice E). Houve avaliação ESSDAI < 5 em 17 doentes (56,7%); 8 doentes (26,6%) apresentaram índice ESSDAI entre $5 \leq$ e ≤ 13 (Tabela1).

Quanto aos dados provenientes de exames laboratoriais desses pacientes, foi possível observar o registro de positividade dos autoanticorpos, sendo anti-SSA (Ro) positivo em 25 doentes (83,3%) e anti-SSB (La) positivo em 17 doentes (56,7%). O Fator Antinuclear (FAN) foi positivo em 29 doentes (96,7%); 13 doentes (43,3%) apresentavam positividade do Fator Reumatoide

(FR). Foi observado baixo nível sérico de proteínas do sistema complemento – C3 e C4 – em 2 doentes (6,7%). Por fim, nenhum doente foi diagnosticado com linfoma (Tabela 1).

A análise microscópica de todos os espécimes de glândulas salivares do grupo caso apresentaram sialadenite focal linfoplasmocitária e escores focais ≥ 1 em 28 casos (93,3%). Quanto à gravidade das lesões inflamatórias, foi observado diferentes graus de intensidade - leve, moderado e intenso – entre as amostras avaliadas (Figura 25), porém houve um predomínio do infiltrado inflamatório intenso em 22 casos (73,4%), composto por um infiltrado inflamatório denso. Houve presença de centros germinativos em 20 casos (70,0%) (Tabela 1).

Tabela 1 - Caracterização do grupo caso. Dados sociodemográficos, clínicos, sorológicos e histopatológicos – HCFMUSP – 2015 a 2019

Dados sociodemográficos	Sexo autodeclarado	<i>feminino</i>	28 (93,3%)
		<i>masculino</i>	2 (6,7%)
	Raça/cor autodeclarada	<i>branca</i>	27 (90,0%)
		<i>outras</i>	3 (10,0%)
	Idade	<i>até 49 anos</i>	12(40,0%)
		<i>até 59 anos</i>	9(30,0%)
		<i>a partir de 60 anos</i>	9 (30,0%)
Dados clínicos	Critério subjetivo oral	<i>positivo</i>	28 (93,3%)
		<i>negativo</i>	2 (6,7%)
	Critério subjetivo ocular	<i>positivo</i>	28 (93,3%)
		<i>negativo</i>	2 (6,7%)
	Critério objetivo oral	<i>positivo</i>	20 (66,7%)
		<i>negativo</i>	9 (30,0%)
		<i>não informado</i>	1 (3,3%)
	Critério objetivo ocular	<i>positivo</i>	18 (60,0%)
		<i>negativo</i>	8 (26,7%)
		<i>não informado</i>	4 (13,3%)
Dados sorológicos	Anti-SSA-Ro	<i>positivo</i>	25 (83,3%)
		<i>negativo</i>	5 (16,7%)
	Anti-SSB-La	<i>positivo</i>	17 (56,7%)
		<i>negativo</i>	13 (43,3%)
	Fator antinuclear	<i>positivo</i>	29 (96,7%)
		<i>negativo</i>	1 (3,3%)
	Fator reumatoide	<i>positivo</i>	13 (43,3%)
		<i>negativo</i>	17 (56,7%)
	Linfoma	<i>negativo</i>	30 (100%)
		<i>positivo</i>	2 (6,7%)
	Baixa titulação C3	<i>negativo</i>	24 (80%)
		<i>não informado</i>	4 (13,3%)
		<i>positivo</i>	2 (6,7%)
	Baixa titulação C4	<i>negativo</i>	24 (80%)
		<i>não informado</i>	4 (13,3%)
Dados histopatológicos	Sialadenite focal linfoplasmocitária	<i>presente</i>	30 (100%)
	Intensidade do infiltrado inflamatório	<i>leve</i>	4 (13,3%)
		<i>moderado</i>	4 (13,3%)
		<i>intenso</i>	22 (73,4%)
	Escore focal	<i><1</i>	2 (6,7%)
		<i>≥1</i>	28 (93,3%)
	Centro germinativo	<i>presente</i>	20 (70,0%)
		<i>ausente</i>	9 (30,0%)

Fonte: Produção da própria autora

Tabela 2 – Caracterização do grupo controle. Dados sociodemográficos – HCFMUSP – 2015 a 2019

Dados sociodemográficos	Sexo	<i>feminino</i>	9 (90,0%)
		<i>masculino</i>	1 (10,0%)
	Raça/cor	<i>branca</i>	4 (40,0%)
		<i>outras</i>	6 (60,0%)
	Idade	<i>até 49 anos</i>	4(40,0%)
		<i>até 59 anos</i>	3(30,0%)
		<i>a partir de 60 anos</i>	3 (30,0%)

Fonte: Produção da própria autora

Fonte: Produção da própria autora

Figura 25 - Exemplos fotomicrográficos dos graus de intensidade do infiltrado inflamatório

A e B: Glândula salivar mucosa labial normal - parênquima glandular composto por lóbulos acinares mucosos, sem infiltrado inflamatório (escore focal <1; grupo controle). (H&E, aumento original 50 vezes e 200 vezes, respectivamente).

C e D: Glândula salivar mucosa labial biopsiada de um doente diagnosticado com SSp – em **C**, lóbulos acinares mucosos permeados por infiltrado inflamatório leve e áreas focais de substituição adiposa; em **D**, notam-se regiões com fibrose do parênquima glandular e foco inflamatório associado a destruição do epitélio ductal (seta verde). (escore focal ≥ 1 ; grupo caso) (H&E, aumento original 50 vezes e 200 vezes, respectivamente).

E e F: Glândula salivar mucosa labial biopsiada de um doente diagnosticado com Síndrome de Sjögren – em **E**, observa-se um infiltrado inflamatório de células linfoplasmocitárias moderado, áreas de substituição adiposa do parênquima glandular e metaplasia serosa de alguns lóbulos acinares; em **F**, o detalhe mostra foco confluyente de infiltração linfocitária com intensa destruição ductal (seta verde). (escore focal ≥ 1 ; grupo caso) (H&E, aumento original 50 vezes e 200 vezes, respectivamente).

G e H: Glândula salivar mucosa labial biopsiada de um doente diagnosticado com SSp – em **G**, nota-se grande parte dos lóbulos glandulares substituídos por infiltrado inflamatório intenso, em focos confluentes, áreas de substituição adiposa e fibrose; em **H**, nota-se, em detalhe, a formação de centros germinativos, que são compostos por agregados linfoplasmocitários densos, dano intenso do parênquima glandular com presença de ilhas epiteliais (seta verde) e ductos excretórios interlobulares com lúmen dilatado. (escore focal ≥ 1 ; grupo caso) (H&E, aumento original 50 vezes e 200 vezes, respectivamente).

5.1.2 Dados descritivos contínuos. Comparação dos dados morfométricos entre grupo caso e grupo controle

As Tabelas 3 e 4 mostram a comparação dos dados morfométricos entre os dois grupos estudados (caso e controle). Para cada proteína a análise estatística foi categorizada conforme a estrutura morfológica glandular encontrada nos pacientes com SSp em: região de ducto, glândula e de tecido de substituição.

O grupo caso (SSp) apresentou, na região ductal, maior densidade de células positivas para as proteínas CD1a ($p=0,002$), CD3 ($p=0,016$), CD4 ($p<0,001$), CD8 ($p<0,001$) e CD20 ($p<0,001$) quando comparado ao grupo controle (Tabelas 3 e 4; Figura 26; Figuras 27E e 27H, 29E e 29H, 29M e 29P, 30E e 30H, 30M e 30P). Quanto ao tecido glandular, o grupo caso apresentou maior imunexpressão das proteínas CD1a ($p=0,025$), CD4 ($p<0,001$), CD8 ($p<0,001$) e CD20 ($p<0,001$) do que o grupo controle (Tabela 3 e 4; Figura 26; Figuras 27F e 27H, 29N e 29P, 30F e 30H, 30N e 30P). E, finalmente, houve maior densidade de células monucleares imunomarcadas com os anticorpos CD4 ($p<0,001$), CD8 ($p=0,049$) e CD20 ($p=0,001$) nas regiões preenchidas pelo tecido de substituição (tecido fibroso e adiposo) (Tabelas 3 e 4; Figura 26; Figuras 29O e 29P, 30G e 30H, 30O e 30P).

As demais variáveis analisadas não apresentaram diferença significativa entre os grupos, mas foram ilustradas na Figura 27 (Langerina), na Figura 28 (CD21 e CD123) e na Figura 31 (CD68 e BCL6).

Tabela 3 - Dados descritivos contínuos. Comparação dos dados morfométricos entre os grupos caso e controle. Análise das proteínas CD1a, Langerina, CD21, CD123, CD68, CD3 e CD8 – HCFMUSP – 2015 a 2019

Variáveis	Grupos	Análise descritiva da morfometria				p-valor
		Mediana	Dist. Interq.	Média	Desvio-padrão	
Idade	Caso	53,00	18	51,10	13,22	0,775*
	Controle	53,50	24	52,50	13,75	
CD1a (D)	Caso	1101,56	2667,49	1561,73	1651,66	0,002**
	Controle	36,20	51,65	53,45	49,87	
CD1a (G)	Caso	360,93	621,36	443,00	452,86	0,025**
	Controle	76,93	79,32	88,19	49,35	
CD1a(TCS)	Caso	73,17	81,86	88,08	57,04	0,227*
	Controle	56,31	68,34	63,63	45,30	
Langerina (D)	Caso	174,13	387,49	347,44	458,57	0,365**
	Controle	95,20	175,10	140,05	102,36	
Langerina (G)	Caso	34,86	68,27	67,54	85,17	0,685**
	Controle	46,05	18,78	46,51	21,56	
Langerina(TCS)	Caso	13,45	26,64	223,28	1119,08	0,065**
	Controle	26,32	30,66	29,41	15,78	
CD21 (D)	Caso	45,09	244,29	459,46	885,68	0,159**
	Controle	22,31	26,66	27,79	26,19	
CD21 (G)	Caso	57,37	143,36	225,00	659,52	0,200**
	Controle	32,72	24,64	46,52	57,65	
CD21 (TCS)	Caso	31,61	63,30	35,04	31,93	0,779**
	Controle	30,55	27,96	35,44	21,75	
CD123 (D)	Caso	28,64	58,10	63,07	129,52	0,595**
	Controle	16,24	12,24	22,64	27,76	
CD123 (G)	Caso	38,24	80,13	75,60	111,65	0,435**
	Controle	21,91	14,35	23,27	9,33	
CD123(TCS)	Caso	9,74	31,48	25,45	34,15	0,662**
	Controle	9,29	22,59	15,80	14,82	
CD68 (D)	Caso	1524,89	1970,28	1989,75	1611,27	0,595**
	Controle	1099,24	1838,51	1758,89	1625,02	
CD68 (G)	Caso	1873,78	3344,12	3107,60	3271,43	0,662**
	Controle	1671,39	1249,93	1825,02	917,77	
CD68(TCS)	Caso	729,53	1020,37	1434,98	2634,43	0,065**
	Controle	537,68	326,10	585,49	246,40	
CD3 (D)	Caso	784,57	1066,54	1206,70	1344,64	0,016**
	Controle	328,68	380,73	355,24	318,96	
CD3 (G)	Caso	273,38	409,75	530,33	773,50	0,075**
	Controle	185,60	191,11	181,32	130,98	
CD3 (TCS)	Caso	64,90	138,26	223,94	436,92	0,851**
	Controle	90,45	115,23	141,14	176,30	
CD8 (D)	Caso	1905,50	3530,99	2852,02	2091,41	0,000**
	Controle	485,04	447,63	774,49	718,03	
CD8 (G)	Caso	896,02	1308,55	1474,10	1517,74	0,000**
	Controle	290,48	250,75	439,16	458,02	
CD8(TCS)	Caso	221,47	497,07	384,65	340,93	0,049**
	Controle	134,43	125,38	186,19	251,69	

Fonte: Produção da própria autora

Nota: **Dist. Interq.:** Distância Interquartilica; **D:** Área ductal; **G:** Área glandular; **TCS:** Área de tecido de Substituição

* *Teste t* para médias

** *Teste de Mann-Whitney*

Tabela 4 - Dados descritivos contínuos. Comparação dos dados morfométricos entre os grupos caso e controle. Análise das proteínas CD4, CD20, BCL6 – HCFMUSP – 2015 a 2019

Variáveis	Grupos	Análise descritiva da morfometria				p-valor
		Mediana	Dist. Interq.	Média	Desvio-padrão	
CD4 (D)	Caso	13356,91	12625,38	13741,53	9108,85	0,000*
	Controle	3065,44	3479,37	33026,03	2325,94	
CD4 (G)	Caso	5293,03	6459,19	6471,03	7917,41	0,000**
	Controle	852,47	1818,79	1138,06	1009,64	
CD4(TCS)	Caso	1535,80	2688,79	2169,35	1687,16	0,000**
	Controle	296,16	683,77	429,38	428,45	
CD20 (D)	Caso	2489,50	4931,78	3846,80	5107,84	0,000**
	Controle	24,69	56,82	59,01	79,86	
CD20 (G)	Caso	894,05	1777,18	1754,53	2369,14	0,000**
	Controle	119,50	139,98	121,07	88,46	
CD20(TCS)	Caso	127,70	149,20	181,25	197,27	0,001**
	Controle	27,45	45,93	40,41	39,71	
BCL6 (D)	Caso	23,28	37,88	40,29	38,13	0,617**
	Controle	20,74	73,88	42,04	44,70	
BCL6 (G)	Caso	28,97	27,30	44,50	55,84	0,553**
	Controle	31,33	79,47	60,25	59,95	
BCL6(TCS)	Caso	17,89	18,11	29,03	48,22	0,473**
	Controle	18,78	35,56	28,52	24,18	

Fonte: Produção da própria autora

Nota: **Dist. Interq.:** Distância Interquartílica; **D:** Área ductal; **G:** Área glandular; **TCS:** Área de tecido de Substituição

* *Teste t* para medias

** *Teste de Mann-Whitney*

Abaixo, foram representados os gráficos *boxplot* dos dados morfométricos que apresentaram significância (Figura 26).

Fonte: Produção da própria autora

Figura 26 - Representações gráficas dos dados morfométricos significantes da comparação entre os grupos caso e controle. As representações acima demonstraram que o grupo caso apresentou significância para as proteínas CD1A (D), (G), CD3 (D), CD8 (D), (G), (TCS), CD4 (D), (G), (TCS), CD20 (D), (G), (TCS) quando comparadas ao grupo controle

Fonte: Produção da própria autora

Figura 27 - Fotomicrografias das proteínas CD1a e Langerina

A a H: Resultados da imunoistoquímica para o marcador CD1A

A, B, C e D: Glândulas salivares mucosas labiais – em **A, B e C**, células CD1a positivas compondo o infiltrado inflamatório leve, moderado e intenso, respectivamente. Em **D**, glândula salivar mucosa de paciente pertencente ao grupo controle, com ausência de células CD1a positivas. (escore focal ≥ 1 ; grupo caso/ escore focal não se aplica; grupo controle) (**A, B, C e D:** magnificação de 200 vezes).

E, F, G e H: Glândulas salivares mucosas labiais – **E, F e G**, fotomicrografias da região ductal, glandular e de tecido de substituição, respectivamente. Em **E e F**, glândulas salivares mucosas de pacientes com SSp com células CD1a positivas sobre o epitélio ductal (**E**: seta preta) e próximas aos ácinos mucosos (**F**: seta verde). Em **G**, glândula salivar mucosa de paciente com SSp e ausência de células CD1a positivas no tecido de substituição. Em **H**, glândula salivar mucosa de paciente pertencente ao grupo controle e ausência de células CD1a positivas. (escore focal ≥ 1 ; grupo caso/ escore focal não se aplica; grupo controle) (**E, F, G e H:** magnificação de 400 vezes).

I a P: Resultados da imunoistoquímica para o marcador Langerina

I, J, K, L: Glândulas salivares mucosas labiais – em **I, J e K**, células de Langerhans positivas compondo o infiltrado inflamatório leve, moderado e intenso, respectivamente. Em **I**, glândula salivar mucosa de paciente com SSp com delgada célula de Langerhans positiva em ácino mucoso (seta preta). Em **L**, glândula salivar mucosa de paciente pertencente ao grupo controle e ausência de células de Langerhans positivas. (escore focal ≥ 1 ; grupo caso/ escore focal não se aplica; grupo controle) (**I, J, K, L:** magnificação de 200 vezes).

M, N, O e P: Glândulas salivares mucosas labiais– **M, N e O**, fotomicrografias das regiões ductal, glandular e de tecido de substituição, respectivamente. Em **M**, glândula salivar mucosa de paciente com SSp e com células de Langerhans positivas dispersas em meio ao infiltrado inflamatório moderado. No detalhe, observa-se a presença de uma célula de Langerhans com formato estrelado sobre o ducto da glândula salivar mucosa (**M**: seta preta). Em **N**, glândula salivar mucosa de paciente com SSp com célula de Langerhans positiva sobre o ácino mucoso (**N**: seta verde). Em **O**, ausência de células de Langerhans positivas na região de tecido de substituição de glândula salivar mucosa de paciente com SSp. Em **P**, glândula salivar mucosa de paciente pertencente ao grupo controle com ausência de células de Langerhans positivas. (escore focal ≥ 1 ; grupo caso/ escore focal não se aplica; grupo controle) (**M, N, O e P:** magnificação de 400 vezes).

Fonte: Produção da própria autora

Figura 28 - Fotomicrografias das proteínas CD21 e CD123

A a H: Resultados da imunoistoquímica para o marcador CD21

A, B, C e D: Glândulas salivares mucosas labiais – em **A, B e C**, células CD21 positivas compondo o infiltrado inflamatório leve, moderado e intenso, respectivamente. Em **D**, glândula salivar mucosa de paciente pertencente ao grupo controle, com ausência de células CD21 positivas. (escore focal ≥ 1 ; grupo caso/ escore focal não se aplica; grupo controle) (**A, B, C e D:** magnificação de 100 vezes).

E, F, G e H: Glândulas salivares mucosas labiais – **E, F e G**, fotomicrografias da região ductal, glandular e de tecido de substituição, respectivamente. Em **E e F**, glândulas salivares mucosas de pacientes com SSp com células CD21 positivas agrupadas ao redor de ductos e acino, respectivamente. Em **G**, glândula salivar mucosa de paciente com SSp e célula CD21 positiva na região periadiposa (seta preta). Em **H**, glândula salivar mucosa de paciente pertencente ao grupo controle e ausência de células CD21 positivas. (escore focal ≥ 1 ; grupo caso/ escore focal não se aplica; grupo controle). (**E:** magnificação de 200 vezes; **F, G e H:** magnificação de 400 vezes).

I a P: Resultados da imunoistoquímica para o marcador CD123

I, J, K e L: Glândulas salivares mucosas labiais – em **I, J e K**, células CD123 positivas compondo o infiltrado inflamatório leve, moderado e intenso, respectivamente. Nota-se em **K**, células CD123 positivas na periferia do centro germinativo e próximas ao parênquima glandular (seta preta). Em **L**, glândula salivar mucosa de paciente pertencente ao grupo controle, com ausência de células CD123 positivas. (escore focal ≥ 1 ; grupo caso/ escore focal não se aplica; grupo controle) (**I e J:** magnificação de 400 vezes; **K e L:** magnificação de 200 vezes).

M, N, O e P: Glândulas salivares mucosas labiais – **M, N e O**, fotomicrografias da região ductal, glandular e de tecido de substituição, respectivamente. Em **M**, glândula salivar mucosa de paciente com SSp contendo células CD123 positivas no interior do infiltrado inflamatório periductal. Em **N**, glândula salivar mucosa de paciente com SSp e, no detalhe, célula CD123 positiva próxima aos ácinos mucosos (seta verde). Em **O**, glândula salivar mucosa de paciente com SSp e célula CD123 positiva na periferia do adipócito (seta preta). Em **P**, glândula salivar mucosa de paciente pertencente ao grupo controle, com ausência de células CD123 positivas. (escore focal ≥ 1 ; grupo caso/ escore focal não se aplica; grupo controle) (**M:** magnificação de 200 vezes; **N, O e P:** magnificação de 400 vezes).

Fonte: Produção da própria autora

Figura 29 - Fotomicrografias das proteínas CD3 e CD4

A a H: Resultados da imunoistoquímica para o marcador CD3

A, B, C e D: Glândulas salivares mucosas – em **A, B e C**, linfócitos T CD3 positivos compondo o infiltrado inflamatório leve, moderado e intenso, respectivamente. Em **D**, glândula salivar mucosa de paciente pertencente ao grupo controle, com linfócitos esparsos ao redor do ducto (seta preta). (escore focal ≥ 1 ; grupo caso/ escore focal não se aplica; grupo controle) (**A, B e C**: magnificação de 100 vezes; **D**: magnificação de 200 vezes).

E, F, G e H: Glândulas salivares mucosas labiais – **E, F e G**, fotomicrografias da região ductal, glandular e de tecido de substituição, respectivamente. Em **E**, glândula salivar mucosa de paciente com SSp, linfócitos T CD3 positivos na região periductal (seta preta) e na periferia do centro germinativo (seta verde). Em **F e G**, glândulas salivares mucosas de pacientes com SSp e linfócitos T CD3 positivos na região intraglandular e periadiposa (**G**: seta preta). Note a presença de linfócitos de permeio ao epitélio ductal em **F e G**. Em **H**, glândula salivar mucosa de paciente do grupo controle com linfócitos esparsos CD3 positivos ao redor do ducto. (escore focal ≥ 1 ; grupo caso/ escore focal não se aplica; grupo controle) (**E**: magnificação de 100 vezes; **F e G**: magnificação de 400 vezes; **H**: magnificação de 200 vezes).

I a P: Resultados da imunoistoquímica para o marcador CD4

I, J, K e L: Glândulas salivares mucosas – em **I, J e K**, linfócitos T CD4 positivos no infiltrado inflamatório leve, moderado e intenso, respectivamente. Em **I**, infiltrado inflamatório leve com linfócito T CD4 positivo na região periductal (seta preta). Em **J**, infiltrado inflamatório moderado composto por linfócitos T CD4 positivos ao redor de ductos. Em **K**, denso infiltrado inflamatório, ao redor de ductos e ácinos, com linfócitos T CD4 positivos compondo centro germinativo. Em **L**, glândula salivar mucosa de paciente pertencente ao grupo controle com linfócitos CD4 positivos ao redor de ducto excretor intralobular. (escore focal ≥ 1 ; grupo caso/ escore focal não se aplica; grupo controle) (**I, J, K e L**: magnificação de 100 vezes).

M, N, O e P: Glândulas salivares mucosas labiais – em **M, N e O**, fotomicrografias da região ductal, glandular e de tecido de substituição, respectivamente. Em **M** nota-se, em glândula salivar mucosa de paciente com SSp, a presença de intenso infiltrado inflamatório composto por linfócitos T CD4 positivos nas regiões periductais, compondo o centro germinativo. Observa-se em **N**, no detalhe, glândula salivar mucosa de paciente com SSp com um intenso infiltrado inflamatório de células CD4 positivas entre os ácinos mucosos (seta preta). Em **O**, linfócitos T CD4 positivos na região de tecido de substituição (seta preta). Em **P**, glândula salivar mucosa de paciente pertencente ao grupo controle com linfócitos CD4 positivos ao redor de ductos. (escore focal ≥ 1 ; grupo caso/ escore focal não se aplica; grupo controle) (**M, N, O e P**: magnificação de 200 vezes).

Fonte: Produção da própria autora

Figura 30 - Fotomicrografias das proteínas CD8 e CD20

A a H: Resultados da imunoistoquímica para o marcador CD8

A, B, C e D: Glândulas salivares mucosas labiais – em **A, B e C**, linfócitos T CD8 positivos compondo o infiltrado inflamatório leve, moderado e intenso, respectivamente. Em **C**, observa-se glândula salivar mucosa de paciente com SSp e linfócitos, ao redor de ductos, compondo o infiltrado inflamatório do centro germinativo (seta preta). Em **D**, glândula salivar mucosa de paciente pertencente ao grupo controle, com linfócitos esparsos ao redor de ductos (seta preta). (escore focal ≥ 1 ; grupo caso/ escore focal não se aplica; grupo controle) (**A, B e C**: magnificação de 100 vezes; **D**: magnificação de 200 vezes).

E, F, G e H: Glândulas salivares mucosas labiais – **E, F e G**, fotomicrografias da região ductal, glandular e de tecido de substituição, respectivamente. Em **E, F e G**, glândulas salivares mucosas de paciente com SSp, linfócitos T em região periductal (**E**: seta verde), periacinar (**F**: seta verde) e periadiposa (**G**: seta verde). Em **H**, glândula salivar mucosa de paciente pertencente ao grupo controle, com linfócitos esparsos CD8 positivos ao redor de ductos e raros linfócitos ao redor dos adipócitos. (escore focal ≥ 1 ; grupo caso/ escore focal não se aplica; grupo controle) (**E, G e H**: magnificação de 200 vezes; **F**: magnificação de 400 vezes).

I a P: Resultados da imunoistoquímica para o marcador CD20

I, J, K e L: Glândulas salivares mucosas labiais – em **I, J e K**, linfócitos B CD20 positivos compondo o infiltrado inflamatório leve, moderado e intenso, respectivamente. Em **K**, observa-se glândula salivar mucosa de paciente com SSp com intenso infiltrado inflamatório confluyente, ao redor de ductos, composto por linfócitos B em centro germinativo (setas pretas). Em **L**, glândula salivar mucosa de paciente pertencente ao grupo controle, com poucos linfócitos B no parênquima glandular. (escore focal ≥ 1 ; grupo caso/ escore focal não se aplica; grupo controle) (**I e L**: magnificação de 200 vezes; **J e K**: magnificação de 100 vezes).

M, N, O e P: Glândulas salivares mucosas labiais – **M, N e O**, fotomicrografias da região ductal, glandular e de tecido de substituição, respectivamente. Em **M**, glândula salivar mucosa de paciente com SSp com intenso infiltrado inflamatório composto por linfócitos B em regiões periductais. No detalhe, intensa reação fibrótica periductal (seta verde). Em **N e O**, glândulas salivares mucosas de pacientes com SSp com intenso infiltrado inflamatório de linfócitos CD20 positivos ao redor do ácino mucoso e em região de tecido de substituição (seta preta), respectivamente. Em **P**, glândula salivar mucosa de paciente pertencente ao grupo controle e ausência de linfócitos B CD20 positivos na região ductal, no parênquima glandular e no tecido de substituição. (escore focal ≥ 1 ; grupo caso/ escore focal não se aplica; grupo controle) (**M e O**: magnificação de 200 vezes; **N**: magnificação de 400 vezes; **P**: magnificação de 100 vezes).

Fonte: Produção da própria autora

Figura 31 - Fotomicrografias das proteínas CD68 e BCL6

A a H: Resultados da imunoistoquímica para o marcador CD68

A, B, C e D: Glândulas salivares mucosas labiais – em **A, B e C**, glândulas salivares mucosas de pacientes com SSp e com macrófagos compondo o infiltrado inflamatório leve, moderado e intenso, respectivamente. Em **D**, glândula salivar mucosa de paciente pertencente ao grupo controle, com importante infiltração de células CD68 positivas. (escore focal ≥ 1 ; grupo caso/ escore focal não se aplica; grupo controle) (**A**: magnificação de 200 vezes; **B, C e D**: magnificação de 100 vezes).

E, F, G e H: Glândulas salivares mucosas labiais – **E, F e G**, fotomicrografias da região ductal, glandular e de tecido de substituição, respectivamente. Em **E, F e G**, glândulas salivares mucosas de paciente com SSp e macrófagos ao redor de ductos (**E**: seta preta), de ácinos (**F**: seta preta) e de adipócitos (**G**: seta preta). Em **H**, glândula salivar mucosa de paciente pertencente ao grupo controle, com importante infiltração de macrófagos no parênquima glandular. (escore focal ≥ 1 ; grupo caso/ escore focal não se aplica; grupo controle) (**E**: magnificação de 100 vezes; **F e G**: magnificação de 400 vezes; **H**: magnificação de 200 vezes).

I a P: Resultados da imunoistoquímica para o marcador BCL6

I, J, K e L: Glândulas salivares mucosas labiais – em **I, J e K**, linfócitos B BCL6 positivos caracterizando os centros germinativos em infiltrados inflamatórios leve, moderado e intenso, respectivamente. Em **I**, glândula salivar mucosa de paciente com SSp e célula BCL6 positiva próxima ao ácino mucoso (seta preta). Em **J**, glândula salivar mucosa de paciente com SSp e células BCL6 positivas no infiltrado inflamatório (setas pretas). Em **K**, glândula salivar mucosa de paciente com SSp e linfócitos B BCL6 positivos localizados no interior do centro germinativo. Em **L**, glândula salivar mucosa de paciente pertencente ao grupo controle e ausência de células BCL6 positivas. (escore focal ≥ 1 ; grupo caso/ escore focal não se aplica; grupo controle) (**I e J**: magnificação de 400 vezes; **K e L**: magnificação de 200 vezes).

M, N, O e P: Glândulas salivares mucosas labiais – **M, N e O**, fotomicrografias da região ductal, glandular e de tecido de substituição, respectivamente. Em **M**, glândula salivar mucosa de paciente com SSp e intenso infiltrado inflamatório de linfócitos B BCL6 positivos ao redor de ductos. Em **N**, glândulas salivares mucosas de paciente com SSp com leve infiltrado inflamatório de linfócitos BCL6 positivos ao redor de ácinos mucosos (seta preta). Em **O**, glândulas salivares mucosas de paciente com SSp e linfócitos B BCL6 positivos em infiltrado inflamatório denso (seta preta). Em **P**, glândula salivar mucosa de paciente pertencente ao grupo controle e ausência de linfócitos BCL6 positivos. (escore focal ≥ 1 ; grupo caso/ escore focal não se aplica; grupo controle) (**M, N, O e P**: magnificação de 400 vezes).

5.1.3 Comparação dos dados morfométricos com a intensidade do infiltrado inflamatório – análise somente do grupo caso

A comparação entre os achados morfométricos e a gravidade da inflamação está representada nas Tabelas 5 e 6. O grau de intensidade do infiltrado inflamatório foi categorizado em: leve, moderado e intenso.

Os casos classificados com infiltrado inflamatório moderado e intenso apresentaram maior densidade de células CD123 positivas na região glandular quando comparados com casos classificados com infiltrado inflamatório leve. (Tabela 5; Figura 32; Figuras 28I, 28J e 28K). Fato semelhante ocorreu com a proteína CD4, em que os casos classificados com infiltrado inflamatório moderado e intenso apresentaram maior densidade de células CD4 positivas na região ductal quando comparados com os casos classificados com inflamação leve (Tabela 6; Figura 32; Figuras 29I, 29J e 29K).

Por outro lado, os casos classificados com infiltrado inflamatório intenso apresentaram maior densidade de células CD4 positivas na região de parênquima glandular quando comparados com casos classificados com grau leve de inflamação (Tabela 6; Figura 32; Figuras 29K, 29N e 29I). Esse mesmo evento pode ser observado com a proteína CD20, em que as amostras classificadas com infiltrado inflamatório intenso possuíam maior densidade de células CD20 positivas na região ductal do que as amostras classificadas como infiltrado inflamatório leve (Tabela 6; Figura 32; Figuras 30K, 30M e 30I).

As demais variáveis analisadas não apresentaram diferença significativa na comparação com a intensidade da inflamação, mas foram ilustradas nas Figuras 27A-27C (CD1a); Figuras 27I-27K (Langerina); Figuras 28A-28C (CD21); Figuras 29A-29C (CD3); Figuras 30A-30C (CD8); Figuras 31A-31C (CD68); Figuras 31I-31K (BCL6).

Tabela 5 - Comparação dos dados morfométricos com a intensidade do infiltrado inflamatório (grupo caso) e estatísticas descritivas das análises morfométricas. Análise das proteínas CD1a, Langerina, CD21, CD123, CD68, CD3 e CD8 – HCFMUSP – 2015 a 2019

Variáveis	Intensidade do infiltrado	Análise descritiva da morfometria				p-valor
		Mediana	Dist. Interq.	Média	Desvio-padrão	
CD1a (D)	Leve	1460,14	1516,18	1204,49	842,83	0,228
	Moderada	3569,04	4931,55	3225,67	2635,50	
	Intensa	728,99	2680,69	1324,14	1436,19	
CD1a (G)	Leve	354,44	419,47	330,34	218,47	0,431
	Moderada	647,45	1286,01	749,63	677,73	
	Intensa	326,05	624,63	407,73	434,91	
CD1a (TCS)	Leve	88,57	148,84	100,21	78,90	0,700
	Moderada	99,03	136,66	113,81	72,62	
	Intensa	72,72	72,90	81,19	51,45	
Langerina (D)	Leve	45,56	164,37	78,56	96,81	0,092
	Moderada	380,73	328,48	382,67	173,93	
	Intensa	164,96	414,53	389,92	518,50	
Langerina (G)	Leve	36,39	75,23	43,18	40,03	0,421
	Moderada	65,93	48,99	65,53	25,54	
	Intensa	30,24	73,64	72,34	97,77	
Langerina (TCS)	Leve	4,58	11,15	7,80	7,05	0,164
	Moderada	34,05	42,47	33,56	22,15	
	Intensa	13,45	26,82	296,95	1306,89	
CD21 (D)	Leve	40,87	51,25	48,21	28,54	0,372
	Moderada	514,63	1069,20	567,19	579,53	
	Intensa	40,56	249,11	514,65	998,77	
CD21 (G)	Leve	79,49	67,54	84,47	35,35	0,558
	Moderada	131,78	149,99	121,05	79,57	
	Intensa	50,31	156,33	269,45	769,22	
CD21 (TCS)	Leve	45,72	45,45	50,67	25,16	0,266
	Moderada	50,13	54,34	44,11	29,26	
	Intensa	19,85	61,89	30,56	33,34	
CD123 (D)	Leve	17,99	177,49	65,41	108,00	0,838
	Moderada	37,87	37,45	33,12	20,34	
	Intensa	21,80	60,69	68,09	145,74	
CD123 (G)	Leve	5,59 _A	3,19	5,47	1,65	0,015**
	Moderada	123,07 _B	271,13	151,13	143,87	
	Intensa	39,69 _B	77,93	74,62	110,60	
CD123 (TCS)	Leve	7,60	24,65	14,82	15,61	0,930
	Moderada	9,74	63,31	27,55	39,87	
	Intensa	10,93	34,03	27,00	36,38	
CD68 (D)	Leve	2467,72	2024,76	2092,62	1158,60	0,383
	Moderada	565,71	3324,53	1408,73	1994,76	
	Intensa	1524,89	1913,55	2076,68	1658,55	
CD68 (G)	Leve	1421,46	985,13	1443,55	510,37	0,555
	Moderada	3615,04	8011,50	4498,60	4329,34	
	Intensa	1873,78	3880,92	3157,24	3341,55	
CD68 (TCS)	Leve	644,54	298,36	662,96	158,57	0,724
	Moderada	1150,80	11275,44	4373,64	7095,39	
	Intensa	696,94	1072,41	1041,05	683,71	

Fonte: Produção da própria autora

Nota: **D:** Região ductal; **G:** Região glandular; **TCS:** Região de tecido de Substituição

** Teste de *Kruskal-Wallis*, letras diferentes denotam diferenças significativas pelo teste *post hoc*

Tabela 6 - Comparação dos dados morfométricos com a intensidade do infiltrado inflamatório (grupo caso) e estatísticas descritivas das análises morfométricas. Análise das proteínas CD3, CD8, CD4, CD20 e BCL6 – HCFMUSP – 2015 a 2019

Variáveis	Intensidade do infiltrado	Análise descritiva da morfometria				p-valor
		Mediana	Dist. Interq.	Média	Desvio-padrão	
CD3 (D)	Leve	509,73	884,61	671,78	493,71	0,765
	Moderada	936,38	1296,84	901,26	696,63	
	Intensa	784,57	1183,30	1359,49	1515,24	
CD3 (G)	Leve	369,11	258,25	331,28	144,61	0,884
	Moderada	338,42	795,66	429,41	431,77	
	Intensa	253,16	660,33	584,87	885,44	
CD3 (TCS)	Leve	76,14	84,06	87,42	45,60	0,933
	Moderada	96,88	242,80	126,21	129,93	
	Intensa	61,88	171,52	266,53	503,63	
CD8 (D)	Leve	1099,42	305,04	1107,91	164,26	0,102
	Moderada	2502,49	3289,17	2609,04	1703,22	
	Intensa	2295,19	3779,48	3213,31	2212,38	
CD8 (G)	Leve	535,52	464,95	646,62	275,16	0,401
	Moderada	1242,70	1393,97	1288,44	740,42	
	Intensa	952,23	1753,41	1658,31	1708,63	
CD8 (TCS)	Leve	181,73	132,00	161,29	72,70	0,311
	Moderada	397,13	597,27	467,52	322,88	
	Intensa	325,14	582,41	410,19	365,19	
CD4 (D)	Leve	3622,37 _A	4725,54	3763,08	2656,66	0,027**
	Moderada	12116,9 _B	24579,28	15374,55	13239,43	
	Intensa	14112,3 _B	11937,23	15258,88	8163,64	
CD4 (G)	Leve	1338,27 _A	1247,89	1274,69	652,34	0,029**
	Moderada	4003,53 _{A,B}	8752,90	5361,29	4788,68	
	Intensa	5726,33 _B	5220,94	7617,59	8744,93	
CD4 (TCS)	Leve	653,05	883,87	620,66	463,10	0,062
	Moderada	2529,84	4547,49	2895,51	2417,80	
	Intensa	2314,74	2558,72	2318,90	1576,22	
CD20 (D)	Leve	202,17 _A	567,58	312,73	322,56	0,021**
	Moderada	1697,03 _{A,B}	8909,63	3756,02	5208,29	
	Intensa	2699,43 _B	5005,35	4505,87	5413,26	
CD20 (G)	Leve	1647,41	2919,22	1671,08	1581,90	0,970
	Moderada	912,36	2728,04	1404,53	1531,73	
	Intensa	894,05	1612,59	1833,34	2650,90	
CD20 (TCS)	Leve	99,30	242,73	140,24	134,18	0,858
	Moderada	128,32	215,97	137,50	119,65	
	Intensa	127,70	136,54	196,66	219,52	
BCL6 (D)	Leve	26,88	38,06	29,41	9,87	0,659
	Moderada	20,02	41,97	26,28	22,86	
	Intensa	23,28	42,84	44,82	42,37	
BCL6 (G)	Leve	22,91	220,60	91,45	43,16	0,987
	Moderada	33,63	66,57	42,42	35,94	
	Intensa	31,17	27,30	36,34	26,52	
BCL6 (TCS)	Leve	29,03	201,40	85,27	25,24	0,299
	Moderada	25,08	41,32	27,77	21,93	
	Intensa	16,68	15,48	19,04	13,95	

Fonte: Produção da própria autora

Nota: **D:** Região ductal; **G:** Região glandular; **TCS:** Região de tecido de Substituição

** Teste de *Kruskal-Wallis*, letras diferentes denotam diferenças significativas pelo teste *post hoc*

A comparação dos dados morfométricos com a intensidade do infiltrado inflamatório que apresentaram significância foram ilustradas abaixo (Figura 32):

Fonte: Produção da própria autora

Figura 32 - Representações gráficas entre os dados morfométricos significantes e a intensidade do infiltrado inflamatório. Os gráficos boxplot demonstram as proteínas que apresentaram significância para os graus de inflamação moderado e intenso quando comparados ao grau leve - CD123 (G) e CD4 (D)

5.1.4 Comparação dos dados morfométricos com o centro germinativo – análise somente do grupo caso

Nas Tabelas 7 e 8 estão representados os resultados da comparação entre os achados morfométricos e GC's, este categorizado em: presente ou ausente.

Na região ductal, as proteínas CD4 positivas ($p=0,022$), CD8 positivas ($p=0,032$) e CD20 positivas ($p=0,018$) estavam associadas à presença do centro germinativo (Tabelas 7 e 8, Figura 33, Figuras 29M, 30C, 30K), enquanto que, na região glandular, essa associação ocorreu com as proteínas CD123 positivas ($p=0,028$) e CD4 positivas ($p=0,008$) (Tabelas 7 e 8, Figura 33, Figuras 28K e 29K). E, no tecido de substituição, com as proteínas CD4 positivas ($p=0,032$) (Tabela 8, Figura 33, Figura 29O).

Tabela 7 - Comparação dos dados morfométricos com o centro germinativo (grupo caso) e análise descritiva da morfometria. Análise das proteínas CD1a, CD21, CD123, Langerina, CD68, CD3 e CD8 – HCFMUSP – 2015 a 2019

Variáveis	Centro Germinativo	Análise descritiva da morfometria				p-valor
		Mediana	Dist. Interq.	Média	Desvio-padrão	
CD1a (D)	Ausência	1655,48	2840,96	2141,89	1983,30	0,342**
	Presença	639,45	2761,45	1313,09	1471,66	
CD1a (G)	Ausência	445,09	669,16	569,41	494,25	0,167**
	Presença	302,95	516,48	388,82	435,18	
CD1a (TCS)	Ausência	104,72	111,67	106,99	66,53	0,241*
	Presença	71,52	73,09	79,97	52,13	
CD21 (D)	Ausência	46,63	484,40	274,84	450,93	0,571**
	Presença	42,24	260,26	538,59	1016,94	
CD21 (G)	Ausência	65,67	86,69	91,06	59,29	0,428**
	Presença	48,04	157,99	282,40	785,98	
CD21 (TCS)	Ausência	45,56	35,54	46,68	23,46	0,090**
	Presença	16,86	65,71	30,06	34,22	
CD123 (D)	Ausência	33,97	46,17	43,62	71,24	0,428**
	Presença	23,30	61,06	71,41	148,49	
CD123 (G)	Ausência	7,22	40,88	52,22	112,03	0,028**
	Presença	62,54	77,72	85,62	112,71	
CD123 (TCS)	Ausência	8,49	19,31	19,61	27,43	0,786**
	Presença	10,91	35,74	27,95	36,98	
Langerina (D)	Ausência	149,40	314,89	195,76	204,64	0,268**
	Presença	179,58	474,80	412,45	522,85	
Langerina (G)	Ausência	37,07	55,49	41,51	31,12	0,603**
	Presença	32,65	93,55	78,70	98,47	
Langerina (TCS)	Ausência	8,78	15,86	14,39	13,81	0,541**
	Presença	14,01	33,75	312,81	1337,07	
CD68 (D)	Ausência	1560,52	2184,65	1515,14	1123,31	0,428**
	Presença	1489,26	2840,71	2193,15	1764,92	
CD68 (G)	Ausência	1581,25	1656,28	2558,41	3080,04	0,734**
	Presença	1983,36	4277,40	3342,96	3395,55	
CD68 (TCS)	Ausência	740,11	421,17	2226,50	4790,06	0,512**
	Presença	718,94	1079,45	1095,76	694,77	
CD3 (D)	Ausência	677,49	615,39	653,54	414,89	0,268**
	Presença	813,31	1303,97	1443,77	1534,97	
CD3 (G)	Ausência	273,41	196,56	283,61	141,72	0,874**
	Presença	240,78	759,23	636,07	905,74	
CD3 (TCS)	Ausência	65,18	105,38	89,56	60,78	0,982**
	Presença	64,62	238,10	281,53	513,54	
CD8 (D)	Ausência	1281,79	1132,07	1543,77	792,88	0,032**
	Presença	2968,13	3874,76	3412,70	2233,96	
CD8 (G)	Ausência	772,07	516,20	894,39	511,85	0,402**
	Presença	912,86	1776,97	1722,55	1737,61	
CD8 (TCS)	Ausência	219,39	252,27	312,04	248,57	0,982**
	Presença	309,64	598,50	415,77	374,74	

Fonte: Produção da própria autora

Nota: **D:** Região ductal; **G:** Região glandular; **TCS:** Região de tecido de Substituição

* Teste t para medias

** Teste de Mann-Whitney

Tabela 8 - Comparação dos dados morfométricos com o centro germinativo (grupo caso) e análise descritiva da morfometria. Análise das proteínas CD4, CD20 e BCL6 – HCFMUSP – 2015 a 2019

Variáveis	Centro Germinativo	Análise descritiva da morfometria				p-valor
		Mediana	Dist. Interq.	Média	Desvio-padrão	
CD4 (D)	Ausência	5773,03	10117,90	8804,31	10363,49	0,022**
	Presença	14357,55	11682,44	15857,48	7853,46	
CD4 (G)	Ausência	1506,48	3008,31	3025,54	3698,54	0,008**
	Presença	6113,09	5161,49	7947,67	8819,89	
CD4 (TCS)	Ausência	684,13	2218,62	1494,12	1999,12	0,032**
	Presença	2378,92	2400,64	2458,74	1495,25	
CD20 (D)	Ausência	507,77	1754,68	1921,32	3646,48	0,018**
	Presença	2842,07	5098,11	4672,01	5488,94	
CD20 (G)	Ausência	1229,54	2472,90	1601,92	1288,46	0,541**
	Presença	803,26	1797,30	1819,94	2731,23	
CD20 (TCS)	Ausência	139,08	193,72	155,13	104,72	0,874**
	Presença	116,66	141,77	192,44	227,16	
BCL6 (D)	Ausência	21,84	20,04	23,39	14,71	0,167**
	Presença	33,72	47,12	47,54	42,87	
BCL6 (G)	Ausência	23,41	21,86	54,79	94,76	0,402**
	Presença	32,45	33,41	40,09	29,36	
BCL6 (TCS)	Ausência	21,47	20,25	48,83	84,42	0,268**
	Presença	16,32	15,84	20,55	16,43	

Fonte: Produção da própria autora

Nota: **D:** Região ductal; **G:** Região glandular; **TCS:** Região de tecido de Substituição

* *Teste t* para medias

** Teste de *Mann-Whitney*

A seguir, foram representadas as comparações dos dados morfométricos com a presença e ausência do centro germinativo (grupo caso) que demonstraram significância (Figura 33):

Fonte: Produção da própria autora

Figura 33 - Representações gráficas dos dados morfométricos significantes da comparação entre a presença e a ausência de centro germinativo. Os gráficos acima demonstraram que as proteínas CD8 (D), CD4 (D), CD20 (D), CD123 (G), CD4 (G) e (TCS) apresentaram significância quanto à presença de centros germinativos

5.1.5 Correlação dos dados morfométricos, ESSDAI, tempo de diagnóstico e escore focal

A análise da correlação demonstrou a associação dos dados morfométricos, escore focal e ESSDAI entre si, indicando como eles variaram conjuntamente (Tabelas 9, 10 e 11). Foram encontradas correlações significativas para cada uma das proteínas, que estão descritas abaixo e, detalhadas no Apêndice F.

5.1.5.1 CD1a

Na região ductal foram encontradas correlações *moderadas* para a proteína CD1a (D) com as respectivas variáveis: CD3 (G), (TCS), CD8 (D), Langerina (D), CD21 (G), (TCS) e BCL6 (TCS). Correlações *fortes* com: CD8 (G) e (TCS). E correlação *inversa* com: CD4 (TCS) e CD68 (G) (Tabela 9).

Na região glandular foram encontradas correlações *moderadas* para a proteína CD1a (G) com as respectivas variáveis: CD3 (G), (TCS), CD8 (D), CD21 (G), (TCS) e BCL6 (TCS). Correlações *fortes* com: CD8 (G) e (TCS). E correlação *inversa* com: CD4 (D), (G), (TCS), CD68 (G) e (TCS) (Tabela 9).

Na região de tecido de substituição foram encontradas correlações *moderadas* para a proteína CD1a (TCS) com as respectivas variáveis: CD8 (G), (TCS) e BCL (TCS). E correlação *inversa* com: CD68 (G) e (TCS) (Tabela 9).

5.1.5.2 Langerina

Na região ductal foram encontradas correlações *moderadas* para a Langerina (D) com as respectivas variáveis: CD8 (D), (G) e (TCS), CD20 (D) e CD21 (D) (Tabela 9).

Na região glandular foram encontradas correlações *moderadas* para a Langerina (G) com as respectivas variáveis: CD3 (G), (TCS), CD8 (G), CD20 (G) e CD21 (D), (G) e (TCS) (Tabela 9).

Na região de tecido de substituição foram encontradas correlações *moderadas* para a Langerina (TCS) com as respectivas variáveis: CD3 (TCS), CD8 (D), (G), (TCS) e CD20 (D) (Tabela 9).

5.1.5.3 CD21

Na região ductal foram encontradas correlações *moderadas* para a proteína CD21 (D) com as respectivas variáveis: CD20 (D), (G) e (TCS). E correlação *inversa* com: CD68 (D) (Tabela 9).

Na região glandular foram encontradas correlações *moderadas* para a proteína CD21 (G) com as respectivas variáveis: CD3 (D), (G), (TCS), CD8 (D), (G), (TCS), CD20 (G) e (TCS) (Tabela 9).

Na região de tecido de substituição foi encontrada correlação *moderada* para a proteína CD21 (TCS) com as respectivas variáveis: CD3 (D), (G), (TCS), CD8 (D), (G), CD20 (G) e BCL6 (TCS). Correlação *forte* com: CD8 (TCS). E correlação *inversa* com: CD4 (D), (G) e (TCS) (Tabela 9).

5.1.5.4 CD123

Na região ductal foram encontradas correlações *moderadas* para a proteína CD123 (D) com a respectiva variável: CD4 (D), (G), (TCS) e BCL6 (D) (Tabela 9).

Na região glandular foram encontradas correlações *moderadas* para a proteína CD123 (G) com as respectivas variáveis: BCL6 (D) (Tabela 9).

Na região de tecido de substituição foram encontradas correlações *moderadas* para a proteína CD123 (TCS) com as respectivas variáveis: BCL6 (G) (Tabela 9).

5.1.5.5 CD3

Na região ductal foram encontradas correlações *moderadas* para a proteína CD3 (D) com as respectivas variáveis: CD8 (G), (TCS) e CD20 (TCS). E correlação *forte* com: CD8 (D) (Tabela 10).

Na região glandular foram encontradas correlações *moderadas* para a proteína CD3 (G) com as respectivas variáveis: CD8 (G) e (TCS). E correlação *forte* com: CD8 (D) (Tabela 10).

Na região de tecido de substituição foram encontradas correlações *moderadas* para a proteína CD3 (TCS) com as respectivas variáveis: CD8 (D), (G), (TCS), CD20 (G) e (TCS) (Tabela 10).

5.1.5.6 CD4

Na região ductal foi encontrada correlação *moderada* para a proteína CD4 (D) com a respectiva variável: CD20 (D). E correlação *inversa* com: BCL6 (TCS) (Tabela 10).

Na região glandular foi encontrada correlação *moderada* para a proteína CD4 (G) com a respectiva variável: CD20 (D). E correlação *inversa* com: BCL6 (TCS) (Tabela 10).

Na região de tecido de substituição foi encontrada correlação *moderada* para a proteína CD4 (TCS) com as respectivas variáveis: CD68 (G) e (TCS). E correlação *inversa* com: BCL6 (TCS) (Tabela 10).

5.1.5.7 CD8

Na região ductal foi encontrada correlação *moderada* para a proteína CD8 (D) com a respectiva variável: CD20 (D) (Tabela 10).

Na região glandular foi encontrada correlação *moderada* para a proteína CD8 (G) com a respectiva variável: CD20 (G). E correlação *inversa* com: CD68 (G) e (TCS) (Tabela 10).

Na região de tecido de substituição foi encontrada correlação *inversa* para a proteína CD8 (TCS) com a respectiva variável: CD68 (G) (Tabela 10).

5.1.5.8 CD20

Na região ductal foi encontrada correlação *inversa* para a proteína CD20 (D) com as respectivas variáveis: CD68 (D) e BCL6 (TCS) (Tabela 10).

Na região glandular foi encontrada correlação *inversa* para a proteína CD20 (G) com as respectivas variáveis: CD68 (D) e CD68 (G) (Tabela 10).

Na região de tecido de substituição foi encontrada correlação *inversa* para a proteína CD20 (TCS) com as respectivas variáveis: CD68 (D) e BCL6 (G) (Tabela 10).

5.1.5.9 CD68

As correlações observadas com a proteína CD68 foram descritas nos tópicos anteriores (Tabela 11).

5.1.5.10 BCL6

As correlações observadas com a proteína BCL6 também já foram descritas nos tópicos anteriores (Tabela 11).

5.1.5.12 Escore focal

Foram observadas correlações *moderadas* entre o escore focal e as respectivas proteínas, dentre elas: CD1a (D), CD3 (D), (G) e (TCS), CD8 (G) e

(TCS), Langerina (G) e (TCS), CD20 (D), (G) e (TCS). As correlações *fortes* com: CD8 (D), langerina (D) (Tabela 11).

5.1.5.11 Índice de atividade da doença – ESSDAI

Houve correlação *moderada* para o ESSDAI com a proteína BCL6 (TCS) (Tabela 11).

Conforme esperado, houve correlação significativa *moderada, forte* e/ou extremamente *forte* entre as diferentes regiões de um mesmo imunomarcador (Apêndice F).

Tabela 9 – Correlação entre marcadores de células dendríticas versus outros marcadores do infiltrado inflamatório – HCFMUSP – 2015 a 2019

Variáveis	CD1a (D)	CD1a (G)	CD1a (TCS)	Langerina (D)	Langerina (G)	Langerina (TCS)
CD1a (D)	-	S	S	0,443*	NS	NS
CD1a (G)	S	-	S	NS	NS	NS
CD1a (TCS)	S	S	-	NS	NS	NS
CD3 (D)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CD3 (G)	0,420*	0,414*	NS	NS	0,383*	NS
CD3 (TCS)	0,430*	0,425*	NS	NS	0,388*	0,418*
CD8 (D)	0,436*	0,390*	NS	0,486*	NS	0,489*
CD8 (G)	0,668*	0,641*	0,422*	0,539*	0,418*	0,382*
CD8 (TCS)	0,737*	0,660*	0,392*	0,446*	NS	0,364*
Langerina (D)	0,443*	NS	NS	-	S	S
Langerina (G)	NS	NS	NS	S	-	S
Langerina (TCS)	NS	NS	NS	S	S	-
CD20 (D)	NS	NS	NS	0,441*	NS	0,448*
CD20 (G)	NS	NS	NS	NS	0,387*	NS
CD20 (TCS)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CD21 (D)	NS	NS	NS	0,391*	0,512*	NS
CD21 (G)	0,418*	0,408*	NS	NS	0,446*	NS
CD21 (TCS)	0,533*	0,543*	NS	NS	0,374*	NS
CD4 (D)	NS	-0,384*	NS	NS	NS	NS
CD4 (G)	NS	-0,420*	NS	NS	NS	NS
CD4 (TCS)	-0,362*	-0,457*	NS	NS	NS	NS
CD123 (D)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CD123 (G)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CD123 (TCS)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CD68 (D)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CD68 (G)	-0,447*	-0,469*	-0,420*	NS	NS	NS
CD68 (TCS)	-0,408*	-0,444*	-0,384*	NS	NS	NS
BCL6 (D)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
BCL6 (G)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
BCL6 (TCS)	0,450*	0,487*	0,448*	NS	NS	NS

Variáveis	CD21 (D)	CD21 (G)	CD21 (TCS)	CD123 (D)	CD123 (G)	CD123 (TCS)
CD3 (D)	NS	0,590*	0,404*	NS	NS	NS
CD3 (G)	NS	0,518*	0,479*	NS	NS	NS
CD3 (TCS)	NS	0,596*	0,598*	NS	NS	NS
CD8 (D)	NS	0,425*	0,430*	NS	NS	NS
CD8 (G)	NS	0,504*	0,496*	NS	NS	NS
CD8 (TCS)	NS	0,575*	0,603*	NS	NS	NS
CD20 (D)	0,405*	NS	NS	NS	NS	NS
CD20 (G)	0,462*	0,473*	0,450*	NS	NS	NS
CD20 (TCS)	0,488*	0,508*	NS	NS	NS	NS
CD21 (D)	-	S	S	NS	NS	NS
CD21 (G)	S	-	S	NS	NS	NS
CD21 (TCS)	S	S	-	NS	NS	NS
CD4 (D)	NS	NS	-0,434*	0,421*	NS	NS
CD4 (G)	NS	NS	-0,369*	0,363*	NS	NS
CD4 (TCS)	NS	NS	-0,480*	0,363*	NS	NS
CD123 (D)	NS	NS	NS	-	S	NS
CD123 (G)	NS	NS	NS	S	-	NS
CD123 (TCS)	NS	NS	NS	NS	NS	-
CD68 (D)	-0,409*	NS	NS	NS	NS	NS
CD68 (G)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CD68 (TCS)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
BCL6 (D)	NS	NS	NS	0,422*	0,392*	NS
BCL6 (G)	NS	NS	NS	NS	NS	0,437*
BCL6 (TCS)	NS	NS	0,426*	NS	NS	NS

Fonte: Produção da própria autora**Nota:** S - Significante perfeito; NS - Não Significante.

*Correlação de Spearman

Tabela 10 - Correlação entre marcadores de linfócitos versus outros marcadores do infiltrado inflamatório – HCFMUSP – 2015 a 2019

Variáveis	CD3 (D)	CD3 (G)	CD3 (TCS)	CD4 (D)	CD4 (G)	CD4 (TCS)
CD1a (D)	NS	0,420*	0,430*	NS	NS	-0,362*
CD1a (G)	NS	0,414*	0,425*	-0,384*	-0,420*	-0,457*
CD1a (TCS)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CD3 (D)	-	S	S	NS	NS	NS
CD3 (G)	S	-	S	NS	NS	NS
CD3 (TCS)	S	S	-	NS	NS	NS
CD8 (D)	0,627*	0,439*	0,461*	NS	NS	NS
CD8 (G)	0,484*	0,553*	0,453*	NS	NS	NS
CD8 (TCS)	0,553*	0,470*	0,592*	NS	NS	NS
Langerina (D)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Langerina (G)	NS	0,383*	0,388*	NS	NS	NS
Langerina (TCS)	NS	NS	0,418*	NS	NS	NS
CD20 (D)	NS	NS	NS	0,490**	0,455*	NS
CD20 (G)	NS	NS	0,382*	NS	NS	NS
CD20 (TCS)	0,461*	NS	0,450*	NS	NS	NS
CD21 (D)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CD21 (G)	0,590*	0,518*	0,596*	NS	NS	NS
CD21 (TCS)	0,404*	0,479*	0,598*	-0,434*	-0,369*	-0,480*
CD4 (D)	NS	NS	NS	-	S	S
CD4 (G)	NS	NS	NS	S	-	S
CD4 (TCS)	NS	NS	NS	S	S	-
CD123 (D)	NS	NS	NS	0,421*	0,363*	0,363*
CD123 (G)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CD123 (TCS)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CD68 (D)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CD68 (G)	NS	NS	NS	NS	NS	0,540*
CD68 (TCS)	NS	NS	NS	NS	NS	0,371*
BCL6 (D)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
BCL6 (G)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
BCL6 (TCS)	NS	NS	NS	-0,577*	-0,561**	-0,463*

Variáveis	CD8 (D)	CD8 (G)	CD8 (TCS)	CD20 (D)	CD20 (G)	CD20 (TCS)
CD1a (D)	0,436*	0,668*	0,737*	NS	NS	NS
CD1a (G)	0,390*	0,641*	0,660*	NS	NS	NS
CD1a (TCS)	NS	0,422*	0,392*	NS	NS	NS
CD8 (D)	-	S	S	0,514**	NS	NS
CD8 (G)	S	-	S	NS	0,429*	NS
CD8 (TCS)	S	S	-	NS	NS	NS
Langerina (D)	0,486*	0,539*	0,446*	0,441*	NS	NS
Langerina (G)	NS	0,418*	NS	NS	0,387*	NS
Langerina (TCS)	0,489*	0,382*	0,364*	0,448*	NS	NS
CD20 (D)	0,514*	NS	NS	-	NS	S
CD20 (G)	NS	0,429*	NS	NS	-	S
CD20 (TCS)	NS	NS	NS	S	S	-
CD21 (D)	NS	NS	NS	0,405*	0,462*	0,488*
CD21 (G)	0,425*	0,504*	0,575*	NS	0,473*	0,508*
CD21 (TCS)	0,430*	0,496*	0,603*	NS	0,450*	NS
CD123 (D)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CD123 (G)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CD123 (TCS)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CD68 (D)	NS	NS	NS	-0,393*	-0,366*	-0,414*
CD68 (G)	NS	-0,579*	-0,452*	NS	-0,430*	NS
CD68 (TCS)	NS	-0,514*	NS	NS	NS	NS
BCL6 (D)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
BCL6 (G)	NS	NS	NS	NS	NS	-0,380*
BCL6 (TCS)	NS	NS	NS	-0,408*	NS	NS

Fonte: Produção da própria autora**Nota:** S - Significante perfeito; NS - Não Significante.

*Correlação de Spearman

Tabela 11 - Correlação entre marcador de macrófagos, de linfócitos B, escore focal e ESSDAI versus marcadores do infiltrado – HCFMUSP – 2015 a 2019

Variáveis	CD68 (D)	CD68 (G)	CD68 (TCS)	BCL6 (D)	BCL6 (G)	BCL6 (TCS)	Escore Focal	ESSDAI
CD1a (D)	NS	-0,447*	-0,408*	NS	NS	0,450*	0,382*	NS
CD1a (G)	NS	-0,469*	-0,444*	NS	NS	0,487*	0,290	NS
CD1a (TCS)	NS	-0,420*	-0,384*	NS	NS	0,448*	0,168	NS
CD3 (D)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,455*	NS
CD3 (G)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,391*	NS
CD3 (TCS)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,421*	NS
CD8 (D)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,627*	NS
CD8 (G)	NS	-0,579*	-0,514*	NS	NS	NS	0,590*	NS
CD8 (TCS)	NS	-0,452*	NS	NS	NS	NS	0,572*	NS
Langerina (D)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,620*	NS
Langerina (G)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,407*	NS
Langerina (TCS)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,450*	NS
CD20 (D)	-0,393*	NS	NS	NS	NS	-0,408*	0,561*	NS
CD20 (G)	-0,366*	-0,430*	NS	NS	NS	NS	0,496*	NS
CD20 (TCS)	-0,414*	NS	NS	NS	-0,380*	NS	0,409*	NS
CD21 (D)	-0,409*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CD21 (G)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CD21 (TCS)	NS	NS	NS	NS	NS	0,426*	NS	NS
CD4 (D)	NS	NS	NS	NS	NS	-0,577*	NS	NS
CD4 (G)	NS	NS	NS	NS	NS	-0,561*	NS	NS
CD4 (TCS)	NS	0,540**	0,371*	NS	NS	-0,463*	NS	NS
CD123 (D)	NS	NS	NS	0,422*	NS	NS	NS	NS
CD123 (G)	NS	NS	NS	0,392*	NS	NS	NS	NS
CD123 (TCS)	NS	NS	NS	NS	0,437*	NS	NS	NS
CD68 (D)	-	S	S	NS	NS	NS	NS	NS
CD68 (G)	S	-	S	NS	NS	NS	NS	NS
CD68 (TCS)	S	S	-	NS	NS	NS	NS	NS
BCL6 (D)	NS	NS	NS	-	S	S	NS	NS
BCL6 (G)	NS	NS	NS	S	-	S	NS	NS
BCL6 (TCS)	NS	NS	NS	S	S	-	NS	0,540*

Fonte: Produção da própria autora

Nota: S - Significante perfeito; NS - Não Significante.

*Correlação de Spearman

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A pesquisa realizada em forma de estudo transversal, em 30 amostras de glândulas salivares mucosas de pacientes com SSp (**grupo caso**) e em 10 amostras de pacientes sem a síndrome (**grupo controle**), mostrou importantes diferenças histomorfológicas entre os grupos e apontou, de forma inédita, a participação de células dendríticas plasmocitoides na composição do infiltrado inflamatório da SSp.

Quanto aos dados sociodemográficos, foi realizado o pareamento da amostra entre os grupos avaliados. No grupo caso, a doença acometeu predominantemente pacientes do sexo feminino, de cor branca e com idade entre 4ª e 6ª décadas de vida. Esses resultados corroboraram os estudos de Bowman *et al.*, 2004; Kassan e Moutsopoulos, 2004. Frequentemente, a doença ocorre por volta dos 50 anos de idade (García-Carrasco *et al.*, 2002, Sánchez-Guerrero, 2005, Maślińska *et al.*, 2015), no entanto, devido à heterogeneidade e às manifestações clínicas inespecíficas da doença, o diagnóstico pode ser postergado.

Todos os dados clínicos e laboratoriais foram importantes para o diagnóstico da síndrome - sejam eles subjetivos ou objetivos - no entanto apenas os critérios específicos para o diagnóstico SSp serão ressaltados, essa decisão foi tomada tendo como referência o consenso publicado por Shiboski *et al.* (2017). Mais da metade da amostra apresentou hipossalivação, xeroftalmia e baixo ESSDAI, além de altos títulos do autoanticorpo SSA-Ro. Esses resultados estavam em conformidade com os achados presentes na literatura - Fox (2005), Mavragani e Moutsopoulos (2010), Tzioufas *et al.*, (2012) e Cornec *et al.* (2014).

Quanto os dados histopatológicos, todos os casos estudados mostraram sialadenite focal linfoplasmocitária e a maioria dos casos apresentou grau intenso de inflamação, presença de centro germinativo e escore focal ≥ 1 (número de focos linfocíticos/4-mm²) nas amostras de glândulas salivares menores de pacientes com SSp. Como a pesquisa avaliou pacientes já diagnosticados com

SSp e, tendo em vista que a sialadenite focal linfoplasmocitária e o escore focal compõem os atuais critérios diagnósticos da doença (Shiboski *et al.*, 2017), já era esperado que a grande maioria dos casos expressassem esses resultados, o que demonstra o compromisso do nosso grupo de pesquisa em seguir os mais recentes consensos internacionais e entender que ele foi um grande divisor de águas quando comparado os consensos anteriores.

Foi observado, em nosso estudo, que a gravidade das lesões inflamatórias e a composição do infiltrado linfoplasmocitário foi variável entre os pacientes, o que aponta para uma provável diferença entre os mecanismos patogênicos entre os subgrupos de pacientes com SSp.

Quanto ao grau de inflamação, os resultados desta pesquisa corroboraram os do estudo de Christodoulou *et al.* (2010) em que os casos com intensa inflamação foram mais prevalentes quando comparados aos de graus moderado e leve. Isso revela a dificuldade de diagnosticar a doença em suas fases precoces, onde, muito provavelmente, os sintomas são pouco específicos. Todavia, os resultados apresentados Dinescu *et al.* (2017) foram divergentes, uma vez que pouquíssimos casos apresentavam grau intenso de inflamação. Tal fato pode ser explicado pelo baixo número amostral do referido estudo (n=10).

Os resultados do presente estudo demonstraram que as glândulas salivares mucosas de pacientes com SSp foram predominantemente compostas por mDC CD1a+, linfócitos T (dentre eles, linfócitos T CD4+ e T CD8+) e linfócitos B CD20+. Essa infiltração de células mononucleares ocorreu, especificamente, na região ductal, em todo parênquima e, ainda, na região glandular que sofreu o processo de substituição por tecido fibroso e adiposo, reforçando a teoria da epitelie autoimune (Mavragani e Moutsopoulos, 2010).

Estudos previamente publicados (Adamson *et al.*, 1983; Manoussakis e Moutsopoulos, 2000; Van Blokland *et al.*, 2000; Katsífis *et al.*, 2007) observaram existência de um denso infiltrado periductal composto por linfócitos T/B e mDC's, no entanto, relataram ainda a presença de macrófagos usando uma análise semi-quantitativa (Van Blokland *et al.*, 2000). Manoussakis *et al.* (2007) também observaram a presença de macrófagos CD68+ em seu estudo quantitativo,

entretanto, realizaram contagem manual e selecionaram apenas 5 diferentes campos com alta densidade de células positivas.

Apesar dos macrófagos estarem presentes no interior dos focos inflamatórios e no parênquima glandular nas amostras avaliadas desta pesquisa, a análise morfométrica da proteína CD68 não apresentou diferença estatística quando comparada ao grupo controle (pacientes sem a síndrome). Essas imagens foram digitalizadas e a contagem foi realizada de forma automatizada em toda área tecidual contida nas lâminas, tendo como base o padrão de cor estabelecido a partir da melhor gama de positividade entre os casos. Portanto, o método de análise realizado desta pesquisa foi mais minucioso que os métodos utilizados nos estudos de Van Blokland *et al.* (2000) e Manoussakis *et al.* (2007). A diferença de análise do presente estudo com os de outros autores pode ter sido influenciada pelos diferentes estágios da SSp que cada paciente apresentava, pois sabe-se que os monócitos sofrem diapedese quando ultrapassam o endotélio vascular e, ainda, passam por um processo de maturação até atingirem sua forma efetora, sendo a partir de então denominados macrófagos (Vogel *et al.*, 2014). Assim, a presença focal de macrófagos CD68 positivos observados em nossas amostras podem revelar que, em estágios mais avançados da doença, essas células migram para o lóbulo glandular destruído pelo infiltrado inflamatório para realizar sua função de depurar células apoptóticas/necróticas residuais e outros resíduos teciduais deixados pela reação inflamatória.

Por outro lado, quanto ao grupo controle desta pesquisa, apesar de todo cuidado tomado durante a fase de inclusão das amostras de pacientes sem o registro de doenças autoimunes, o fato dele ter sido composto por amostras de pacientes que vieram a óbito, também pode ter contribuído para a ausência de significância do CD68, pois sabe-se que os macrófagos são células que também estão envolvidas na patogênese de outras doenças (Kavurma *et al.*, 2017; Farias *et al.*, 2015) que poderiam estar relacionadas à causa das mortes.

Conforme os resultados desta pesquisa, a destruição glandular associada à SSp estava relacionada à tendência do infiltrado linfoplasmocitário de se localizar, principalmente, ao redor do epitélio ductal e acinar, enquanto o grau de

gravidade da doença variava. Diante deste fato, a comparação dos dados morfométricos com o grau de intensidade do infiltrado inflamatório foi realizada por meio da quantificação do número total de células presentes nos 4 lóbulos glandulares dividido pela área total tecidual presente em cada lâmina. A partir do teste de *post hoc*, foi observado que houve predomínio da densidade dos linfócitos T helper CD4+, linfócitos B CD20+ e pDC's CD123+ conforme o grau de severidade do infiltrado inflamatório aumentava.

De modo geral, esses resultados estão em conformidade com estudos anteriores (Adamson *et al.*, 1983; Vogelsang *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2016). No entanto, difere parcialmente dos resultados de Christodoulou *et al.* (2010), especificamente quando afirmaram que a subpopulação de linfócitos TCD4+ diminuiu conforme a intensidade das lesões inflamatórias. Os resultados do presente estudo mostraram que, para a região ductal, a densidade dos linfócitos TCD4+ aumentou nos graus moderado e intenso quando comparados ao grau leve de infiltração. A diferença encontrada entre os estudos, provavelmente, possa ser explicada devido ao fato do estudo de Christodoulou *et al.* (2010), ter avaliado a incidência e a distribuição do infiltrado inflamatório em lesões de SSp de acordo com o grau de intensidade da inflamação por meio da porcentagem do tipo celular dividido pelo número total de células mononucleares infiltrantes, em magnificação de 20X, enquanto o presente estudo avaliou a densidade do infiltrado inflamatório (quantidade de células positivas dividido pelo valor de área total contida na lâmina) nas diferentes regiões glandulares, em magnificação de 40X.

Diante deste resultado, pode-se afirmar que os linfócitos TCD4+ e linfócitos B CD20+ estão, de fato, presentes em infiltrados inflamatórios de graus moderado e intenso. Certamente, todas estas células parecem estar exercendo uma função extremamente importante em casos com inflamações moderadas e intensas, nesse contexto, destaque especial é dado à atuação das pDC's como prováveis orquestrantes da ativação de linfócitos T *helper* e linfócitos B na SSp (Vogelsang *et al.*, 2006).

Sabe-se que, na SSp, a presença do IFN tipo I tem sido correlacionada com a atividade da doença e com a produção de autoanticorpos (Brkic *et al.*,

2013) e, nesta enfermidade, as pDC's são apontadas com as principais responsáveis pelo aumento da atividade desta citocina (Wildenberg *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2016). Curiosamente, a pDC parece estar envolvida na etiopatogênese da SSp, especificamente com a infecção viral inicial, apoptose e produção de autoanticorpos (Vogelsang *et al.*, 2010). Portanto, o aumento do IFN- α contribuiu para o contínuo recrutamento de pDC's da periferia de vasos sanguíneos para o interior da glândula (Vogelsang *et al.*, 2010), contribuindo para a manutenção da atividade inflamatória crônica.

Diante do exposto, mais estudos são necessários para desvendar os exatos mecanismos do IFN- α nas vias pró-inflamatórias, porém, ter observado que as pDC's CD123+ compuseram o infiltrado inflamatório - conjuntamente com os linfócitos T CD4+ e linfócitos B CD20+ na região periductal e periacinar - e sua densidade apresentou diferença significativa para os graus intenso e moderado do infiltrado inflamatório, permite-nos elencar as pDC's como um interessante tópico de pesquisas futuras em SSp. Elas também parecem exercer um papel na composição dos GC's na SSp, como descrito a seguir.

Os GC's ectópicos se destacam entre os fatores preditivos – clínicos e sorológicos - para o desenvolvimento de linfoma não-Hodgkin na SSp (Theander *et al.*, 2011). Isto deve-se a sua capacidade gerar um microambiente capaz de promover o desenvolvimento do linfoma não-Hodgkin (Salomonsson *et al.*, 2003), por meio das seguintes etapas: estimulação crônica antigênica, ativação aberrante de linfócitos B nos tecidos inflamados, hipermutações somáticas e eventos oncogênicos (Voulgarelis e Tzioufas, 2010). Portanto, avaliar a presença de GC's com potencial efeito de malignização, visualizar detalhadamente a composição do infiltrado inflamatório e o índice de atividade da doença é fundamental para o prognóstico desse subgrupo de pacientes.

Neste estudo, por meio da comparação entre dados morfométricos com a presença e ausência de GC's, foi observado um predomínio da densidade de pDC's CD123+, linfócitos T CD8+, linfócitos T helper CD4+ e linfócitos B, especialmente na região periductal na amostra avaliada. Esses dados demonstraram que, de fato, há um evento de proliferação celular intenso ocorrendo nos casos avaliados, entretanto, não foi observada significância na

imunoexpressão das fDC's CD21+ e linfócitos B BCL6+ nos GC's encontrados. Este dado foi confirmado pela ausência de linfoma em todos os casos avaliados. Portanto, apesar de ter sido observada imunoexpressão conjunta destas proteínas em alguns casos, a análise estatística inicial, o ESSDAI e os dados laboratoriais não demonstraram que os GC's observados estavam em processo de malignização, o que não quer dizer que esse subgrupo de pacientes está isento a este processo.

Esses resultados vão ao encontro dos estudos de Vineusa *et al.* (2009), Theander *et al.* (2011), Jonsson *et al.* (2012), Giannouli e Vougiarelis (2014), Zhao *et al.* (2016) e He *et al.* (2017) que afirmaram existir uma atividade das pDC's, dos linfócitos T e, principalmente, dos linfócitos B nos GC's presentes nos casos diagnosticados com SSp. Nesta pesquisa, os GC's foram caracterizados por meio da imunoexpressão das proteínas BCL6 e/ou CD21. Divergências metodológicas existentes entre as pesquisas acerca da identificação de GC's na SSp são comuns e justificam a variabilidade na detecção dessas estruturas (Theander *et al.*, 2011, Johnsen *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2016; He *et al.*, 2017). Deste modo, é importante ressaltar a necessidade de se elaborar um consenso para a identificação de GC's com potencial efeito de malignização em lesões de glândulas salivares menores para esta síndrome, a fim de evitar a subestimação ou superestimação dos resultados.

Diante do exposto, e em conformidade com Alumno *et al.*, (2018), Haacke *et al.* (2018) e Goules e Tzioufas (2019), sugere-se que mais estudos (coortes) sejam realizados e que possuam critérios objetivos para a caracterização morfológica de GC's em glândulas salivares menores de pacientes com SSp, tais como: infiltrado inflamatório amplo (≥ 50 células mononucleares agrupadas) e bem circunscrito – podendo ser observado em H&E –, uma rede bem definida de fDC's CD21+ e de linfócitos B BCL6+, identificadas por meio de duplas marcações, em diferentes níveis de cortes histopatológicos, a fim de que a real prevalência dos GC's com potencial de malignização na SSp possa ser elucidada, sua implicância no desenvolvimento de linfomas MALT venha ser corretamente mensurada e o subgrupo de pacientes com probabilidade de desenvolver linfoma tenha uma abordagem clínica e medicamentosa específica.

Além disso, pode-se realizar imunomarcações complementares para identificação de linfócitos T helper foliculares CD28+ e células em proliferação Ki67+, típicas em GC's, o que pode ser uma perspectiva para estudos futuros do nosso grupo.

No Quadro 4, está descrita uma proposta de consenso, elaborada pelo nosso grupo, para análise da imunoexpressão das proteínas e definição de GC's com potencial de malignização em glândulas salivares menores de pacientes diagnosticados com SSp:

Quadro 4- Proposta para classificação de centros germinativos na Síndrome de Sjögren

Número de casos (n)	Descrição do padrão de imunoexpressão	GC
	<i>Sialadenite focal linfocítica(**) e CD21- e BCL6-</i>	-
	<i>Sialadenite focal linfocítica(**) e apenas CD21+</i>	-
	<i>Sialadenite focal linfocítica(**) e apenas BCL6+(*)</i>	+
	<i>Sialadenite focal linfocítica(**) e pequeno network de células CD21+ e BCL6+</i>	+
	<i>Sialadenite focal linfocítica em áreas confluentes(**) e network amplo de células CD21+ e BCL6+</i>	+
	<i>Sialadenite focal linfocítica em áreas confluentes(**), network amplo de células CD21+ e BCL6+ e morfologia clássica de GC's – com zona clara e escura</i>	+

Fonte: Produção da própria autora

Nota: (**) A sialadenite focal linfocítica deve ser composta por ≥ 50 linfócitos/ 4mm^2

(*) Para classificar BCL6+ é necessário, no mínimo, um grupo de células adjacentes imunomarcadas ≥ 5 no interior do foco inflamatório (Haacke *et al.*, 2017).

Neste estudo, não foi realizada essa análise tão detalhada dos GC's como estamos propondo acima e isso explica o alto percentual de centros germinativos encontrados. De fato, é prudente validar este método de análise (Quadro 4) em futuras pesquisas por meio das proteínas BCL6 e CD21, em reações imunoistoquímicas de duplas marcações, em diferentes níveis de cortes histológicos e comparando dois grupos de pacientes com SSp: os que desenvolveram linfoma MALT e os que não desenvolveram. Primordialmente, esse estudo auxiliará na compreensão do real papel dos GC's quanto ao desenvolvimento de lesões linfoproliferativas.

Uma observação importante na análise das amostras avaliadas foi a predileção de ataque do infiltrado inflamatório ao epitélio ductal e acinar, o que caracterizou a epitelite autoimune (Manoussakis e Moutsopoulos, 2000; Mavragani e Moutsopoulos, 2014). Como já descrito na literatura (Mitsias *et al.*, 2006), o epitélio glandular também é capaz de atuar como uma APC - além das DC's, macrófagos e linfócitos B - promovendo a atração de linfócitos e contribuindo para a manutenção da reação crônica inflamatória.

Algumas correlações significativas foram observadas entre as proteínas. De modo geral, elas apresentaram embasamento científico na imunopatologia da SSp ou ainda necessitam ser esclarecidas, para que haja maior compreensão do mecanismo fisiopatológico que ocorre nessa síndrome. Sempre que possível, objetivou-se ordenar a discussão na sequência natural dos eventos imunológicos, principalmente, a partir das DC's.

Quanto à CD1a, houve uma correlação diretamente proporcional às proteínas langerina, CD3 e CD21. Logo, a resposta imunológica inata, de processamento imediato, estava ativa devido à presença de mDC'S e as LC's, sendo esta última um subtipo de DC proveniente da mesma origem mieloide (Banchereau *et al.*, 2000). Na SSp, estas células se correlacionaram significativamente com a presença do infiltrado linfocítico (Van Blokland *et al.*, 2000). As DC's são as principais responsáveis em interligar os dois braços do sistema imunológico: a imunidade inata antígeno-não-específica e a imunidade adaptativa antígeno-específica (Jonsson *et al.*, 2011), o que explica a associação dessas células ao início da resposta imunológica adaptativa observada neste estudo por meio da presença dos linfócitos T e das fDC's.

Nesta pesquisa, foi observada a significância da densidade da CD1a na SSp, principalmente na região ductal e no parênquima glandular. Este resultado permite-nos confirmar a hipótese inicial de que as mDC's CD1a+ estão envolvidas na imunopatogênese da SSp, possuem papel central na ativação do infiltrado inflamatório da doença por meio da quebra da tolerância periférica e iniciação da resposta imunológica aos autoantígenos. Também foi observada uma correlação inversa entre a CD1a e a CD4, o que indica que, provavelmente,

as mDC's CD1a+ não são as principais células responsáveis por elicitar os linfócitos T CD4+.

Na amostra avaliada, a langerina estava também associada às proteínas CD3 e CD8. Este fato demonstrou que, provavelmente, as LC's estavam exercendo seu papel de APC aos linfócitos T e, especificamente, aos linfócitos TCD8+. Frequentemente, na SSp, as DC's clássicas apresentam antígenos aos linfócitos TCD4+ (Mavragani e Moutsopoulos, 2014), no entanto, tradicionalmente, as LC's são fracas estimuladoras de linfócitos T *helper* CD4+ e as mais potentes ativadoras de linfócitos T citotóxicos CD8+, via MHC classe I (Banchereau *et al.*, 2000).

Logo, a associação observada neste estudo, remete-nos à apresentação de antígenos cruzada, também conhecida como *cross-priming*, em que as LC's são capazes de endocitar uma célula infectada por microorganismos intracelulares - como os vírus - processá-los e apresentá-los, por meio do MHC classe I aos linfócitos T citotóxicos CD8+ (Romao *et al.*, 2013). De acordo com esta linha de pensamento, indagamos: será que, na SSp, as LC's estão apresentando antígenos via MHC de classe I aos linfócitos T citotóxicos CD8+? Qual a taxa de apresentação de antígenos pelas LC's, na SSp, por esta via? Qual é a taxa de apresentação de antígenos pelas LC's por meio da via MHC de classe II? Diante dessas perguntas, o real mecanismo fisiopatológico das LC's na SSp poderá ser esclarecido.

Apesar de, inicialmente, não ter sido observada associação da CD21 com CD20 ou BCL6 com os GC's, na análise entre as variáveis morfométricas, a proteína CD21 apresentou correlação positiva com a CD20 e com a Langerina em todas as regiões analisadas, além de correlação negativa com CD4. Como esperado em casos diagnosticados com a SSp, as fDC's CD21+ estavam associadas aos linfócitos B CD20+, invés dos linfócitos T *helper* CD4+, pois as fDC's não são como as DC's clássicas que capturam o antígeno no tecido e os transporta para os órgãos linfoides secundários, onde são capazes de apresentarem os peptídeos aos linfócitos T *helper* CD4+ (Banchereau *et al.*, 2000; Vogelsang *et al.*, 2006). Ao contrário, elas apresentam o antígeno diretamente aos linfócitos B CD20+ na zona clara do GC (Salomonsson *et al.*,

2003; Jonsson e Skarstein 2008; Corsiero *et al.*, 2016). Portanto, a análise entre CD21 e CD20 demonstrou que, realmente, existiam GC's não-linfoproliferativos nos casos avaliados, porém, provavelmente devido aos diferentes estágios da doença, eles não foram significativos quando avaliados conjuntamente.

Interessantemente, foi encontrada uma correlação diretamente proporcional entre as fDC's CD21+ e as LC's. Sabe-se que é comum ocorrer a interação entre DC's e demais células do infiltrado inflamatório (Qian e Cao, 2018), mas diante desse resultado encontrado, questionamos: será que as DC's têm capacidade de se comunicarem? Como isso ocorre? Novos estudos são necessários para esclarecer quais são os exatos mecanismos imunopatogenéticos das DC's na SSp.

Um olhar criterioso foi direcionado às fDC's CD21+ presentes no tecido de substituição, haja vista que essas células estavam positivamente correlacionadas aos linfócitos B CD20+ da região de parênquima glandular. A presença fDC's no tecido de substituição permite-nos questionar: será que as células CD21+ estão nesta região de tecido fibroso e adiposo (tecido de substituição) apenas por se tratar de um resquício de um processo inflamatório prévio? Ou a presença das fDC's, de fato, é capaz de influenciar e sustentar a inflamação crônica presente no tecido glandular remanescente? De alguma forma, este resultado aponta para um papel proeminente do sistema imunológico adaptativo na inflamação glandular.

Aquela ideia de que o tecido adiposo é inerte, já está ultrapassada. Atualmente, ele é considerado um dos maiores órgãos endócrinos do corpo humano, ativo para reações inflamatórias e homeostase metabólica, com alta capacidade de sintetizar e liberar adipocinas, as quais influenciam uma variedade de processos fisiológicos e fisiopatológicos (Unamuno *et al.*, 2018). A análise histopatológica e imunoistoquímica das glândulas salivares de pacientes com SSp permitiu-nos observar a frequente presença de infiltrado inflamatório periductal e periadinar e, em muitos casos, a destruição dessas estruturas anatômicas associadas à fibrose e deposição progressiva de adipócitos.

Pouco ainda se sabe sobre a significância do tecido adiposo na SSp (Skarstein *et al.*, 2016; Aqrabi *et al.*, 2018). Os primeiros resultados desta pesquisa revelaram a presença significativa de componentes da resposta imunológica adaptativa no tecido de substituição e, diante desse cenário, perguntamos: qual é o papel do tecido adiposo na SSp? Esta inflamação crônica observada no presente estudo favorece a disfuncionalidade do tecido adiposo e vice-versa, tornando-se um ciclo vicioso? Futuras pesquisas precisam ser realizadas a fim de elucidar se este tecido, especificamente, é um propulsor para progressão da doença ou, simplesmente, a caracterização do processo de reparo tecidual.

Durante a descrição dos resultados desta pesquisa, as pDC's e os linfócitos T helper CD4+ demonstraram estar presentes em importantes pontos avaliados nas biopsias de glândulas salivares menores de pacientes com SSp, tais como: nos graus moderado/intenso da inflamação e nos centros germinativos. Na análise de correlação entre os dados morfométricos, foi observada associação entre a proteína CD123 com a CD4 e com a proteína BCL6, em todas as áreas glandulares avaliadas. O fato das pDC's, diante de antígenos virais e alterações hormonais, secretarem IFN- α explica seu importante papel na atração de células mononucleares da periferia de vasos sanguíneos para o interior do infiltrado inflamatório de glândulas salivares menores e isso contribui para a perda da tolerância imunológica (Vogelsang *et al.*, 2010; Ainola *et al.*, 2018). Logo, este evento justifica a associação encontrada entre as pDC's CD123+, os linfócitos T helper CD4+ e os linfócitos B BCL6+.

Sabe-se que os sinais liberados pelas fDC's e pelos linfócitos T helper, especificamente, linfócitos Th17 (IL-21) induzem a imunoexpressão do BCL6 (Ozaki *et al.*, 2004; Mavragani e Moutsopoulos, 2014). Durante o processo de transformação maligna, a proteína BCL6 funciona como um repressor da diferenciação e da apoptose, permitindo a entrada dos linfócitos B em fase de ciclo celular rápido e promovendo sua produção maciça (Basso e Dalla-Favera, 2012). Logo, a correlação positiva observada neste estudo entre a CD123+ e a BCL6+ – mesmo que por intermédio dos linfócitos Th17 – indica um papel ativo das pDC's na formação de GC's em processo de transformação maligna e nos

instiga à necessidade de esclarecer o exato mecanismo molecular das pDC's quanto à formação dessas estruturas. Em conformidade com Maślińska *et al.* (2015) provavelmente, em um futuro próximo, as células secretoras de INF podem ser alvo de estudos que proponham desenvolver novas terapias medicamentosas para o tratamento de pacientes acometidos com a SSp.

Conforme discutido anteriormente, também foi encontrada correlação positiva entre a imunexpressão da CD123 presente no tecido de substituição com a BCL6 do parênquima glandular. Portanto, diante desta observação, sugerimos estar ocorrendo um *crosstalk* dinâmico e contínuo, entre o tecido de substituição e o mecanismo imunopatológico da SSp, capaz de contribuir com a formação de GC's malignos. Estudos sobre as pDC's, fDC's, linfócitos Th17, Treg, T helper foliculares e linfócitos B BCL6, selecionando especificamente a região de tecido adiposo, são necessários para confirmar tal hipótese, conjuntamente com estudos sobre imunometabolismo. Assim, os resultados obtidos acerca de pDCs CD123 positivas, em nossa análise, torna-se o mais relevante dos resultados encontrados para se adicionar novos conhecimentos à patogênese do processo de destruição glandular.

Na análise de correlação entre os dados morfométricos, a proteína CD68 apresentou correlação significativa com a CD4 e correlação inversa com: CD1a, CD21, CD8 e CD20.

Conforme esperado, os macrófagos CD68+ apresentaram correlação significativa com os linfócitos T helper CD4+ e isso evidenciou um dos seus importantes papéis que é atuar como uma APC (Manoussakis *et al.*, 2007).

De acordo com os resultados deste estudo as mDC's, LC's e pDC's demonstraram ser as principais APC's atuantes na iniciação da resposta inflamatória na SSp, enquanto os macrófagos parecem exercer esta função em uma fase posterior às DC's e isso, provavelmente, possa ser explicado pelo processo de maturação ao qual são submetidos até atingirem sua fase efetora (Vogel *et al.*, 2014), tal fato explica a correlação inversa observada entre essas células.

As células mononucleares CD68+ não estavam relacionadas aos linfócitos T citotóxicos CD8+ e nem aos linfócitos B CD20+, mas sim aos linfócitos T helper CD4+, pois estes são capazes de secretar citocinas e, consequentemente, influenciar na ativação dos macrófagos e de outras células do infiltrado inflamatório (Banchereau *et al.*, 2000). Por meio de um estudo em modelo animal com Síndrome de Sjögren, Zhou e McNamara (2014), também observaram a correlação entre macrófagos e linfócitos TCD4+ e afirmaram que estes linfócitos atuaram na promoção da inflamação crônica e na injúria tecidual por meio da liberação de imunomediadores locais, os quais promoveram a atração linfocítica e o acúmulo de monócitos pró-inflamatórios no tecido acometido pela síndrome.

As proteínas CD3 e CD8 apresentaram correlação com as proteínas CD20 e CD21. Estas associações demonstraram que os linfócitos T CD3+ e TCD8+ estavam associados às fDC's CD21+ e aos linfócitos B CD20+ nos centros germinativos, logo, evidenciando o caráter infiltrado inflamatório crônico da doença.

Em todas as regiões avaliadas, houve correlação positiva entre a CD3 e a proteína CD8. A CD3 imunoexpressa-se amplamente em vários subtipos de linfócitos T (Alibaud *et al.*, 2000; Su *et al.*, 2009) e a CD8 expressa-se em linfócitos T citotóxicos (Sun e Kavathas, 1997).

Logo, foi possível observar a ativação da resposta imunológica adaptativa do tipo celular na SSp. Esta pesquisa ainda revelou a presença dos linfócitos TCD3+ associada aos linfócitos T citotóxicos CD8+, principalmente, na região ductal. Assim, indicando que, provavelmente, esses linfócitos T possuem um tropismo pelo epitélio ductal das glândulas salivares mucosas. É provável que os linfócitos T CD8+ estejam exercendo sua função de lisar as células infectadas com possíveis antígenos estranhos ao hospedeiro (Fox, 2005) ou esteja ocorrendo uma apresentação de autoantígenos, frequente na SSp (Tapinos *et al.*, 1999; Vogelsang *et al.*, 2006). A presença desses antígenos ou agentes infecciosos na SSp ainda carecem esclarecimentos.

Barr *et al.* (2017) observaram, por meio de glândula salivar e lacrimal de modelo animal com Síndrome de Sjögren, a proliferação de linfócitos TCD8 com fenótipo ativado e, inclusive, a produção de citocinas inflamatórias no interior dessas glândulas, portanto, demonstrando que os linfócitos T citotóxicos são células envolvidas na patogenicidade da doença.

Ainda, quanto à proteína CD8, também houve forte correlação com a CD1a em todas as regiões avaliadas e correlação inversa com a CD68. O anticorpo CD1a é um imunomarcador de DC's, inclusive de LC's (Krenács *et al.*, 1993) – as quais já foram previamente discutidas. Portanto, esta correlação indicou que, por meio de uma seleção linfocítica específica para os antígenos apresentados pelas DC's, é provável que os linfócitos T citotóxicos CD8+ tenham saído do interior dos folículos secundários em direção ao interior das glândulas salivares menores de pacientes diagnosticados com SSp. Este influxo celular envolvendo as DC's, os linfócitos e as citocinas já foram descritos na literatura (Jonsson *et al.*, 2011).

Por outro lado, a proteína CD8 apresentou correlação inversamente proporcional à CD68. Este resultado demonstrou que, de fato, os macrófagos e os linfócitos TCD8+ atuaram em fases diferentes da resposta imunológica. Além disso, as mDC's puderam ser consideradas pivôs do processo inflamatório (Hillen *et al.*, 2014).

A análise entre os dados morfométricos também demonstrou que houve correlação positiva da proteína CD4 com a CD20. Conforme esperado, as glândulas salivares menores estavam infiltradas não somente pelos linfócitos T helper CD4+, mas também pelos linfócitos B CD20+, esse resultado corroborou os achados de Kapsogeorgou *et al.* (2013) e Sudzius *et al.* (2015).

Na SSp, os linfócitos T CD4+ não só medeiam a eliminação de patógenos intracelulares, mas também atuam no desenvolvimento da autoimunidade e na ativação de linfócitos B (Katsifis *et al.*, 2007). Na imunidade adaptativa, os linfócitos T e B se encontram para o reconhecimento mútuo do autoantígeno, a fim de que, após essa interação, possam desenvolver uma resposta com alta

especificidade e afinidade (Banchereau *et al.*, 2000; Katsifis *et al.*, 2007; Jonsson *et al.*, 2011).

A proteína CD20 apresentou correlação diretamente proporcional às proteínas CD21, Langerina, CD3, CD4 e CD8. Além de correlação inversamente proporcional com CD68 e BCL6. Essas associações já foram discutidas nos tópicos específicos, exceto a última, que será discutida a seguir.

Interessantemente, a densidade da fosfoglicoproteína BCL6 apresentou-se inversamente proporcional à densidade dos linfócitos B CD20+ e dos linfócitos T CD4+, demonstrando o poder dessa proteína sobre o aparato imunológico e, especificamente, sobre o ciclo celular (Basso e Dalla-Favera, 2012). Ao passo que a densidade do BCL6 foi diretamente proporcional à densidade da CD1a e da CD21. Tal fato revelou que, muito provavelmente, esta proteína utilizou os recursos das APC's para dar continuidade à proliferação maciça dos linfócitos B BCL6+ autorreativos no interior dos GC's, o que explica a correlação inversa com a CD20.

Futuros estudos são necessários para avaliar qual o grau de envolvimento das DC's no desenvolvimento de linfomas nos pacientes com SSp.

O ESSDAI expressou o quanto a doença estava sistemicamente ativa em cada paciente no momento do diagnóstico. Esta pesquisa demonstrou que este índice apresentou associação ao BCL6. Portanto, pode-se afirmar que quanto maior o ESSDAI, maior foi a densidade dos linfócitos B BCL6+ nas biopsias de glândulas salivares avaliadas. Logo, conclui-se que este índice tem altíssimo valor prognóstico para pacientes com a síndrome. Por isso, em conformidade com Seror *et al.* (2015), a utilização desta ferramenta durante o acompanhamento clínico dos pacientes continuará auxiliando na determinação da eficácia dos tratamentos instituídos.

Os resultados deste estudo demonstraram que quanto maior o escore focal, maior era a densidade das mDC's CD1a+ ao redor do ducto, conforme observado no estudo de Van Blockland *et al.* (2000). A mesma correlação foi observada para as respectivas células: LC's, linfócitos T CD3+, linfócitos T citotóxicos CD8+ e linfócitos B CD20+, em todas as regiões glandulares

avaliadas. Esses linfócitos também apareceram associados ao escore focal no estudo de Dinescu *et al.* (2017). Logo, é correto afirmar que essas células contribuíram para composição do foco inflamatório dessa enfermidade.

6.1 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Algumas limitações referentes a esta pesquisa foram detectadas.

Quanto ao grupo caso, não foi possível categorizar antecipadamente os pacientes com SSp com base no ESSDAI e, concomitantemente, instituir subgrupos representativos de pacientes antes das análises morfométricas, o que de certa forma pode ter limitado, principalmente, as análises intragrupal e, até mesmo, uma discussão entre a progressão da doença, o tempo diagnóstico e a caracterização do infiltrado inflamatório em diversas fases da síndrome.

Outra questão importante foi não ter avaliado o tecido fibroso e o tecido adiposo separadamente. Talvez isso permitiria analisar a característica peculiar de cada tecido, o que possibilitaria uma melhor compreensão do envolvimento de cada um na doença.

Quanto ao grupo controle, a busca por prontuários de pacientes que vieram à óbito não foi considerada uma alternativa, devido à descentralização do sistema de saúde.

Se, por um lado, foi possível avaliar várias células do infiltrado inflamatório, por outro, foi impossível esgotar a cadeia imunológica, haja vista a limitação de área tecidual para análises de qualidade, a limitação de prazos, dentre outras.

6.2 PERSPECTIVAS DO ESTUDO

Durante o desenvolvimento da discussão algumas propostas de estudos ou temas interessantes foram apontados, dentre eles:

- 1- Estudo que avalie os mecanismos pró-inflamatórios que são capazes de influenciar as células epiteliais em seu papel como APC's não profissionais na SSp.
- 2 – Estudo experimental para avaliar o papel das DC's na SSp.
- 3- Estudo coorte para análise de GC's em pacientes com SSp que desenvolveram linfoma MALT e os que não desenvolveram esse tipo de linfoma;
- 4- Estudo que avalie a influência do tecido adiposo e das DC's desta região na imunopatogenia da SSp.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

1. As células dendríticas estavam presentes nas amostras de glândulas salivares mucosas de pacientes com SSp, sendo, provavelmente responsáveis pelo início e perpetuação da resposta inflamatória crônica na glândula salivar.
2. As análises histopatológicas e imunoistoquímicas revelaram uma predileção de disposição do infiltrado inflamatório crônico ao redor do tecido epitelial periductal e periacinar com focos de inflamação, frequentemente, confluentes. Além disso, uma ampla fibrose glandular, inclusive, ao redor de ductos e presença de um tecido adiposo que parecia substituir o tecido glandular destruído, culminando no comprometimento de suas funções.
3. Inicialmente, foram identificadas as células dendríticas mieloides CD1a+. Em seguida, foi observado por meio da análise de correlação que as demais APC's (LC's, pDC's, fDC's e macrófagos) estavam associadas à outras células que compõem infiltrado inflamatório. Interessantemente, as pDC's estavam presentes em infiltrados inflamatórios moderados e intensos.
4. Os linfócitos T (CD3+, CD8+, CD4+) e linfócitos B (CD20+) ajudaram a compor os focos inflamatórios em toda região glandular, inclusive, no tecido de substituição e na região periductal. Os linfócitos T CD4+ estavam predominantemente presentes em focos inflamatórios moderados e intensos, enquanto que os linfócitos B em infiltrados intensos.
5. Os GC's foram encontrados nas amostras avaliadas, entretanto, ainda é necessário um consenso internacionalmente aceito para determinar a real prevalência e a exata caracterização morfológica dessas estruturas entre os diversos estudos.
6. Entre as correlações identificadas, um destaque é dado às proteínas CD123 e CD21, ao ESSDAI e ao escore focal, pois esses critérios demonstraram serem relevantes na SSp.

Anexo A - Critérios diagnósticos da Síndrome de Sjögren baseados no Consenso do Grupo Americano-Europeu (VITALI *et al.*, 2002).

1. Sintomas oculares

Pelo menos uma resposta afirmativa para uma das três questões formuladas abaixo:

- a) Tem problemas oculares diários e persistentes; relacionados a quadro de olho seco há mais de três meses?
  - b) Tem sensação de areia ou queimação ocular?
  - c) Usa colírios lubrificantes mais de três vezes ao dia?
-

2. Sintomas orais

Pelo menos uma resposta afirmativa para uma das três questões formuladas abaixo:

- a) Tem sensação de boca seca há mais de três meses?
  - b) Tem inchaço recorrente ou persistente das glândulas salivares, na idade adulta?
  - c) Sente necessidade de ingerir líquidos para ajudar na deglutição de alimentos sólidos?
-

3. Sinais oculares

Evidencia de modo objetivo o comprometimento ocular, quando pelo menos um dos dois testes abaixo é positivo.

- a) Teste de Schirmer I (≤ 5 mm em 5 minutos).
  - b) Rosa Bengala (≥ 4 pontos na escala de Bijsterveld).
-

4. Achados histopatológicos

Aglomerção de pelo menos 50 células mononucleares numa biopsia de 4 mm² da glândula salivar.

---

5. Comprometimento da glândula salivar

Evidencia de modo objetivo o comprometimento das glândulas salivares, com pelo menos um dos três métodos abaixo.

- a) Cintilografia da glândula salivar.

- b) Sialografia da glândula parótida.
  - c) Fluxo salivar sem estímulo reflexo ($\leq 1,5$ mL em 15 minutos).
-

6. Autoanticorpos

Presença de pelo menos um dos seguintes autoanticorpos séricos:

- a) Anticorpos contra os antígenos Ro/SS-A ou La/SS-B;
  - b) Anticorpos antinucleares (ANA);
  - c) Fator reumatoide.
-

Critérios de exclusão: Linfoma pré-existente, SIDA, sarcoidose ou doença do enxerto x hospedeiro.

SS primária: Presença de pelo menos 4 dos 6 itens (incluindo o critério sorológico positivo ou o critério histológico).

SS secundária: Combinação da resposta positiva para os itens 1 ou 2 com pelo menos 2 itens positivos entre as questões 3, 4 ou 5.

Anexo B - Critérios diagnósticos da Síndrome, baseados no Consenso *Sjögren's International Collaborative Clinical Alliance* (SICCA), segundo *American College of Rheumatology* (Shiboski *et al.*, 2012)

Critérios de inclusão:

- Queratoconjuntivite sicca com escore maior ou igual a 3 (desde que o doente não use diariamente os colírios para glaucoma e não tenha sofrido cirurgia na córnea ou cirurgia palpebral cosmética nos últimos 5 anos).
- Biopsia da glândula salivar exibindo sialadenite linfocitária focal ou escore de focos maiores ou iguais a 1 foco/mm².
- Anti-SSA (Ro) e/ou anti-SSB (La) positivos ou fator reumatoide positivo em associação com titulação dos anticorpos antinucleares (ANA) $\geq$ 1:320).

Regras de classificação para Síndrome de Sjögren:

A classificação de Síndrome de Sjögren se aplica a indivíduos com sinais e sintomas sugestivos da doença e que preencham pelo menos 2 dos 3 critérios de inclusão.

Os critérios de separação entre Síndrome de Sjögren primária e secundária foram eliminados.

Critérios de exclusão:

Diagnóstico de doenças que possam excluir a participação em protocolos terapêuticos ou que tenham características clínicas que interferem na avaliação dos testes de critérios:

1. história de radioterapia da cabeça e pescoço;
2. hepatite C;
3. síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA);
4. sarcoidose;
5. amiloidose;
6. doença do enxerto versus-hospedeiro;
7. doença de IgG4.

Anexo C - Critérios diagnósticos da Síndrome de Sjögren segundo American College of Rheumatology - ACR - e European League Against Rheumatism – EULAR (Shiboski *et al.*, 2017).

A classificação de SSp aplica-se a qualquer indivíduo que atenda os critérios de inclusão*, e não tenha nenhuma das condições listadas como critérios de exclusão†, e tenha um escore ≥ 4 quando os pesos dos cinco itens dos critérios abaixo são somados:

Critérios de classificação da SSp de acordo com American College of Rheumatology - ACR - e European League Against Rheumatism – EULAR	
Ítem	Peso/Escore
Glândula salivar labial com sialadenite linfocítica focal e escore focal ≥ 1 focos/4mm ² ±	3
Anti-SSA/Ro-positivo	3
Escore coloração ocular ≥ 5 (ou escore de van Bijsterveld ≥ 4) em pelo menos um olho ¥	1
Teste de Schirmer ≤ 5 mm/5 min. em pelo menos um olho	1
Taxa do fluxo salivar total não estimulado $\leq 0,1$ ml/min	1

* Os critérios de inclusão são aplicados a qualquer paciente com pelo menos um sintoma de secura ocular ou oral, definida como resposta positiva a pelo menos uma destas questões: (1) Você teve sensação de olhos secos diariamente e de forma persistente por mais de três meses? (2) Você tem sensação recorrente de areia nos olhos? (3) Você usa lágrima artificial mais de três vezes por dia? (4) Você teve diariamente uma sensação de boca seca por mais de três meses? (5) Você bebe frequentemente líquidos para ajudar na deglutição de alimentos secos?

* Os critérios de exclusão incluem o diagnóstico prévio de qualquer uma das seguintes condições, o que excluiria o diagnóstico de SSp e participação nos estudos dessa doença ou em ensaios clínicos terapêuticos por causa de características clínicas que se sobrepõem ou interferência nos testes dos critérios: (1) história de radioterapia na cabeça e pescoço, (2) infecção por hepatite C ativa (confirmada por PCR), (3) AIDS, (4) sarcoidose, (5) amiloidose, (6) doença enxerto versus hospedeiro; (7) doença relacionada ao IgG4.

‡ O exame histopatológico deve ser realizado por um patologista experiente no diagnóstico de sialadenite linfocítica focal e em contagem de focos, usando o protocolo descrito por Daniels *et al.*, 2011.

¥ Pacientes que habitualmente usam medicamentos anticolinérgicos devem ser avaliados quanto aos sinais objetivos de hipofunção salivar e secura ocular após o intervalo de tempo suficiente sem essas medicações para que esses componentes sejam uma medida válida da secura oral e ocular.

Anexo D - ESSDAI: EULAR Sjögren's Syndrome Disease Activity Index

Data: ...../...../..... Nome: ..... RG: .....

ESSDAI (EULAR Sjögren's Syndrome Disease Activity Index)

Domínio Constitucional [Não avaliar sintomas não relacionados à doença, como febre de origem infecciosa, perda voluntária de peso.]		
Nenhuma Atividade	Ausência dos seguintes sintomas	0
Baixa Atividade	Febre moderada ou intermitente (37,5 - 38,5°C) / suores noturnos Perda de peso involuntária de 5 a 10% do peso corporal	1
Moderada Atividade	Febre alta (> 38,5°C) / suores noturnos Perda de peso involuntária de > 10% do peso corporal	2

Domínio de Linfadenopatia		
Nenhuma Atividade	Ausência das seguintes características	0
Baixa Atividade	Linfadenomegalia ≥ 1 cm em qualquer região ou ≥ 2 cm na região inguinal	1
Moderada Atividade	Linfadenomegalia ≥ 2 cm em qualquer região ou ≥ 3 cm em região inguinal ou esplenomegalia (cl clinicamente palpável ou avaliada por exame de imagem)	2
Alta Atividade	Doença proliferativa maligna das células B recente	3

Domínio Glandular [Não avaliar aumento do volume glandular não relacionado à doença, tais como litíase ou infecção.]		
Nenhuma Atividade	Ausência de aumento glandular	0
Baixa Atividade	Pequeno aumento glandular com: parótida aumentada (≤ 3 cm) ou aumento discreto submandibular ou lacrimal ¹	1
Moderada Atividade	Aumento glandular maior com: parótida aumentada (> 3 cm) ou aumento importante submandibular ou lacrimal ¹	2

¹A distinção entre aumento discreto ou importante do volume glandular submandibular ou lacrimal fica a critério médico.

Domínio Articular [Não avaliar envolvimento articular não relacionado à doença, como a osteoartrite.]		
Nenhuma Atividade	Ausência de envolvimento articular ativo no momento	0
Baixa Atividade	Artralgias nas mãos, punhos, tornozelos e pés acompanhados por rigidez matinal (> 30 min)	1
Moderada Atividade	1 a 5 sinovites dentre as 28 ²	2
Alta Atividade	≥ 6 sinovites dentre as 28 ²	3

²As 28 articulações incluídas no cálculo do DAS28 (Disease Activity Score 28) são ombros, cotovelos, punhos, metacarpofalangeanas, interfalangeanas proximais e joelhos.

Domínio Cutâneo [Avaliar como "Nenhuma atividade" lesões antigas e estáveis mais relacionadas ao dano (sequela) do que à atividade da doença ou envolvimento cutâneo não relacionado à doença.]		
Nenhuma Atividade	Ausência de envolvimento cutâneo ativo no momento	0
Baixa Atividade	Eritema multiforme	1
Moderada Atividade	Vasculite cutânea limitada, incluindo vasculite urticariforme ³ , ou púrpura limitada aos pés e tornozelos ou lúpus cutâneo subagudo	2
Alta Atividade	Vasculite cutânea difusa, incluindo vasculite urticariforme ³ , ou púrpura difusa ou úlceras relacionadas à vasculite	3

³Vasculite cutânea limitada envolve < 18% da área de superfície corporal; vasculite cutânea difusa envolve > 18% da área de superfície corporal. Área de superfície corporal (ASC) é definida utilizando a regra dos nove (usado para avaliar a extensão de queimaduras): palma (excluindo os dedos)= 1% ASC; cada membro inferior= 18% ASC; cada membro superior= 9% ACS; tronco (frontal)= 18% ASC; tronco (dorsal)= 18% ASC.

Domínio Respiratório [Avaliar como "Nenhuma atividade" lesões antigas e estáveis mais relacionadas ao dano (sequela) do que à atividade da doença ou envolvimento respiratório não relacionado à doença (ex. cigarro).]		
Nenhuma Atividade	Ausência de envolvimento pulmonar ativo no momento	0
Baixa Atividade	Tosse persistente ou envolvimento brônquico sem nenhuma alteração ao raio X Ou evidência de doença pulmonar intersticial ao RX simples ou TCAR, com: nenhuma dispneia prova de função pulmonar normal	1
Moderada Atividade	Envolvimento pulmonar moderadamente ativo, tal como doença pulmonar intersticial diagnosticada por TCAR com: dispneia aos grandes esforços (NHYA II) ou prova de função pulmonar alterada dentro dos seguintes parâmetros: 70% > DLCO ≥ 40% e/ou 80% > CVF ≥ 60%	2
Alta Atividade	Envolvimento pulmonar altamente ativo como doença pulmonar intersticial diagnosticada por TCAR com: dispneia aos pequenos esforços ou ao repouso (NHYA III, IV) ou prova de função pulmonar alterada: DLCO < 40% e/ou CVF < 60%	3

Para o diagnóstico da doença pulmonar intersticial, a TCAR (tomografia computadorizada de alta resolução) ou radiografia simples são necessárias e devem ter sido realizadas nos últimos dois anos.

NHYA (classificação funcional da *New York Heart Association*); DLCO (prova de difusão de dióxido de carbono); CVF (capacidade vital forçada).

Domínio Renal [Avaliar como "Nenhuma atividade" lesões antigas e estáveis mais relacionadas ao dano (sequela) do que à atividade da doença e envolvimento renal não relacionado à doença. Se a biópsia for feita, classificar a atividade baseada primeiramente nas características histológicas.]		
Nenhuma Atividade	Ausência de envolvimento renal ativo no momento: - proteinúria < 0,5 g/dL, nenhuma hematuria, nenhuma leucocitúria, nenhuma acidose, proteinúria estável de longa duração devido ao dano/sequela	0
Baixa Atividade	Evidência de envolvimento específico da atividade renal limitada a: acidose tubular sem insuficiência renal envolvimento glomerular - com proteinúria (entre 0,5 e 1 g/dL) - sem hematuria ou insuficiência renal (TGF ≥ 60 mL/min)	1
Moderada Atividade	Moderada atividade renal: acidose tubular com insuficiência renal (TGF < 60 mL/min) envolvimento glomerular - com proteinúria entre 1 e 1,5 g/dL - sem hematuria ou insuficiência renal (TGF ≥ 60 mL/min) ou evidência histológica - glomerulonefrite - infiltração intersticial linfóide importante	2
Alta Atividade	Alta atividade renal: envolvimento glomerular - com proteinúria > 1,5 g/dL - ou hematuria - ou insuficiência renal (TGF < 60 mL/min) - ou evidência histológica de glomerulonefrite proliferativa crioglobulinemia relacionada ao envolvimento renal	3

TGF- taxa de filtração glomerular calculada com a fórmula MDRD (*Modification of Diet in Renal Disease*).

Domínio Muscular [Não avaliar envolvimento muscular não relacionado à doença, tal como fraqueza devido a corticosteroides.]		
Nenhuma Atividade	Ausência de envolvimento muscular ativo no momento	0
Baixa Atividade	Miosite levemente ativa diagnosticada pela EMG ou biópsia com: ausência de fraqueza e creatinoquinase alterada ($N^* < CK \leq 2N$)	1
Moderada Atividade	Miosite moderadamente ativa diagnosticada pela EMG ou biópsia com: fraqueza (déficit máximo de 4/5); ou creatinoquinase elevada ($2N < CK \leq 4N$)	2
Alta atividade	Miosite altamente ativa diagnosticada pela EMG ou biópsia com: fraqueza (déficit $\leq 3/5$) ou creatinoquinase elevada ($> 4N$)	3

*N= normal (valor de referência); EMG= eletromiografia.

Domínio do Sistema Nervoso Periférico [Avaliar como "Nenhuma atividade" lesões antigas e estáveis mais relacionadas ao dano (sequela) do que à atividade ou envolvimento do sistema nervoso periférico não relacionado à doença.]		
Nenhuma Atividade	Ausência de envolvimento ativo do sistema nervoso periférico no momento	0
Baixa Atividade	Evidência de envolvimento ativo do sistema nervoso periférico, como: - polineuropatia periférica axonal diagnosticada pelo ECN/ ENMG - neuralgia do trigêmeo (V nervo craniano)	1

Moderada Atividade	Evidência de envolvimento moderadamente ativo do sistema nervoso periférico, como: - neuropatia axonal motora e sensorial diagnosticada pelo ECN/ ENMG, sem déficit motor - neuropatia sensorial pura com a presença de vasculite crioglobulinêmica - gangliopatia ⁴ com sintomas restritos à ataxia moderada - polineuropatia inflamatória desmielinizante crônica (CIDP) ⁵ com deficiência funcional moderada (sem déficit motor ou ataxia) - envolvimento do nervo craniano de origem periférica (exceto trigêmio- V)	2
Alta Atividade	Evidência de envolvimento altamente ativo do sistema nervoso periférico, como: - neuropatia axonal motora e sensorial diagnosticada pela ECN/ ENMG com déficit motor $\leq 3/5$ - envolvimento do nervo periférico atribuído à vasculite (mononeurite múltipla) - ataxia severa atribuída à gangliopatia ⁴ - polineuropatia inflamatória desmielinizante crônica (CIDP) ⁵ com deficiência funcional severa: déficit motor $\leq 3/5$ ou ataxia severa	3

⁴Deficiência sensorial pura com ataxia e deficiência difusa ou abolição do potencial sensitivo no ECN (estudo da condução nervosa).

⁵Poliradiculoneuropatia com sintomas clínicos sugestivos (déficit sensoriomotor dos 4 membros, déficit motor proximal, arreflexia generalizada, sintomas sensoriais iniciais afetando membros superiores e/ou associado a envolvimento do nervo craniano), nível de proteína aumentado e/ou ECN anormal (latência distal motora prolongada, velocidade da condução nervosa reduzida, latência prolongada da onda F, bloqueio da condução e/ou dispersão temporal).

Domínio do Sistema Nervoso Central [Avaliar como "Nenhuma atividade" lesões antigas e estáveis mais relacionadas ao dano (sequela) do que à atividade da doença ou envolvimento do sistema nervoso central não relacionado à doença.]		
Nenhuma Atividade	Ausência de envolvimento do SNC ativo no momento	0
Moderada Atividade	Manifestações clínicas moderadamente ativas do SNC, como: - envolvimento de nervo craniano de origem central - neurite óptica - síndrome semelhante à esclerose múltipla com sintomas restritos à deficiência sensorial pura ou deficiência cognitiva comprovada	1
Alta Atividade	Manifestações clínicas altamente ativas do SNC, como: - vasculite cerebral com acidente vascular cerebral ou ataque isquêmico transitório - convulsões - mielite transversa - meningite linfocítica - síndrome semelhante à esclerose múltipla com déficit motor	2

Domínio Hematológico [Somente as citopenias autoimunes devem ser consideradas. Não avaliar citopenia que não esteja relacionada à doença, tal como deficiência de vitamina ou ferro, citopenia induzida por droga.]		
Nenhuma Atividade	Ausência de citopenia autoimune	0
Baixa Atividade	Citopenia de origem autoimune com: - neutropenia ⁶ ($1000 < \text{neutrófilos} < 1500/\text{mm}^3$) - ou anemia ⁷ ($10 < \text{Hb} < 12 \text{ g/dL}$) - ou trombocitopenia ⁸ ($100.000 < \text{plaquetas} < 150.000/\text{mm}^3$) - ou linfopenia ($500 < \text{linfócitos} < 1000/\text{mm}^3$)	1
Moderada Atividade	Citopenia de origem autoimune com: - neutropenia ⁶ ($500 \leq \text{neutrófilos} \leq 1000/\text{mm}^3$) - ou anemia ⁷ ($8 \leq \text{Hb} \leq 10 \text{ g/dL}$) - ou trombocitopenia ⁸ ($50.000 \leq \text{plaquetas} \leq 100.000/\text{mm}^3$) - ou linfopenia ($\leq 500/\text{mm}^3$)	2
Alta Atividade	Citopenia de origem autoimune com: - neutropenia ⁶ (neutrófilos $< 500/\text{mm}^3$) - ou anemia ⁷ ($\text{Hb} < 8 \text{ g/dL}$) - ou trombocitopenia ⁸ (plaquetas $< 50.000/\text{mm}^3$)	3

⁶Neutropenia sem nenhuma etiologia conhecida.

⁷Anemia com o teste de Coombs positivo e aumento na contagem de reticulócitos.

⁸Trombocitopenia de origem periférica com nenhuma outra etiologia encontrada, ou em caso de dificuldades para realização de identificação de autoanticorpos anti-plaquetas e/ou a presença de megacariócitos de aspirado de medula óssea e/ou anemia autoimune associada.

Domínio Biológico		
Nenhuma Atividade	Ausência de qualquer uma das seguintes alterações	0
Baixa Atividade	- pico clonal - ou hipocomplementemia- C4 ou C3 baixos ou CH50 - ou hipergamaglobulinemia ou nível de IgG entre 16 e 20 g/L	1
Moderada Atividade	- presença de crioglobulinemia - ou hipergamaglobulinemia ou nível alto de IgG $> 20 \text{ g/L}$ - ou início recente de ⁹ hipergamaglobulinemia ou diminuição recente de nível de IgG ($< 5 \text{ g/L}$)	2

⁹Nos últimos 6 meses.

Anexo E - Critérios para laudo padrão do Laboratório de Dermatopatologia do HC-FMUSP

1- LOCALIZAÇÃO DA BIOPSIA   a) Mucosa de lábio inferior   b) Outras
2- NÚMERO DE LÓBULOS REPRESENTADOS   n=_____
3- PARÊNQUIMA GLANDULAR   A) <i>Atrofia acinar</i>   a) Leve   b) Moderada   c) Intensa   d) Ausente   e) Outros
B) <i>Metaplasia acinar serosa</i>   a) Presente   b) Não detectada   c) Outras
C) <i>Fibrose acinar</i>   a) Não detectada   b) Localizada   c) Generalizada
D) <i>Presença de tecido adiposo</i>   a) Localizada   b) Generalizada   c) Não detectada   d) Outros
E) <i>Ductos excretores</i>   a) Preservados   b) Alterados com metaplasia oncocítica   c) Alterados com metaplasia escamosa   d) Alterados com ectasia   e) Alterações inflamatórias do epitélio ductal (focos de linfócitos)   f) Alterados com hialinização da membrana basal/fibroplasia periductal

g) Alterado com atrofia h) Outros
<i>F) Estroma glandular</i> a) Preservado b) Alterado c) Outros
<i>G) Infiltrado inflamatório intersticial</i> a) Não detectado b) Presente leve c) Presente focal d) Presente moderado e) Presente generalizado f) Presente intenso
<i>H) Composição do infiltrado inflamatório</i> a) Linfócitos b) Plasmócitos c) Histiócitos d) Macrófagos e) Neutrófilos f) Eosinófilos g) Não se aplica h) Outros
4-CONCLUSÃO

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Abbas Ak, Lichtman AH; Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. 8ªed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2015.

Abe T, Nakajima A, Matsunaga M, Sakuragi S, Komatsu M. Decreased tear lactoferrin concentration in patients with chronic hepatitis C. *Br J Ophthalmol*. 1999;83(6):684-7.

Adamson TC, 3rd, Fox RI, Frisman DM, Howell FV. Immunohistologic analysis of lymphoid infiltrates in primary Sjogren's syndrome using monoclonal antibodies. *J Immunol*. 1983;130(1):203-8.

Ainola M, Porola P, Takakubo Y, Przybyla B, Kouri VP, Tolvanen TA, Hanninen A, Nordstrom DC. Activation of plasmacytoid dendritic cells by apoptotic particles - mechanism for the loss of immunological tolerance in Sjogren's syndrome. *Clin Exp Immunol*. 2018;191(3):301-10.

Alibaud L, Llobera R, Al Saati T, March M, Delsol G, Rubin B. A new monoclonal anti-CD3epsilon antibody reactive on paraffin sections. *J Histochem Cytochem*. 2000;48(12):1609-16.

Al-Maini MH, Mountz JD, Al-Mohri HA, El-Ageb EM, Al-Riyami BM, Svenson KL, Zhou T, Richens ER. Serum levels of soluble Fas correlate with indices of organ damage in systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2000;9(2):132-9.

Alunno A, Carubbi F, Giacomelli R, Gerli R. The challenge to interpret conflicting results and the need of a univocal definition for germinal centres in primary Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis*. 2018;77(6):e31.

Aqrabi LA, Jensen JL, Oijordsbakken G, Ruus AK, Nygard S, Holden M, Jonsson R, Galtung HK, Skarstein K. Signalling pathways identified in salivary glands from primary Sjogren's syndrome patients reveal enhanced adipose tissue development. *Autoimmunity*. 2018;51(3):135-46.

Aragona P, Magazzu G, Macchia G, Bartolone S, Di Pasquale G, Vitali C, Ferreri G. Presence of antibodies against *Helicobacter pylori* and its heat-shock protein 60 in the serum of patients with Sjogren's syndrome. *J Rheumatol*. 1999;26(6):1306-11.

Asam S, Neag G, Berardicurti O, Gardner D, Barone F. The role of stroma and epithelial cells in primary Sjogren's syndrome. *Rheumatology (Oxford)*. 2019.

Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:767-811.

Barr JY, Wang X, Meyerholz DK, Lieberman SM. CD8 T cells contribute to lacrimal gland pathology in the nonobese diabetic mouse model of Sjogren syndrome. *Immunol Cell Biol*. 2017;95(8):684-94.

Barrera MJ, Bahamondes V, Sepulveda D, Quest AF, Castro I, Cortes J, Aguilera S, Urzua U, Molina C, Perez P, Ewert P, Alliende C, Hermoso MA, Gonzalez S, Leyton C, Gonzalez MJ. Sjogren's syndrome and the epithelial target: a comprehensive review. *J Autoimmun*. 2013;42:7-18.

Bertorello R, Cordone MP, Contini P, Rossi P, Indiveri F, Puppo F, Cordone G. Increased levels of interleukin-10 in saliva of Sjogren's syndrome patients. Correlation with disease activity. *Clin Exp Med*. 2004;4(3):148-51.

Birkenbach M, Tong X, Bradbury LE, Tedder TF, Kieff E. Characterization of an Epstein-Barr virus receptor on human epithelial cells. *J Exp Med*. 1992;176(5):1405-14.

Bohnsack JF, Cooper NR. CR2 ligands modulate human B cell activation. *J Immunol*. 1988;141(8):2569-76.

Bowman S. Sjögren syndrome. *Other Autoimmune Disorders*. 2009;38(2):105-8.

Bowman SJ, Ibrahim GH, Holmes G, Hamburger J, Ainsworth JR. Estimating the prevalence among Caucasian women of primary Sjogren's syndrome in two general practices in Birmingham, UK. *Scand J Rheumatol*. 2004;33(1):39-43.

Bowman SJ, Pillemer S, Jonsson R, Asmussen K, Vitali C, Manthorpe R, Sutcliffe N, Contributors to and participants at the workshop. Revisiting Sjögren's syndrome in the new millenium: perspectives on assessment and outcome measures. Report of a workshop held on 23 March 2000 at Oxford, UK. *Rheumatology (Oxford)* 2001; 40: 1180-88.

Brkic Z, Maria NI, van Helden-Meeuwsen CG, van de Merwe JP, van Daele PL, Dalm VA, Wildenberg ME, Beumer W, Drexhage HA, Versnel MA. Prevalence of interferon type I signature in CD14 monocytes of patients with Sjogren's syndrome and association with disease activity and BAFF gene expression. *Ann Rheum Dis*. 2013;72(5):728-35.

Brookes SM, Cohen SB, Price EJ, Webb LM, Feldmann M, Maini RN, Venables PJ. T cell clones from a Sjogren's syndrome salivary gland biopsy produce high levels of IL-10. *Clin Exp Immunol*. 1996;103(2):268-72.

Carlson GW. The salivary glands. Embryology, anatomy, and surgical applications. *Surg Clin North Am*. 2000;80(1):261-73.

Celenligil H, Kansu E, Ruacan S, Eratalay K, Irkec M. Characterization of peripheral blood and salivary gland lymphocytes in Sjogren's syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1990;69(5):572-7.

Chisholm DM, Mason DK. Labial salivary gland biopsy in Sjogren's disease. *J Clin Pathol*. 1968;21(5):656-60.

Christodoulou MI, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM. Characteristics of the minor salivary gland infiltrates in Sjogren's syndrome. *J Autoimmun*. 2010;34(4):400-7.

Clevers H, Alarcon B, Wileman T, Terhorst C. The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Annu Rev Immunol*. 1988, 6:629-62.

Cornec D, Saraux A, Cochener B, Pers JO, Jousse-Joulin S, Renaudineau Y, Marhadour T, Devauchelle-Pensec V. Level of agreement between 2002 American-European Consensus Group and 2012 American College of Rheumatology classification criteria for Sjogren's syndrome and reasons for discrepancies. *Arthritis Res Ther*. 2014, 16(2):R74.

Corsiero E, Nerviani A, Bombardieri M, Pitzalis C. Powerhouse of Autoimmunity. *Front Immunol*. 2016 Oct 17(7):430.

Croia C, Astorri E, Murray-Brown W, Willis A, Brokstad KA, Sutcliffe N, Piper K, Jonsson R, Tappuni AR, Pitzalis C, Bombardieri M. Implication of Epstein-Barr virus infection in disease-specific autoreactive B cell activation in ectopic lymphoid structures of Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheumatol*. 2014;66(9):2545-57.

Daniels TE, Cox D, Shiboski CH, Schiodt M, Wu A, Lanfranchi H, Umehara H, Zhao Y, Challacombe S, Lam MY, De Souza Y, Schiodt J, Holm H, Bisio PA, Gandolfo MS, Sawaki T, Li M, Zhang W, Varghese-Jacob B, Ibsen P, Keszler A, Kurose N, Nojima T, Odell E, Criswell LA, Jordan R, Greenspan JS, Sjogren's International Collaborative Clinical Alliance Research G. Associations between salivary gland histopathologic diagnoses and phenotypic features of Sjogren's syndrome among 1,726 registry participants. *Arthritis Rheum*. 2011;63(7):2021-30.

Dauphinee MJ, Tovar Z, Ballester A, Talal N. The expression and function of CD3 and CD5 in patients with primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum*. 1989;32(4):420-9.

Delaleu N, Jonsson MV, Appel S, Jonsson R. New concepts in the pathogenesis of Sjogren's syndrome. *Rheum Dis Clin North Am*. 2008;34(4):833-45, vii.

Delporte C. Role of aquaporins in saliva secretion. *OA Biochemistry*. 2013;1(2):14.

Devine L, Kavathas PB. Molecular analysis of protein interactions mediating the function of the cell surface protein CD8. *Immunol Res*. 1999;19(2-3):201-10.

Dinescu SC, ForTofoiu MC, Bumbea AM, Ciurea PL, Busuioc CJ, Musetescu AE. Histopathological and immunohistochemical profile in primary Sjogren's syndrome. *Rom J Morphol Embryol*. 2017;58(2):409-17.

Dzionic A, Fuchs A, Schmidt P, Cremer S, Zysk M, Miltenyi S, Buck DW, Schmitz J. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol*. 2000;165(11):6037-46.

Elkon KB, Gharavi AE, Patel BM, Hughes GR, Frankel A. IgA and IgM rheumatoid factors in serum, saliva and other secretions: relationship to immunoglobulin ratios in systemic sicca syndrome and rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol*. 1983;52(1):75-84.

Farias DS, Pasqualucci CA, Nishizawa A, Silva LF, Campos FM, Silva KC, Cuelho A, Leite RE, Ferretti-Rebustini R, Grinberg LT, Farfel JM, Jacob-Filho W, Suemoto CK. Abstract 14851: Inflammation in the perivascular adipose tissue is associated with coronary artery disease: an autopsy study. *Circulation*. 2015; 132 (Suppl 3).

Fox PC, Brennan M, Di Sun P. Cytokine expression in human labial minor salivary gland epithelial cells in health and disease. *Arch Oral Biol*. 1999;44 Suppl 1:S49-52.

Fox RI. Sjogren's syndrome. *Lancet*. 2005;366(9482):321-31.

Fox RI, Carstens SA, Fong S, Robinson CA, Howell F, Vaughan JH. Use of monoclonal antibodies to analyze peripheral blood and salivary gland lymphocyte subsets in Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum*. 1982;25(4):419-26.

Fragoulis GE, Zampeli E, Moutsopoulos HM. IgG4-related sialadenitis and Sjogren's syndrome. *Oral Dis*. 2017;23(2):152-6.

Gao GF, Jakobsen BK. Molecular interactions of coreceptor CD8 and MHC class I: the molecular basis for functional coordination with the T-cell receptor. *Immunol Today*. 2000;21(12):630-6.

Garcia-Carrasco M, Ramos-Casals M, Rosas J, Pallares L, Calvo-Alen J, Cervera R, Font J, Ingelmo M. Primary Sjogren syndrome: clinical and immunologic disease patterns in a cohort of 400 patients. *Medicine (Baltimore)*. 2002;81(4):270-80.

Garcic-Carrasco M, Font J, Filella X, Cervera R, Ramos-Casals M, Siso A, Aymami A, Ballesta AM, Ingelmo M. Circulating levels of Th1/Th2 cytokines in patients with primary Sjogren's syndrome: correlation with clinical and immunological features. *Clin Exp Rheumatol*. 2001;19(4):411-5.

Giannouli S, Voulgarelis M. Predicting progression to lymphoma in Sjogren's syndrome patients. *Expert Rev Clin Immunol*. 2014;10(4):501-12.

Gonzalez SF, Degn SE, Pitcher LA, Woodruff M, Heesters BA, Carroll MC. Trafficking of B cell antigen in lymph nodes. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:215-33.

Goules AV, Kapsogeorgou EK, Tzioufas AG. Insight into pathogenesis of Sjogren's syndrome: Dissection on autoimmune infiltrates and epithelial cells. *Clin Immunol*. 2017;182:30-40.

Goules AV, Tzioufas AG. Lymphomagenesis in Sjogren's syndrome: Predictive biomarkers towards precision medicine. *Autoimmun Rev*. 2019;18(2):137-43.

Greabu M, Battino M, Mohora M, Totan A, Didilescu A, Spinu T, Totan C, Miricescu D, Radulescu R. Saliva--a diagnostic window to the body, both in health and in disease. *J Med Life*. 2009;2(2):124-32.

Greenspan JS, Daniels TE, Talal N, Sylvester RA. The histopathology of Sjogren's syndrome in labial salivary gland biopsies. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1974;37(2):217-29.

Guellec D, Cornec D, Jousse-Joulin S, Marhadour T, Marcorelles P, Pers JO, Saraux A, Devauchelle-Pensec V. Diagnostic value of labial minor salivary gland biopsy for Sjogren's syndrome: a systematic review. *Autoimmun Rev*. 2013;12(3):416-20.

Guobis Z, Baseviciene N, Paipaliene P, Niedzelskiene I, Januseviciute G. Aspects of xerostomia prevalence and treatment among rheumatic inpatients. *Medicina (Kaunas)*. 2008;44(12):960-8.

Haacke EA, van der Vegt B, Vissink A, Spijkervet FKL, Bootsma H, Kroese FGM. Germinal centres in diagnostic labial gland biopsies of patients with primary Sjogren's syndrome are not predictive for parotid MALT lymphoma development. *Ann Rheum Dis*. 2017;76(10):1781-4.

Haacke EA, van der Vegt B, Vissink A, Spijkervet FKL, Bootsma H, Kroese FGM. Standardisation of the detection of germinal centres in salivary gland biopsies of patients with primary Sjogren's syndrome is needed to assess their clinical relevance. *Ann Rheum Dis*. 2018;77(6):e32.

Hamza N, Bos NA, Kallenberg CG. B-cell populations and sub-populations in Sjogren's syndrome. *Presse Med.* 2012;41(9 Pt 2):e475-83.

Haniffa M, Shin A, Bigley V, McGovern N, Teo P, See P, Wasan PS, Wang XN, Malinarich F, Malleret B, Larbi A, Tan P, Zhao H, Poidinger M, Pagan S, Cookson S, Dickinson R, Dimmick I, Jarrett RF, Renia L, Tam J, Song C, Connolly J, Chan JK, Gehring A, Bertoletti A, Collin M, Ginhoux F. Human tissues contain CD141hi cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103+ nonlymphoid dendritic cells. *Immunity.* 2012;37(1):60-73.

Harley JB, Alexander EL, Bias WB, Fox OF, Provost TT, Reichlin M, Yamagata H, Arnett FC. Anti-Ro (SS-A) and anti-La (SS-B) in patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 1986;29(2):196-206.

Harley JB, Harley IT, Guthridge JM, James JA. The curiously suspicious: a role for Epstein-Barr virus in lupus. *Lupus.* 2006;15(11):768-77.

Hayashi Y, Arakaki R, Ishimaru N. Apoptosis and estrogen deficiency in primary Sjogren syndrome. *Curr Opin Rheumatol.* 2004;16(5):522-6.

He J, Jin Y, Zhang X, Zhou Y, Li R, Dai Y, Sun X, Zhao J, Guo J, Li Z. Characteristics of germinal center-like structures in patients with Sjogren's syndrome. *Int J Rheum Dis.* 2017;20(2):245-51.

Hillen MR, Ververs FA, Kruize AA, Van Roon JA. Dendritic cells, T-cells and epithelial cells: a crucial interplay in immunopathology of primary Sjogren's syndrome. *Expert Rev Clin Immunol.* 2014;10(4):521-31.

Hochberg MC. Síndrome de Sjögren. In: Goldman L, Bennet JC. *Cecil Tratado de Medicina Interna*. 21ªed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2001. p.1696-1968.

Holmberg KV, Hoffman MP. Anatomy, biogenesis and regeneration of salivary glands. *Monogr Oral Sci.* 2014;24:1-13.

Holness CL, Simmons DL. Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood.* 1993;81(6):1607-13.

Hovav AH. Dendritic cells of the oral mucosa. *Mucosal Immunol.* 2014;7(1):27-37.

Hunger RE, Sieling PA, Ochoa MT, Sugaya M, Burdick AE, Rea TH, Brennan PJ, Belisle JT, Blauvelt A, Porcelli SA, Modlin RL. Langerhans cells utilize CD1a and langerin to efficiently present nonpeptide antigens to T cells. *J Clin Invest.* 2004;113(5):701-8.

Iltanen S, Collin P, Korpela M, Holm K, Partanen J, Polvi A, Maki M. Celiac disease and markers of celiac disease latency in patients with primary Sjogren's syndrome. *Am J Gastroenterol*. 1999;94(4):1042-6.

Isobe M, Huebner K, Maddon PJ, Littman DR, Axel R, Croce CM. The gene encoding the T-cell surface protein T4 is located on human chromosome 12. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(12):4399-402.

Jardin F, Ruminy P, Bastard C, Tilly H. The BCL6 proto-oncogene: a leading role during germinal center development and lymphomagenesis. *Pathol Biol*. 2007;55(1):73-83.

Jimbow KJ, Sato S, Kukita A. Langerhans' cells of the normal human pilosebaceous system. *J Invest Dermatol*. 1969;52(2):177-80.

Jimenez F, Aiba-Masago S, Al Hashimi I, Vela-Roch N, Fernandes G, Yeh CK, Talal N, Dang H. Activated caspase 3 and cleaved poly(ADP-ribose)polymerase in salivary epithelium suggest a pathogenetic mechanism for Sjogren's syndrome. *Rheumatology (Oxford)*. 2002;41(3):338-42.

Johnsen SJ, Berget E, Jonsson MV, Helgeland L, Omdal R, Jonsson R. Evaluation of germinal center-like structures and B cell clonality in patients with primary Sjogren syndrome with and without lymphoma. *J Rheumatol*. 2014;41(11):2214-22.

Jonsson MV, Skarstein K. Follicular dendritic cells confirm lymphoid organization in the minor salivary glands of primary Sjogren's syndrome. *J Oral Pathol Med*. 2008;37(9):515-21.

Jonsson MV, Theander E, Jonsson R. Predictors for the development of non-Hodgkin lymphoma in primary Sjogren's syndrome. *Presse Med*. 2012;41(9 Pt 2):e511-6.

Jonsson R, Vogelsang P, Volchenkov R, Espinosa A, Wahren-Herlenius M, Appel S. The complexity of Sjogren's syndrome: novel aspects on pathogenesis. *Immunol Lett*. 2011;141(1):1-9.

Kapsogeorgou EK, Christodoulou MI, Panagiotakos DB, Paikos S, Tassidou A, Tzioufas AG, Moutsopoulos HM. Minor salivary gland inflammatory lesions in Sjogren syndrome: do they evolve? *J Rheumatol*. 2013;40(9):1566-71.

Kassan SS e Moutsopoulos HM. Clinical manifestations and early diagnosis of Sjogren Syndrome. *Arch Intern Med*. 2004;164(12): 1275-84.

Kassan SS, Thomas TL, Moutsopoulos HM, Hoover R, Kimberly RP, Budman DR, Costa J, Decker JL, Chused TM. Increased risk of lymphoma in sicca syndrome. *Ann Intern Med*. 1978;89(6):888-92.

Katchburian E, Arana V. *Histologia e embriologia oral: texto, atlas, correlações clínicas*. 3a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2014.

Katsifis GE, Moutsopoulos NM, Wahl SM. T lymphocytes in Sjogren's syndrome: contributors to and regulators of pathophysiology. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2007;32(3):252-64.

Kavurma MM, Rayner KJ, Karunakaran D. The walking dead: macrophage inflammation and death in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 2017;28(2):91-98.

Kizu Y, Sakurai H, Katagiri S, Shinozaki N, Ono M, Tsubota K, Saito J. Immunohistological analysis of tumour growth factor beta 1 expression in normal and inflamed salivary glands. *J Clin Pathol*. 1996;49(9):728-32.

Kong L, Ogawa N, McGuff HS, Nakabayashi T, Sakata KM, Masago R, Vela-Roch N, Talal N, Dang H. Bcl-2 family expression in salivary glands from patients with primary Sjogren's syndrome: involvement of Bax in salivary gland destruction. *Clin Immunol Immunopathol*. 1998;88(2):133-41.

Kosugi H, Nakagawa Y, Hotta T, Saito H, Miyajima A, Arai K, Yokota T. Structure of the gene encoding the alpha subunit of the human interleukin 3 receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;208(1):360-7.

Krenacs L, Tiszalvicz L, Krenacs T, Boumsell L. Immunohistochemical detection of CD1A antigen in formalin-fixed and paraffin-embedded tissue sections with monoclonal antibody 010. *J Pathol*. 1993;171(2):99-104.

Kuhtreiber WM, Hayashi T, Dale EA, Faustman DL. Central role of defective apoptosis in autoimmunity. *J Mol Endocrinol*. 2003;31(3):373-99.

Kurushima H, Ramprasad M, Kondratenko N, Foster DM, Quehenberger O, Steinberg D. Surface expression and rapid internalization of macrosialin (mouse CD68) on elicited mouse peritoneal macrophages. *J Leukoc Biol*. 2000;67(1):104-8.

Lanier LL, Chang C, Spits H, Phillips JH. Expression of cytoplasmic CD3 epsilon proteins in activated human adult natural killer (NK) cells and CD3 gamma, delta, epsilon complexes in fetal NK cells. Implications for the relationship of NK and T lymphocytes. *J Immunol*. 1992;149(6):1876-80.

Layre E, Jong A, Moody DB. Human T cells use CD1 and MR1 to recognize lipids and small molecules. *Curr Opin Chem Biol*. 2014;23:31-8.

Lazarus MN, Isenberg DA. Development of additional autoimmune diseases in a population of patients with primary Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis*. 2005;64(7):1062-4.

Lee KE, Kang JH, Yim YR, Kim JE, Lee JW, Wen L, Park DJ, Kim TJ, Park YW, Yoon KC, Lee JS, Lee SS. The Significance of Ectopic Germinal Centers in the Minor Salivary Gland of Patients with Sjogren's Syndrome. *J Korean Med Sci*. 2016;31(2):190-5.

Léveillé C, AL-Daccak R, Mourad W. CD20 is physically and functionally coupled to MHC class II and CD40 on human B cell lines. *Eur J Immunol*. 1999;29(1):65-74.

Liu M, Wu X, Liu X, He J, Su Y, Guo J, Li Z. Contribution of dendritic cell immunoreceptor (DCIR) polymorphisms in susceptibility of systemic lupus erythematosus and primary Sjogren's syndrome. *Hum Immunol*. 2015;76(11):808-11.

Liu YJ, Xu J, de Bouteiller O, Parham CL, Grouard G, Djossou O, de Saint-Vis B, Lebecque S, Banchereau J, Moore KW. Follicular dendritic cells specifically express the long CR2/CD21 isoform. *J Exp Med*. 1997;185(1):165-70.

Lucchesi D, Pitzalis C, Bombardieri M. EBV and other viroses as triggers of tertiary lymphoid structures in primary Sjogren's syndrome. *Expert Rev Clin Immunol*. 2014;10(4):455-55.

Madeira MC. *Anatomia da face: bases anatomofuncionais para a prática odontológica*. 8a ed. São Paulo: Sarvier; 2013. p.123-142.

Manganelli P, Quaini F, Andreoli AM, Lagrasta C, Pilato FP, Zuccarelli A, Monteverdi R, D'Aversa C, Olivetti G. Quantitative analysis of apoptosis and bcl-2 in Sjogren's syndrome. *J Rheumatol*. 1997;24(8):1552-7.

Manoussakis MN, Moutsopoulos HM. Sjogren's syndrome: autoimmune epithelitis. *Baillieres Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2000;14(1):73-95.

Manoussakis MN. Rates of infiltration by macrophages and dendritic cells and expression of interleukin-18 and interleukin-12 in the chronic inflammatory lesions of Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum*. 2007;56(12):3977-88.

Mariette X, Gozlan J, Clerc D, Bisson M, Morinet F. Detection of Epstein-Barr virus DNA by in situ hybridization and polymerase chain reaction in salivary gland biopsy specimens from patients with Sjogren's syndrome. *Am J Med*. 1991;90(3):286-94.

Martin LH, Calabi F, Lefebvre FA, Bilsland CA, Milstein C. Structure and expression of the human thymocyte antigens CD1a, CD1b, and CD1c. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(24):9189-93.

Maslinska M, Przygodzka M, Kwiatkowska B, Sikorska-Siudek K. Sjogren's syndrome: still not fully understood disease. *Rheumatol Int*. 2015;35(2):233-41.

Mavragani CP, Moutsopoulos HM. Sjogren's syndrome. *Annu Rev Pathol*. 2014;9:273-85.

Mavragani CP, Moutsopoulos HM. The geoepidemiology of Sjögren's syndrome. *Autoimmunity reviews*. 2010;9(5):A305-10.

Miceli MC; Parnes JR. Role of CD4 and CD8 in T cell activation and differentiation. *Adv Immunol*. 1993;53:59-122.

Mitsias DI, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM. Sjogren's syndrome: why autoimmune epithelitis? *Oral Dis*. 2006;12(6):523-32.

Molina H, Kinoshita T, Inoue K, Carel JC, Holers VM. A molecular and immunochemical characterization of mouse CR2. Evidence for a single gene model of mouse complement receptors 1 and 2. *J Immunol*. 1990;145(9):2974-83.

Moore MD, DiScipio RG, Cooper NR, Nemerow GR. Hydrodynamic, electron microscopic, and ligand-binding analysis of the Epstein-Barr virus/C3dg receptor (CR2). *J Biol Chem*. 1989;264(34):20576-82.

Nakamura H, Kawakami A, Ida H, Koji T, Eguchi K. Epidermal growth factor inhibits Fas-mediated apoptosis in salivary epithelial cells of patients with primary Sjogren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol*. 2007;25(6):831-7.

Nakamura H, Kawakami A, Izumi M, Nakashima T, Takagi Y, Ida H, Nakamura T, Nakamura T, Eguchi K. Detection of the soluble form of Fas ligand (sFasL) and sFas in the saliva from patients with Sjogren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol*. 2005;23(6):915.

Nanci A. Ten Cate, histologia oral. 8a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2013

Nardi N, Brito-Zeron P, Ramos-Casals M, Aguilo S, Cervera R, Ingelmo M, Font J. Circulating auto-antibodies against nuclear and non-nuclear antigens in primary Sjogren's syndrome: prevalence and clinical significance in 335 patients. *Clin Rheumatol*. 2006;25(3):341-6.

Ogawa N, Shimoyama K, Kawanami T. Molecular mechanisms of salivary gland destruction in patients with Sjögren's syndrome. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*. 2005;28(1):10-20. Japanese.

Ohyama Y, Nakamura S, Matsuzaki G, Shinohara M, Hiroki A, Oka M, Nomoto K. T-cell receptor V alpha and V beta gene use by infiltrating T cells in labial glands of patients with Sjogren's syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1995;79(6):730-7.

Oxholm P, Manthorpe R, Oxholm A, Schiodt M. Immunoglobulin deposits in labial mucosal epithelium of patients suspected of Sjögren's syndrome. *Eur J Clin Invest.* 1986;16(1):91-6.

Oxholm P, Manthorpe R, Oxholm A, Schiodt M. Langerhans cells in labial minor salivary gland in primary Sjögren's syndrome. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand A.* 1985;93(2):105-7.

Ozaki K. Regulation of B cell differentiation and plasma cell generation by IL-21, a novel inducer of blimp-1 and Bcl-6. *J Immunol.* 2004;173(9):5361-71.

Ozaki Y, Ito T, Son Y, Amuro H, Shimamoto K, Sugimoto H, Katashiba Y, Ogata M, Miyamoto R, Murakami N, Amakawa R, Fukuhara S. Decrease of blood dendritic cells and increase of tissue-infiltrating dendritic cells are involved in the induction of Sjögren's syndrome but not in the maintenance. *Clin Exp Immunol.* 2010;159(3):315-26.

Parnes JR. Molecular biology and function of CD4 and CD8. *Adv Immunol.* 1989;44:265-311.

Pasoto SG, Natalino RR, Chakkour HP, Viana Vdos S, Bueno C, Leon EP, Vendramini MB, Neto ML, Bonfa E. EBV reactivation serological profile in primary Sjögren's syndrome: an underlying trigger of active articular involvement? *Rheumatol Int.* 2013;33(5):1149-57.

Pasoto SG, Ribeiro ACM, Bonfa E. Update on infections and vaccinations in systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome. *Curr Opin Rheumatol.* 2014;26(5):528-37.

Pasqualucci L, Bereshchenko O, Niu H, Klein U, Basso K, Guglielmino R, Cattoretti G, Dalla-Favera R. Molecular pathogenesis of non-Hodgkin's lymphoma: the role of Bcl-6. *Leuk Lymphoma.* 2003;44 Suppl 3:S5-12.

Patel R, Shahane A. The epidemiology of Sjögren's syndrome. *Clinical epidemiology.* 2014;30(6):247-55.

Patel VN, Hoffman MP. Salivary gland development: a template for regeneration. *Semin Cell Dev Biol.* 2014;25-26:52-60.

Pessano S, Oettgen H, Bhan AK, Terhorst C. The T3/T cell receptor complex: antigenic distinction between the two 20-kd T3 (T3-delta and T3-epsilon) subunits. *EMBO J.* 1985;4(2):337-44.

Pijpe J, Kalk WW, Bootsma H, Spijkervet FK, Kallenberg CG, Vissink A. Progression of salivary gland dysfunction in patients with Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis.* 2007;66(1):107-12.

Plemons *et al.* Managing xerostomia and salivary gland hypofunction: executive summary of a report from the American Dental Association Council on Scientific Affairs. *J Am Dent Assoc.* 2014;145(8):867-73.

Pringle ES, Firth MA, Chattha KS, Hodgins DC, Shewen PE. Expression of complement receptors 1 (CR1/CD35) and 2 (CR2/CD21), and co-signaling molecule CD19 in cattle. *Dev Comp Immunol.* 2012;38(4):487-94.

Proctor GB. The physiology of salivary secretion. *Periodontol* 2000. 2016;70(1):11-25.

Qian C, Cao X. Dendritic cells in the regulation of immunity and inflammation. *Semin Immunol.* 2018;35:3-1.

Ramos-Casals M, Brito-Zeron P, Solans R, Camps MT, Casanovas A, Sopena B, Diaz-Lopez B, Rascon FJ, Qanneta R, Fraile G, Perez-Alvarez R, Callejas JL, Ripoll M, Pinilla B, Akasbi M, Fonseca E, Canora J, Nadal ME, de la Red G, Fernandez-Regal I, Jimenez-Heredia I, Bosch JA, Ayala MD, Morera-Morales L, Maure B, Mera A, Ramentol M, Retamozo S, Kostov B, Group SSS, Autoimmune Diseases Study Group of the Spanish Society of Internal M. Systemic involvement in primary Sjogren's syndrome evaluated by the EULAR-SS disease activity index: analysis of 921 Spanish patients (GEAS-SS Registry). *Rheumatology (Oxford).* 2014;53(2):321-31.

Ramos-Casals M, Tzioufas AG, Stone JH, Siso A, Bosch X. Treatment of primary Sjogren syndrome: a systematic review. *JAMA.* 2010;304(4):452-60.

Rasmussen A, Ice JA, Li H, Grundahl K, Kelly JA, Radfar L, Stone DU, Hefner KS, Anaya JM, Rohrer M, Gopalakrishnan R, Houston GD, Lewis DM, Chodosh J, Harley JB, Hughes P, Maier-Moore JS, Montgomery CG, Rhodus NL, Farris AD, Segal BM, Jonsson R, Lessard CJ, Scofield RH, Sivils KL. Comparison of the American-European Consensus Group Sjogren's syndrome classification criteria to newly proposed American College of Rheumatology criteria in a large, carefully characterised sicca cohort. *Ann Rheum Dis.* 2014;73(1):31-8.

Reizis B, Bunin A, Ghosh HS, Lewis KL, Sisirak V. Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. *Annu Rev Immunol.* 2011;29:163-83.

Romao S, Gannage M, Munz C. Checking the garbage bin for problems in the house, or how autophagy assists in antigen presentation to the immune system. *Semin Cancer Biol.* 2013;23(5):391-6.

Routsias JG, Tzioufas AG. Sjögren's syndrome - study of autoantigens and autoantibodies. *Clinic Rev Allerg Immunol.* 2007;32(3): 238-51.

Rozman B, Novljan MP, Hocevar A, Ambrozic A, Zigon P, Kveder T, Tomsic M. Epidemiology and diagnostics of primary Sjogren's syndrome. *Reumatizam*. 2004;51(2):9-12.

Salomonsson S, Jonsson MV, Skarstein K, Brokstad KA, Hjelmstrom P, Wahren-Herlenius M, Jonsson R. Cellular basis of ectopic germinal center formation and autoantibody production in the target organ of patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum*. 2003;48(11):3187-201.

Sanchez-Guerrero J, Perez-Dosal MR, Cardenas-Velazquez F, Perez-Reguera A, Celis-Aguilar E, Soto-Rojas AE, Avila-Casado C. Prevalence of Sjogren's syndrome in ambulatory patients according to the American-European Consensus Group criteria. *Rheumatology (Oxford)*. 2005;44(2):235-40.

Schroeder HE, Theilade J. Electron microscopy of normal human gingival epithelium. *J Periodontal Res*. 1966;1(2):95-119.

Seror R, Bowman SJ, Brito-Zeron P, Theander E, Bootsma H, Tzioufas A, Gottenberg JE, Ramos-Casals M, Dorner T, Ravaud P, Vitali C, Mariette X, Asmussen K, Jacobsen S, Bartoloni E, Gerli R, Bijlsma JW, Kruize AA, Bombardieri S, Bookman A, Kallenberg C, Meiners P, Brun JG, Jonsson R, Caporali R, Carsons S, De Vita S, Del Papa N, Devauchelle V, Saraux A, Fauchais AL, Sibilia J, Hachulla E, Illei G, Isenberg D, Jones A, Manoussakis M, Mandl T, Jacobsson L, Demoulins F, Montecucco C, Ng WF, Nishiyama S, Omdal R, Parke A, Praprotnik S, Tomsic M, Price E, Scofield H, K LS, Smolen J, Laque RS, Steinfeld S, Sutcliffe N, Sumida T, Valesini G, Valim V, Vivino FB, Vollenweider C. EULAR Sjogren's syndrome disease activity index (ESSDAI): a user guide. *RMD Open*. 2015;1(1):e000022.

Seror R, Theander E, Brun JG, Ramos-Casals M, Valim V, Dorner T, Bootsma H, Tzioufas A, Solans-Laue R, Mandl T, Gottenberg JE, Hachulla E, Sivils KL, Ng WF, Fauchais AL, Bombardieri S, Valesini G, Bartoloni E, Saraux A, Tomsic M, Sumida T, Nishiyama S, Caporali R, Kruize AA, Vollenweider C, Ravaud P, Vitali C, Mariette X, Bowman SJ, Force ESsT. Validation of EULAR primary Sjogren's syndrome disease activity (ESSDAI) and patient indexes (ESSPRI). *Ann Rheum Dis*. 2015;74(5):859-66.

Shiboski CH, Shiboski SC, Seror R, Criswell LA, Labetoulle M, Lietman TM, Rasmussen A, Scofield H, Vitali C, Bowman SJ, Mariette X, International Sjogren's Syndrome Criteria Working G. 2016 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism classification criteria for primary Sjogren's syndrome: A consensus and data-driven methodology involving three international patient cohorts. *Ann Rheum Dis*. 2017;76(1):9-16.

Shiboski SC, Shiboski CH, Criswell L, Baer A, Challacombe S, Lanfranchi H, Schiodt M, Umehara H, Vivino F, Zhao Y, Dong Y, Greenspan D, Heidenreich AM, Helin P, Kirkham B, Kitagawa K, Larkin G, Li M, Lietman T, Lindegaard J, McNamara N, Sack K, Shirlaw P, Sugai S, Vollenweider C, Whitcher J, Wu A, Zhang S, Zhang W, Greenspan J, Daniels T, Sjogren's International Collaborative Clinical Alliance Research G. American College of Rheumatology classification criteria for Sjogren's syndrome: a data-driven, expert consensus approach in the Sjogren's International Collaborative Clinical Alliance cohort. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2012;64(4):475-87.

Sisto M, Lisi S, Castellana D, Scagliusi P, D'Amore M, Caprio S, Scagliusi A, Acquafredda A, Panaro MA, Mitolo V. Autoantibodies from Sjogren's syndrome induce activation of both the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways in human salivary gland cell line A-253. *J Autoimmun*. 2006;27(1):38-49.

Sisto M, Lisi S, Lofrumento D, D'Amore M, Scagliusi P, Mitolo V. Autoantibodies from Sjogren's syndrome trigger apoptosis in salivary gland cell line. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1108:418-25.

Skarstein K, Aqrawi LA, Oijordsbakken G, Jonsson R, Jensen JL. Adipose tissue is prominent in salivary glands of Sjogren's syndrome patients and appears to influence the microenvironment in these organs. *Autoimmunity*. 2016;49(5):338-46.

Sreebny LM, Schwartz S. A reference guide to drugs and dry mouth – 2nd edition. *Gerontology*. 1997 Jul. 14(1):33-47.

Stefanski AL, Tomiak C, Pleyer U, Dietrich T, Burmester GR, Dorner T. The Diagnosis and Treatment of Sjogren's Syndrome. *Dtsch Arztebl Int*. 2017;114(20):354-61.

Su Z, Wang H, Wan Y, Bi Z. In vitro preparation and characterization of the human CD3 epsilon epsilon homodimer and CD3 epsilon gamma and CD3 epsilon delta heterodimers. *Int J Mol Med*. 2009;24(4):437-44.

Sudzius G, Mieliauskaite D, Siaurys A, Viliene R, Butrimiene I, Characiejus D, Dumalakiene I. Distribution of Peripheral Lymphocyte Populations in Primary Sjogren's Syndrome Patients. *J Immunol Res*. 2015;2015:854706.

Sun Q, Woodcock JM, Rapoport A, Stomski FC, Korpelainen EI, Bagley CJ, Goodall GJ, Smith WB, Gamble JR, Vadas MA, Lopez AF. Monoclonal antibody 7G3 recognizes the N-terminal domain of the human interleukin-3 (IL-3) receptor alpha-chain and functions as a specific IL-3 receptor antagonist. *Blood*. 1996;87(1):83-92.

Sun J; Kavathas PB. Comparison of the roles of CD8 $\alpha\alpha$ and CD8 $\alpha\beta$ in interaction with MHC class I. *J Immunol*. 1997 Dec, 159(12):6077-82.

Susan A, Kang H, Weissman I, Fox RI. Expression of granzyme a in salivary gland biopsies from patients with primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum*. 1994 Jul;37(7):1046-54.

Sutcliffe N. Sjögren's syndrome. Other autoimmune disorders. 2006;34(11):476-79.

Tandler B. Introduction to mammalian salivary glands. *Microsc Res Tech*. 1993 Sep;26(1):1-4.

Tapinos NI, Polihronis M, Tzioufas AG, Moutsopoulos HM. Sjogren's syndrome. Autoimmune epithelitis. *Adv Exp Med Biol*. 1999;455:127-34.

Tarpley TM, Jr., Anderson LG, White CL. Minor salivary gland involvement in Sjogren's syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1974;37(1):64-74.

Tedder TF, Engel P. CD20: a regulator of cell-cycle progression of B lymphocytes. *Immunol Today*. 1994;15(9):450-4.

Tedder TF, Streuli M, Schlossman SF, Saito H. Isolation and structure of a cDNA encoding the B1 (CD20) cell-surface antigen of human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(1):208-12.

Teos LY, Alevizos I. Genetics of Sjögren's syndrome. *Clin Immunol*. 2017 Sep; 182:41-47.

Theander E, Henriksson G, Ljungberg O, Mandl T, Manthorpe R, Jacobsson LT. Lymphoma and other malignancies in primary Sjogren's syndrome: a cohort study on cancer incidence and lymphoma predictors. *Ann Rheum Dis*. 2006;65(6):796-803.

Theander E, Vasaitis L, Baecklund E, Nordmark G, Warfvinge G, Liedholm R, Brokstad K, Jonsson R, Jonsson MV. Lymphoid organisation in labial salivary gland biopsies is a possible predictor for the development of malignant lymphoma in primary Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis*. 2011;70(8):1363-8.

Toda I. Autoantigens and Sjögren syndrome. *Cornea*. 2002 Mar;21(2 Suppl 1): S13-6.

Tucker AS. Salivary gland development. *Semin Cell Dev Biol*. 2007 Apr;18:237-244.

Turner MD. Hyposalivation and xerostomia: etiology, complications, and medical management. *Dent Clin N Am*. 2016 Apr;60(2):435-43.

Tzioufas A, Voulgarelis M. Update on Sjögren's syndrome autoimmune epithelitis: from classification to increased neoplasias. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2007 Dec;21(6):989-1010.

Tzioufas AG, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM. Pathogenesis of Sjogren's syndrome: what we know and what we should learn. *J Autoimmun*. 2012 Aug;39(1-2):4-8.

Unamuno X, Gomez-Ambrosi J, Rodriguez A, Becerril S, Fruhbeck G, Catalan V. Adipokine dysregulation and adipose tissue inflammation in human obesity. *Eur J Clin Invest*. 2018;48(9):e12997.

Valladeau J, Dezutter-Dambuyant C, Saeland S. Langerin/CD207 sheds light on formation of Birbeck granules and their possible function in langerhans cells. *Immunol Res*. 2003;28(2):93-107.

van Blokland SC, Wierenga-Wolf AF, van Helden-Meeuwsen CG, Drexhage HA, Hooijkaas H, van de Merwe JP, Versnel MA. Professional antigen presenting cells in minor salivary glands in Sjogren's syndrome: potential contribution to the histopathological diagnosis? *Lab Invest*. 2000;80(12):1935-41.

van de Rijn M, Lerch PG, Knowles RW, Terhorst C. The thymic differentiation markers T6 and M241 are two unusual MHC class I antigens. *J Immunol*. 1983;131(2):851-5.

van der Reijden WA, van der Kwaak JS, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV. Analysis of the concentration and output of whole salivary constituents in patients with Sjogren's syndrome. *Eur J Oral Sci*. 1996;104(4 (Pt 1)):335-40.

Varga G. Physiology of the salivary glands. *Basic Science*. 2015; 33(12) 581-86.

Veillette A, Bookman MA, Horak EM, Bolen JB. The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. *Cell*. 1988;55(2):301-8.

Vineusa CG, Sanz I e Cook MC. Dysregulation of germinal centres in autoimmune disease. *Nat Rev Immunol*. 2009 Dec; 9(12):845-57.

Verstappen GM, Kroese FGM, Bootsma H. T cells in primary Sjogren's syndrome: targets for early intervention. *Rheumatology (Oxford)*. 2019.

Vissink A, Bootsma H, Kroese FG, Kallenberg CG. How to assess treatment efficacy in Sjogren's syndrome? *Curr Opin Rheumatol*. 2012;24(3):281-9.

Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, Daniels TE, Fox PC, Fox RI, Kassan SS, Pillemer SR, Talal N, Weisman MH, European Study Group on Classification Criteria for Sjogren's S. Classification

criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis*. 2002;61(6):554-8.

Vitali C, Bombardieri S, Moutsopoulos HM, Balestrieri G, Bencivelli W, Bernstein RM, Bjerrum KB, Braga S, Coll J, de Vita S, et al. Preliminary criteria for the classification of Sjogren's syndrome. Results of a prospective concerted action supported by the European Community. *Arthritis Rheum*. 1993;36(3):340-7.

Vogel DY, Glim JE, Stavenhagen AW, Breur M, Heijnen P, Amor S, Dijkstra CD, Beelen RH. Human macrophage polarization in vitro: maturation and activation methods compared. *Immunobiology*. 2014;219(9):695-703.

Vogelsang P, Brun JG, Oijordsbakken G, Skarstein K, Jonsson R, Appel S. Levels of plasmacytoid dendritic cells and type-2 myeloid dendritic cells are reduced in peripheral blood of patients with primary Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(6):1235-8.

Vogelsang P, Jonsson MV, Dalvin ST, Appel S. Role of dendritic cells in Sjogren's syndrome. *Scand J Immunol*. 2006;64(3):219-26.

Voulgarelis M, Tzioufas AG. Pathogenetic mechanisms in the initiation and perpetuation of Sjogren's syndrome. *Nat Rev Rheumatol*. 2010;6(9):529-37.

Voulgarelis M, Ziakas PD, Papageorgiou A, Baimpa E, Tzioufas AG, Moutsopoulos HM. Prognosis and outcome of non-Hodgkin lymphoma in primary Sjogren syndrome. *Medicine (Baltimore)*. 2012;91(1):1-9.

Whelton H. Introdução: anatomia e fisiologia das glândulas salivares. In: Edgar M, Dawes C, O'Mullane. *Saliva e saúde bucal: composição, funções e efeitos protetores*. 3a ed. São Paulo: Santos, 2010.

Wildenberg ME, van Helden-Meeuwsen CG, van de Merwe JP, Drexhage HA, Versnel MA. Systemic increase in type I interferon activity in Sjogren's syndrome: a putative role for plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol*. 2008;38(7):2024-33.

Work WP. Non-neoplastic disorders of the parotid gland. *J Otolaryngol*. 1981 Feb;10(1): 35-40.

Wright-Browne V, McClain KL, Talpaz M, Ordonez N, Estrov Z. Physiology and pathophysiology of dendritic cells. *Hum Pathol*. 1997;28(5):563-79.

Xanthou G. CD4 cytotoxic and dendritic cells in the immunopathologic lesion of Sjogren's syndrome. *Clin Exp Immunol* 1999 Oct;118(1):154-163.

Yannopoulos DI, Roncin S, Lamour A, Pennec YL, Moutsopoulos HM, Youinou P. Conjunctival epithelial cells from patients with Sjogren's syndrome inappropriately express major histocompatibility complex molecules, La(SSB) antigen, and heat-shock proteins. *J Clin Immunol*. 1992;12(4):259-65.

Zhao J, Kubo S, Nakayamada S, Shimajiri S, Zhang X, Yamaoka K, Tanaka Y. Association of plasmacytoid dendritic cells with B cell infiltration in minor salivary glands in patients with Sjogren's syndrome. *Mod Rheumatol*. 2016;26(5):716-24.

Zhou D, McNamara NA. Macrophages: important players in primary Sjogren's syndrome? *Expert Rev Clin Immunol*. 2014;10(4):513-20.

Zimmermann BG, Park NJ, Wong DT. Genomic targets in saliva. *Ann N Y Acad Sci*. 2010 Mar;1098:184-91.

Apêndice A - Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: XEROSTOMIA EM DOENÇAS AUTOIMUNES COM ENVOLVIMENTO GLANDULAR: ESTUDO MORFOMÉTRICO DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS NO MECANISMO DO COMPROMETIMENTO DAS GLÂNDULAS SALIVARES NA SÍNDROME SJOGREN

Pesquisador: Silvia Vanessa Lourenço

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 41550015.0.0000.0068

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

Patrocinador Principal: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 982.743

Data da Relatoria: 25/02/2015

Apresentação do Projeto:

Estudo envolvendo 30 amostras de glândulas salivares labiais de pacientes com Síndrome de Sjögren (grupo 1), e 10 amostras de glândulas salivares labiais autopsiadas de pacientes sem doenças autoimunes (grupo 2); esses espécimes serão provenientes dos arquivos do Laboratório de Dermatopatologia da Divisão de Dermatologia e do Serviço de Verificação de Óbito de São Paulo- Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - HC-FMUSP. Serão coletados dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes, tais como, idade e sexo, exames laboratoriais e sorologia. Serão realizados diversos cortes histológicos de 3 µm dos espécimes para a subsequente coloração de hematoxilina-eosina H&E (a fim de estudar as alterações arquiteturais e celulares dos espécimes incluídos no estudo) e reações imunoistoquímicas para evidenciação e quantificação da expressão de proteínas específicas das células dendríticas (T (CD1a, CD23, CD21 e CD86) e dos linfócitos T(CD4 e CD8).

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a presença da correlação entre a distribuição e número das células dendríticas e seu possível papel na patogenia da destruição glandular na Síndrome de Sjogren.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP

Continuação do Parecer: 982.743

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O projeto não apresenta riscos ao sujeito de pesquisa, pois o material que será analisado já foi coletado e se encontra estocado. O sujeito não apresenta benefícios diretos com esse estudo, entretanto o melhor entendimento da patogênese da doença pode gerar algum benefício indireto.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto pertinente e interessante, entretanto pelo exposto o referido projeto é prospectivo e não retrospectivo conforme foi descrito. Ele é prospectivo porque ainda será realizado, as lâminas serão preparadas e as análises realizadas. E esse fato é ressaltado pela presença um orçamento considerável.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta os Termos e Autorizações adequados dos responsáveis pelo material a ser utilizado.

Recomendações:

Recomendamos que seja feita a adequação nos documentos onde o estudo é referido como retrospectivo.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A inadequação não justifica a não aprovação do projeto, podendo ser corrigida sem maiores problemas.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Apêndice B – Autorização para utilização de material biológico do Laboratório de Dermatopatologia do HC-FMUSP

DEPARTAMENTO DE DERMATOLOGIA DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que a cirurgiã-dentista, Wanessa Siqueira Cavalcante, estudante de doutorado orientada pela Profa. Dra. Silvia Vanessa Lourenço está autorizada a utilizar o material biológico dos arquivos do Laboratório de Dermatopatologia e as dependências do laboratório no projeto intitulado **“XEROSTOMIA EM DOENÇAS AUTOIMUNES COM ENVOLVIMENTO GLANDULAR: ESTUDO MORFOMÉTRICO DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS NO MECANISMO DO COMPROMETIMENTO DAS GLÂNDULAS SALIVARES NA SÍNDROME DE SJÖGREN”** que será desenvolvido na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

São Paulo, 22 de julho de 2014.

_____
Prof. Dra. Mirian Nacagami Sotto
(Responsável pelo Laboratório de Dermatopatologia)

Apêndice C – Autorização para utilização de material biológico do Serviço de Verificação de Óbitos de São Paulo

DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que a cirurgiã-dentista, Wanessa Siqueira Cavalcante, estudante de doutorado orientada pela Profa. Dra. Silvia Vanessa Lourenço está autorizada a utilizar o material biológico dos arquivos de autópsias do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da USP no projeto intitulado **“XEROSTOMIA EM DOENÇAS AUTOIMUNES COM ENVOLVIMENTO GLANDULAR: ESTUDO MORFOMÉTRICO DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS NO MECANISMO DO COMPROMETIMENTO DAS GLÂNDULAS SALIVARES NA SÍNDROME DE SJÖGREN”** que será desenvolvido na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

São Paulo, 22 de julho de 2014.

Prof. Dr. Luiz Fernando Ferraz da Silva
Docente do Depto. De Patologia da FMUSP
Diretor do Serviço de Verificação de Óbitos da Capital

Apêndice D – Número de focos inflamatórios, área total e escore focal do grupo caso.

Caso	N. focos inflamatórios H&E	Área total H&E (mm²)	Escore Focal	Escore Focal ≥ 1 (Classificação Daniels <i>et al.</i>, 2011)
1	1	4,577754	0,873790946	Presente
2	6	11,427805	2,100140841	Presente
3	2	3,971447	2,014379142	Presente
4	10	7,702899	5,19285012	Presente
5	1	6,675352	0,599219337	Ausente
6	6	6,722026	3,570352153	Presente
7	4	4,286172	3,732934656	Presente
8	2	3,421793	2,337955569	Presente
9	1	2,669526	1,498393348	Presente
10	4	4,6645	3,430164005	Presente
11	6	3,503931	6,849449946	Presente
12	7	8,904015	3,14464879	Presente
13	2	4,329531	1,847775198	Presente
14	1	15,51397	0,257832135	Ausente
15	2	1,93041	4,144197347	Presente
16	3	4,321503	2,776811679	Presente
17	28	17,754691	6,308192015	Presente
18	10	11,323843	3,532369709	Presente
19	1	3,773057	1,060148309	Presente
20	5	7,476274	2,675129349	Presente
21	3	7,007956	1,712339518	Presente
22	1	2,499833	1,600106887	Presente
23	7	9,563768	2,927716356	Presente
24	10	30,82634	1,297591605	Presente
25	2	6,212736	1,287677442	Presente
26	9	27,265913	1,320329893	Presente
27	9	6,871919	5,238711341	Presente
28	12	4,321172	11,10809753	Presente
29	6	8,492445	2,826041264	Presente
30	7	28,657918	0,977042366	Presente

Apêndice E – Dados completos da pesquisa

[illegible]

Grupos	N	Baixo nível de C3 (90-180mg/dL)	Baixo nível de C4 (10-40mg/dL)	Tempo de diagnóstico (anos)	Ano de coleta da biopsia	Ano de fechamento de critérios (olho seco e boca seca)
Caso	1	NI	NI	0	05/04/2007	21/12/2007
	2	Ausente	Ausente	0	28/07/2008	10/10/2008
	3	Ausente	Ausente	0	18/08/2008	27/03/2009
	4	Presente	Presente	0	27/07/2009	23/10/2009
	5	Ausente	Ausente	0	06/05/2009	27/11/2009
	6	Ausente	Ausente	0	26/01/2010	25/06/2010
	7	Ausente	Ausente	0	02/06/2011	19/03/2012
	8	Ausente	Ausente	2	02/06/2011	04/09/2008
	9	Ausente	Ausente	0	10/12/2012	26/08/2013
	10	Ausente	Ausente	18	29/01/2013	29/01/1995
	11	Ausente	Ausente	0	10/07/2013	19/08/2013
	12	Ausente	Ausente	11	13/12/2013	13/12/2002
	13	NI	NI	3	13/03/2013	09/05/2016
	14	Ausente	Ausente	0	07/06/2016	Assintomática
	15	Ausente	Ausente	4	23/06/2015	23/07/2010
	16	Ausente	Ausente	1	27/07/2015	05/12/2016
	17	Ausente	Ausente	0	22/09/2015	11/04/2016
	18	Ausente	Ausente	0	24/09/2015	19/10/2015
	19	Ausente	NI	0	27/04/2015	30/11/2015
	20	Ausente	Ausente	2	05/10/2015	03/06/2013
	21	NI	NI	0	27/07/2015	28/07/2015
	22	Ausente	Ausente	0	10/03/2015	22/06/2015
	23	Ausente	Ausente	2	10/10/2016	18/08/2014
	24	Presente	Presente	6	26/09/2016	26/11/2009
	25	Ausente	Ausente	0	21/11/2016	23/05/2016
	26	Ausente	Ausente	0	29/08/2016	07/04/2017
	27	Ausente	Ausente	0	26/01/2016	16/05/2016
	28	Ausente	Ausente	0	26/01/2016	18/07/2016
	29	Ausente	Ausente	0	14/02/2017	11/08/2017
	30	NI	NI	1	26/09/2016	26/09/2015
Controle	31	NA	NA	NA	NA	NA
	32	NA	NA	NA	NA	NA
	33	NA	NA	NA	NA	NA
	34	NA	NA	NA	NA	NA
	35	NA	NA	NA	NA	NA
	36	NA	NA	NA	NA	NA
	37	NA	NA	NA	NA	NA
	38	NA	NA	NA	NA	NA
	39	NA	NA	NA	NA	NA
	40	NA	NA	NA	NA	NA

Grupos	N	Severidade do infiltrado inflamatório (Tarpley et al., 1974)	Centro germinativo: CD21+ e Bcl6+	Escore Focal ≥ 1	Densidade FINAL_DUCT_CD1a 10^5
Caso	1	Leve	-	Presente	1274,300113
	2	Severo	-	Presente	1843,713829
	3	Severo	-	Presente	1655,475989
	4	Severo	+	Presente	3007,5482
	5	Leve	-	Ausente	1897,673749
	6	Severo	+	Presente	4451,700987
	7	Severo	+	Presente	3345,78024
	8	Moderado	-	Presente	5627,947308
	9	Leve	-	Presente	1645,981471
	10	Severo	+	Presente	818,528789
	11	Severo	+	Presente	928,8263211
	12	Severo	+	Presente	2107,494613
	13	Moderado	-	Presente	5195,218928
	14	Severo	+	Ausente	0
	15	Severo	+	Presente	2971,10417
	16	Moderado	+	Presente	1942,855817
	17	Severo	+	Presente	2656,124226
	18	Severo	+	Presente	3612,050291
	19	Leve	-	Presente	0
	20	Severo	+	Presente	71,10138013
	21	Severo	+	Presente	39,54725608
	22	Severo	+	Presente	93,19711955
	23	Severo	+	Presente	172,0492614
	24	Severo	+	Presente	35,75438619
	25	Severo	+	Presente	639,4541146
	26	Severo	+	Presente	4,90766048
	27	Moderado	-	Presente	136,6694701
	28	Severo	+	Presente	48,12577793
	29	Severo	+	Presente	56,19673413
	30	Severo	+	Presente	572,4842448
Controle	31	NA	NA	NA	177,8090182
	32	NA	NA	NA	42,58125214
	33	NA	NA	NA	12,17534061
	34	NA	NA	NA	26,33233816
	35	NA	NA	NA	14,42827154
	36	NA	NA	NA	69,90522295
	37	NA	NA	NA	36,35565226
	38	NA	NA	NA	36,04442475
	39	NA	NA	NA	90,29818822
	40	NA	NA	NA	28,6073807

Grupos	N	Densidade FINAL_GLAND_CD1a 10^5	Densidade FINAL_TEC_SUBST_CD1a 10^5	Densidade FINAL_DUCT_CD3 10^5
Caso	1	263,7891807	72,41880684	1367,652902
	2	440,857744	63,4630072	461,1536963
	3	831,1570912	113,1083234	845,3659303
	4	802,0660141	81,92903012	755,8180966
	5	555,6627681	205,6944793	341,9717312
	6	1344,423702	128,4395147	1671,454798
	7	1537,750271	190,4282019	1565,385661
	8	1649,050255	209,9103574	977,866941
	9	445,094314	104,7159826	300,0130037
	10	372,7278525	71,51956109	4569,876022
	11	302,9545827	47,28285212	4684,673157
	12	500,0003623	105,2935247	813,3130324
	13	827,750553	128,3547555	15,41377658
	14	1,863620269	3,394759623	1155,935935
	15	806,386255	174,2369707	1119,815872
	16	467,156835	69,71029428	1716,880143
	17	476,4820228	90,38034647	4066,024612
	18	633,1918589	84,88737182	4103,592009
	19	56,79840321	18,01215375	677,4928658
	20	47,14481575	44,29427298	85,49583513
	21	51,44965415	39,58290393	353,39876
	22	52,49493363	48,40338379	47,71698889
	23	113,9179445	131,789624	1095,311091
	24	48,79209174	34,45396719	664,8261599
	25	127,3977847	51,12589595	526,2335852
	26	6,802967445	4,593944303	630,0837771
	27	54,57351722	47,25007464	894,8979806
	28	37,68953796	43,26840534	427,0016484
	29	85,36888112	73,92604955	209,9103872
	30	349,1355602	160,4055681	56,42051184
Controle	31	154,1126259	144,9349784	2,944074752
	32	117,9563521	118,8237044	108,9703252
	33	52,04809909	38,12967876	312,1341753
	34	44,89913624	35,35853861	176,5592774
	35	27,29812772	7,427720375	71,57900897
	36	108,3236631	86,64660563	478,2335907
	37	48,59552788	28,76072688	1112,649618
	38	82,98853569	19,11540277	457,4182677
	39	174,8071271	82,62722833	486,7042541
	40	70,86553964	74,48666223	345,2304622

Grupos	N	Densidade FINAL_GLAND_CD3 10^5	Densidade FINAL_TEC_SUBST_CD3 10^5	Densidade FINAL_DUCT_CD8 10^5
Caso	1	461,914238	151,0911986	950,9997315
	2	265,5303408	59,13473672	1314,110921
	3	273,353714	192,164419	2389,821622
	4	240,7801032	64,62420841	4875,202706
	5	124,9807074	46,31961342	985,5175683
	6	769,7498118	165,8748532	4445,297001
	7	840,2892504	242,156919	3221,784128
	8	403,4278157	149,8759586	753,3638952
	9	358,0034832	65,17570346	1281,786498
	10	310,0629353	123,748068	4947,313598
	11	1388,603421	1665,889954	5571,404049
	12	116,7037546	35,82292864	6346,785767
	13	11,63624005	11,33359646	3194,149296
	14	209,6558398	82,58166571	1813,075149
	15	2008,434532	326,1286046	7108,899801
	16	1029,178998	299,7360471	4677,814391
	17	925,3847741	1812,85487	6296,964545
	18	3890,410959	739,5549389	7180,886238
	19	380,209893	87,09888925	1213,331019
	20	155,8051842	107,2866573	1327,10045
	21	130,5087634	33,44750397	1997,918779
	22	43,71578286	32,24201134	588,1247147
	23	278,3531599	34,4283295	2200,558728
	24	74,67642311	14,10435779	2968,125825
	25	404,7967386	15,1179621	1749,162635
	26	180,8742638	57,84908424	927,4530802
	27	273,4116849	43,88969136	1810,837884
	28	107,2407113	37,23123196	1442,104993
	29	210,5160219	17,59382857	1144,687933
	30	41,68284648	3,874159713	835,9583929
Controle	31	2,129677815	1,659761655	143,3432403
	32	76,17040524	51,11278738	704,8001151
	33	238,7385244	197,4261756	891,394421
	34	89,20917742	100,0334324	453,0136961
	35	57,57641136	60,90327791	492,5854416
	36	202,5832853	27,8049917	951,5082907
	37	442,898211	614,637982	2704,943098
	38	168,6255769	80,87139347	477,4938581
	39	277,6343431	148,2081538	460,7202898
	40	257,6357336	128,7198559	465,0848919

Grupos	N	Densidade FINAL_GLAND_CD8 10^5	Densidade FINAL_TEC_SUBST_CD8 10^5	Densidade FINAL_DUCT_LANG 10^5
Caso	1	463,2304447	223,5489981	47,36877721
	2	1031,023461	527,3679312	149,3997071
	3	991,5983029	340,6351722	37,98396815
	4	2293,767907	436,6339831	425,2532878
	5	489,0838144	165,8034832	43,75630654
	6	879,1766294	1390,072365	89,89227663
	7	1646,127179	504,1487723	179,5771774
	8	772,0723214	219,3861777	202,3665351
	9	1052,207854	197,6507294	220,5351392
	10	1780,47297	654,8086554	109,5036414
	11	2414,890855	913,1220578	701,9510109
	12	2352,68879	504,7156469	213,4938313
	13	2106,622351	876,8312877	490,9946856
	14	528,5907265	128,2644036	46,58023445
	15	6199,353384	860,5177543	1500,394011
	16	1713,335435	574,8795802	270,4640784
	17	4548,87929	868,8401937	2036,330865
	18	5684,646565	715,4051723	936,8266238
	19	581,9609191	58,15911108	2,576323586
	20	385,7815459	100,8949344	338,4424843
	21	732,5283012	309,637975	22,10794444
	22	218,0948574	54,90406137	56,47920688
	23	912,8609206	84,70782624	743,3480111
	24	363,4246239	74,26538908	161,2422195
	25	1351,086167	74,50840798	33,45600535
	26	335,7992776	88,50036073	87,70633374
	27	561,7478621	198,9739609	566,8350452
	28	597,1748915	169,0692294	132,0685809
	29	670,9821567	83,81596666	168,6754015
	30	563,9177469	139,4524178	407,5581041
Controle	31	95,68262393	8,159206779	15,19356492
	32	232,2781277	52,18734481	56,84231367
	33	474,4712411	174,7058485	223,6566343
	34	284,5199524	144,3535346	61,28218433
	35	296,436238	181,5524466	304,6369099
	36	491,1776754	95,99061796	227,9241364
	37	1698,041769	883,3970256	257,3111836
	38	214,7579871	149,4541569	102,3629979
	39	245,8891238	47,59254816	63,1984078
	40	358,3500835	124,5150654	88,04435988

Grupos	N	Densidade FINAL_GLAND_LANG 10^5	Densidade FINAL_TEC_SUBST_LANG 10^5	Densidade FINAL_DUCT_CD20 10^5
Caso	1	7,003938783	4,887731199	66,11744568
	2	20,04783388	17,03701435	1066,188238
	3	11,91172755	4,355486924	507,7667462
	4	73,34319742	22,49751794	3854,249254
	5	14,81642324	4,271600569	780,4695699
	6	14,63463451	1,275945378	695,835898
	7	15,66542307	6147,540984	2301,061291
	8	37,0679059	8,779339288	255,2285486
	9	57,96748346	3,693099341	265,7892258
	10	18,13237288	8,50486485	5998,58012
	11	140,0681896	27,20280664	23968,34906
	12	32,59205136	43,58741224	12569,82078
	13	52,12656148	21,99227577	2836,943282
	14	39,76799815	6,101831948	2556,783428
	15	300,6535624	30,11274106	5725,092067
	16	93,17966085	57,36987451	557,1212196
	17	358,7850455	49,48791068	9763,097072
	18	204,9914193	33,5793878	2452,194499
	19	92,92886702	18,35286266	138,5436294
	20	75,78830109	78,29172326	812,5017647
	21	8,891087574	12,88448953	2526,809902
	22	32,65024388	17,20932655	8013,221591
	23	124,2279795	14,00863001	5393,717956
	24	13,10938517	6,404144193	3646,607689
	25	1,779581087	0,143590789	463,166419
	26	27,88796987	6,106382979	2881,719578
	27	79,74166212	46,1008555	11374,79775
	28	11,830103	0,45946275	2842,069693
	29	43,03753485	2,591142129	714,9559889
	30	21,67630514	3,565192879	375,2817553
Controle	31	4,418465163	8,122055875	1,341367151
	32	31,15903309	10,48679865	7,352321063
	33	55,62692072	36,72658831	18,49839295
	34	47,85390999	31,06826088	21,63079899
	35	89,46967955	50,92787683	46,73222109
	36	57,1200013	19,1169114	26,00635695
	37	44,25254556	20,66177939	23,37420997
	38	41,99438622	47,80765454	52,3839761
	39	39,24645783	21,57983287	132,9647171
	40	53,91694165	47,55307573	259,8619523

Grupos	N	Densidade FINAL_GLAND_CD20 10^5	Densidade FINAL_TEC_SUBST_CD20 10^5	Densidade FINAL_DUCT_CD21 10^5
Caso	1	128,6326993	32,62547604	22,28213641
	2	1433,626307	197,4492207	46,62969809
	3	864,9069583	124,065137	7,561128818
	4	1732,548954	105,3663318	68,63674251
	5	2787,467927	329,7411931	43,55777068
	6	637,1837717	77,47551853	18,58192497
	7	1354,929286	271,4302798	14,56917275
	8	3609,663142	259,9869174	108,7454771
	9	507,3548943	59,51827637	88,81799561
	10	2263,992844	332,1636719	2983,38242
	11	10984,35095	548,3630927	1940,582271
	12	803,2636594	131,3434177	0
	13	595,1884409	33,36629763	920,5213728
	14	515,2975407	215,6854616	34,49538184
	15	2234,869431	171,3050453	2882,688634
	16	183,7240643	36,29978812	42,24066277
	17	8279,783561	1028,219124	2362,463265
	18	2033,065936	216,1062132	242,4510846
	19	3260,883416	139,0782623	38,17608156
	20	274,2988513	34,08157335	8,396115828
	21	794,9899336	149,1798232	4,487262029
	22	599,7912831	116,6642631	282,5617968
	23	1274,622217	79,83713837	0
	24	337,8161147	70,77362694	73,25958535
	25	285,4338758	31,89590031	0
	26	335,5138025	96,39559852	136,0869172
	27	1229,537108	220,3302577	1197,244805
	28	923,1893051	107,2929681	0
	29	2288,340682	196,7017687	215,4571063
	30	81,73661242	24,70849406	0
Controle	31	3,901283644	1,289269064	0,44451886
	32	25,61340646	7,680287361	21,42394174
	33	92,99865809	33,14001657	66,01920628
	34	131,6224804	18,36755985	24,83269272
	35	233,6341502	60,2554167	5,411121414
	36	127,9800135	16,75604946	82,3570836
	37	41,95121051	21,75472961	11,77127658
	38	111,0200896	136,7710628	27,11484811
	39	159,2477313	60,91932178	23,20075991
	40	282,7801787	47,15622146	15,29647853

Grupos	N	Densidade FINAL_GLAND_CD21 10^5	Densidade FINAL_TEC_SUBST_CD21 10^5	Densidade FINAL_DUCT_CD4 10^5
Caso	1	65,66827185	25,62086542	1470,320275
	2	53,72670558	61,74638746	2526,428825
	3	61,01115211	45,56166288	4112,350947
	4	48,03717267	71,96396545	10830,80641
	5	129,8654054	85,61187625	6337,270985
	6	47,17062327	35,42081283	7920,68784
	7	98,94017778	29,76862034	18399,34181
	8	146,2655411	33,98945747	17230,72396
	9	93,31160067	44,81474267	5773,031013
	10	317,6894661	22,84640676	12579,25562
	11	3607,550238	105,9025039	13867,06636
	12	0	0,010657053	13025,66434
	13	205,4765322	68,93575289	7003,213871
	14	157,4943745	16,85613533	24929,37758
	15	163,4596021	75,19499464	15653,77049
	16	117,2960687	66,2634844	3950,521583
	17	856,4939566	67,02140155	13688,16324
	18	275,5298992	85,29102883	6863,627218
	19	49,02993143	46,62219091	1471,709922
	20	0,106893566	1,41469872	14357,54635
	21	52,58977535	3,906405271	20088,33879
	22	5,051848166	0	18361,88651
	23	149,7581455	2,341527859	23458,73163
	24	9,421617752	33,45805694	28686,58401
	25	0	0,320182376	28080,43876
	26	18,74846439	9,0447225	9351,383016
	27	15,14511746	7,239499615	33313,72712
	28	0,110370769	3,421767	29529,53007
	29	2,156713837	0,292117623	16865,61504
	30	2,81651977	0,448060904	2518,8408
Controle	31	0,799195178	0,656542777	5,04013594
	32	27,83440578	25,02469247	7700,862021
	33	39,08251156	45,98552331	3433,406119
	34	45,52089688	26,18911534	1030,878647
	35	18,65488969	19,84422747	1264,924643
	36	205,7792802	68,80209642	4374,466223
	37	22,55214634	28,96056197	3994,890773
	38	37,60924948	71,93466309	4822,521664
	39	45,69425583	32,14842401	935,7982555
	40	21,68706087	34,83035805	2697,465313

Grupos	N	Densidade FINAL_GLAND_CD4 10^5	Densidade FINAL_TEC_SUBST_CD4 10^5	Densidade FINAL_DUCT_CD123 10^5
Caso	1	435,2626123	84,59788485	0
	2	820,3760538	187,2803233	3,171219665
	3	1413,350368	361,0911307	0
	4	5326,724098	895,7226939	23,30374002
	5	1986,974118	396,3488961	34,53109979
	6	3947,44368	1429,861388	0
	7	5339,568345	2556,909591	37,19069737
	8	5995,547167	3893,662239	52,03706721
	9	1506,477928	1091,953815	225,635131
	10	4512,120553	912,0252147	2,514445489
	11	7988,198331	2378,915748	0
	12	3065,220566	1077,736763	20,18797245
	13	2011,509725	684,1273991	33,96931439
	14	8278,928548	3475,269199	66,6833375
	15	3504,277695	1478,098123	103,2748109
	16	1547,787927	1166,0215	4,705070498
	17	6792,731636	1593,508595	3,786579471
	18	5259,339709	1262,116777	673,450887
	19	1170,057081	909,7538555	1,45819359
	20	6184,754741	3575,352303	0,860896365
	21	9266,041052	3730,851361	61,74487684
	22	6113,09243	3654,069388	1,614752378
	23	12390,91745	3828,322305	243,2491527
	24	9409,954522	2250,560321	70,23065225
	25	44208,35744	3712,439266	8,001280205
	26	3395,465212	2689,34589	20,30452168
	27	11890,31542	5838,230543	41,76760505
	28	10779,36519	6874,588436	59,46539515
	29	8508,66938	2557,571745	59,94314059
	30	1082,180021	534,1517285	39,02549784
Controle	31	8,206021942	4,939449577	100,0013167
	32	613,0912639	366,6371087	19,39538776
	33	1720,134182	739,6266057	6,844442923
	34	216,6098712	72,06382833	14,67878036
	35	419,8741902	225,6778212	17,80057777
	36	1997,843246	746,7469255	5,499863247
	37	2957,054834	1317,23636	13,90365642
	38	1091,841793	14,36921278	7,844066364
	39	212,2428407	138,6717643	19,43593643
	40	2143,697314	667,8135961	21,02305223

Grupos	N	Densidade FINAL_GLAND_CD123 10^5	Densidade FINAL_TEC_SUBST_CD123 10^5	Densidade FINAL_DUCT_CD68 10^5
Caso	1	6,339630068	8,488596543	3028,422733
	2	9,197546883	10,94656148	1560,51678
	3	3,940256651	4,608256048	2429,190797
	4	30,91130187	87,11645155	1662,181914
	5	4,849995002	5,900843821	406,6076365
	6	1,717431067	0,404134566	6618,668947
	7	104,2937086	43,84418879	1290,384205
	8	344,4668771	87,16870658	893,5973268
	9	3,467337679	6,721002236	2350,919276
	10	40,63690428	6,456153854	531,8561453
	11	38,74280334	2,521614968	502,9830041
	12	80,14472726	10,9141871	483,4799857
	13	76,61025843	10,9141871	237,8139528
	14	87,79894043	36,41065272	4958,759731
	15	37,743278	12,71312826	1330,332077
	16	169,5230264	8,566520187	4358,805954
	17	10,93978413	154,116085	1489,258452
	18	141,7766913	3,136732292	2212,679978
	19	7,218192355	38,17502655	2584,522422
	20	11,03104225	5,628378879	4846,469063
	21	525,969915	1,566956031	716,6985839
	22	84,2024874	33,79473963	1076,869611
	23	91,94167806	53,67394247	3653,862512
	24	29,76071808	20,01910684	2157,281813
	25	5,960363582	55,09012271	830,4696449
	26	10,78349238	8,057032678	1406,491865
	27	13,9323042	3,537139454	144,690955
	28	68,82233417	0,830406152	3586,087355
	29	62,54096305	8,552164801	728,0617508
	30	162,7949626	33,54982326	1614,460731
Controle	31	29,79667703	25,97242264	755,9761915
	32	42,53885904	4,201225374	377,445938
	33	29,26457846	47,60392982	914,6576573
	34	14,95232095	19,24797636	4828,565528
	35	19,56281875	5,661267828	1654,862373
	36	27,30309321	4,477618429	830,4577444
	37	18,77573002	2,145307655	4593,98824
	38	15,08505252	30,08431785	504,8256937
	39	24,25449137	7,058526328	1844,271253
	40	11,14914441	11,52214866	1283,816777

Grupos	N	Densidade FINAL_GLAND_CD68 10^5	Densidade FINAL_TEC_SUBST_CD68 10^5	Densidade FINAL_DUCT_Bcl6 10^5
Caso	1	1261,668489	548,9720829	9,08257714
	2	1156,223002	459,4226364	23,98996254
	3	2428,39015	967,67191	21,83765445
	4	1033,519286	660,5941022	20,12777854
	5	862,1525086	514,3274398	19,31953099
	6	6093,944791	2150,143527	12,95988534
	7	1208,421078	294,8584956	53,94807826
	8	2902,53835	766,6059059	27,37537222
	9	1581,254641	848,4212914	54,78583065
	10	131,202016	674,9316014	22,57311573
	11	635,0273794	576,243605	5,047828172
	12	428,6989033	355,2067286	22,15521501
	13	278,6618083	207,5872534	12,66105159
	14	12480,613	1642,934118	58,75609057
	15	1023,574005	491,6710105	133,8155515
	16	4327,548648	1534,984101	58,06309203
	17	1128,227405	638,457078	34,27566488
	18	1410,098364	718,9415264	33,71742582
	19	2069,134251	740,1143813	34,44910145
	20	2498,745252	2044,652515	37,3061413
	21	1983,363658	527,3502732	119,9996923
	22	2422,343827	1342,556979	21,85771116
	23	4517,957379	1527,043099	20,18536897
	24	6912,17543	1351,813231	75,79420566
	25	2368,150097	420,7964504	0
	26	10013,71968	2679,613806	21,22050029
	27	10485,66115	14985,38221	7,00623555
	28	7256,63606	1796,269587	11,85309139
	29	563,9971137	383,9982637	84,82158419
	30	1764,204961	1197,984215	149,8524568
Controle	31	836,9987113	459,020954	33,78244713
	32	1177,462616	487,0273241	138,2738452
	33	880,7229898	411,7834414	4,987522971
	34	1659,228261	588,3229699	21,25035559
	35	1683,559558	304,8699478	11,21190172
	36	1342,771256	353,356022	83,50848425
	37	2261,683213	870,444074	5,454351992
	38	3867,234723	1103,711917	20,2343821
	39	2627,774564	674,2270078	84,08133381
	40	1912,772127	602,1201528	17,6077152

Grupos	N	Densidade FINAL_GLAND_Bcl6 10^5	Densidade FINAL_TEC_SUBST_Bcl6 10^5
Caso	1	19,90584296	10,77417464
	2	31,78810323	27,06259092
	3	17,98306303	17,03996088
	4	65,46769403	55,2640992
	5	13,93313931	39,62313092
	6	25,13890245	18,63529973
	7	43,3177252	17,34058712
	8	23,41390948	28,68692137
	9	306,063091	272,2425783
	10	3,813702859	6,172373826
	11	17,2655569	8,423251544
	12	10,29445771	9,545160435
	13	43,84879498	21,47379694
	14	40,20053996	10,587234
	15	56,5855607	23,92850472
	16	92,17492292	56,80192358
	17	44,40228817	21,53150578
	18	27,38796195	24,99039403
	19	25,90458412	18,43930574
	20	13,05106019	9,676867077
	21	47,19237786	15,75567061
	22	32,44902027	19,33424533
	23	21,30562737	5,958528641
	24	42,08631094	8,812214232
	25	72,00855873	4,676570451
	26	30,54205366	16,32294199
	27	10,23182545	4,111250437
	28	19,68502416	7,238258626
	29	13,53357419	38,50618647
	30	124,0154707	52,09161236
Controle	31	75,03085851	47,56373037
	32	159,7197419	46,32270725
	33	10,10980975	7,942835653
	34	15,27405016	11,49054472
	35	34,56599513	15,90436948
	36	63,41156563	28,98160005
	37	17,21429783	9,826248346
	38	28,10109715	21,66309461
	39	173,89659	83,6377136
	40	25,16745894	11,88713297

Apêndice F – Análise de correlação entre variáveis métricas

O método que permite estudar as relações ou associações entre variáveis quantitativas (métricas) é conhecido como análise de Correlação (ρ). Esta análise mostra o grau de relacionamento entre as variáveis, fornecendo um número, indicando como as variáveis variam conjuntamente. Não há a necessidade de definir as relações de causa e efeito, ou seja, qual é a variável dependente e a independente.

Este coeficiente varia de -1 (associação totalmente negativa) a +1 (associação totalmente positiva). Quanto mais próximo dos extremos (-1 ou 1), maior o grau de correlação entre as variáveis. Quando igual a zero não existe correlação entre as variáveis.

Quando a correlação é negativa, significa que a medida que uma variável aumenta, a outra diminui. Já quando temos correlação positiva, a medida que uma variável aumenta, a outra também aumenta.

Entretanto, na prática ocorrem diferentes valores de correlação. É claro que as interpretações, dependem de cada contexto em particular. A interpretação do valor de “ ρ ” depende muito dos objetivos de sua utilização e as razões pelas quais, este é calculado. Segundo CALLEGARI-JACQUES (2003, p. 90), o coeficiente de correlação pode ser avaliado qualitativamente da seguinte forma:

- se $0,00 < \rho < 0,30$, existe fraca correlação;
- se $0,30 \leq \rho < 0,60$, existe moderada correlação;
- se $0,60 \leq \rho < 0,90$, existe forte correlação;
- se $0,90 \leq \rho < 1,00$, existe correlação muito forte.

Será utilizada a Correlação de Spearman (não-paramétrica), pois os dados não são distribuídos de acordo com a Curva Normal (GAUSS).

Variáveis	ESSDAI	Tempo Diagnóstico	Escore Focal
ESSDAI	-	-0,205	-0,083
Tempo Diagnóstico	-0,205	-	0,043
Escore Focal	-0,083	0,043	-
CD1a (D)	-0,117	0,157	0,382*
CD1a (G)	-0,122	0,138	0,290
CD1a (TCS)	-0,020	0,252	0,168
CD3 (D)	-0,052	0,014	0,455*
CD3 (G)	-0,002	-0,183	0,391*
CD3 (TCS)	0,088	-0,156	0,421*
CD8 (D)	-0,268	0,261	0,627*
CD8 (G)	-0,114	0,172	0,590*
CD8 (TCS)	-0,019	0,107	0,572*
Langerina (D)	0,087	0,349	0,620*
Langerina (G)	0,177	0,148	0,407*
Langerina (TCS)	0,004	0,239	0,450*
CD20 (D)	-0,064	0,211	0,561*
CD20 (G)	0,204	-0,118	0,496*
CD20 (TCS)	0,332	-0,186	0,409*
CD21 (D)	0,092	0,054	0,283
CD21 (G)	0,277	0,073	0,181
CD21 (TCS)	0,252	-0,111	0,194
CD4 (D)	-0,125	0,072	0,297
CD4 (G)	-0,089	-0,032	0,341
CD4 (TCS)	-0,044	-0,046	0,273
CD123 (D)	0,291	0,155	0,004
CD123 (G)	0,255	0,344	0,157
CD123 (TCS)	0,135	0,181	-0,184
IgG4 (D)	0,231	0,039	-0,431*
IgG4 (G)	0,202	-0,032	-0,318
IgG4 (TCS)	0,123	-0,037	-0,209
CD68 (D)	0,056	-0,110	-0,113
CD68 (G)	0,075	-0,173	-0,174
CD68 (TCS)	0,119	-0,049	-0,004
BCL6 (D)	0,387	0,263	-0,190
BCL6 (G)	0,251	-0,082	-0,225
BCL6 (TCS)	0,540*	-0,124	-0,133

* Coeficiente de correlação estatisticamente significativo.

*Correlação de Spearman

Variáveis	CD1a (D)	CD1a (G)	CD1a (TCS)	CD3 (D)	CD3 (G)	CD3 (TCS)
ESSDAI	-0,117	-0,122	-0,020	-0,052	-0,002	0,088
Tempo Diagnóstico	0,157	0,138	0,252	0,014	-0,183	-0,156
Escore Focal	0,382*	0,290	0,168	0,455*	0,391*	0,421*
CD1a (D)	-	0,941*	0,784*	0,326	0,420*	0,430*
CD1a (G)	0,941*	-	0,845*	0,307	0,414*	0,425*
CD1a (TCS)	0,784*	0,845*	-	0,095	0,212	0,167
CD3 (D)	0,326	0,307	0,095	-	0,786*	0,776*
CD3 (G)	0,420*	0,414*	0,212	0,786*	-	0,816*
CD3 (TCS)	0,430*	0,425*	0,167	0,776*	0,816*	-
CD8 (D)	0,436*	0,390*	0,143	0,627*	0,439*	0,461*
CD8 (G)	0,668*	0,641*	0,422*	0,484*	0,553*	0,453*
CD8 (TCS)	0,737*	0,660*	0,392*	0,553*	0,470*	0,592*
Langerina (D)	0,443*	0,296	0,357	0,249	0,274	0,245
Langerina (G)	0,179	0,107	0,079	0,271	0,383*	0,388*
Langerina (TCS)	0,288	0,190	0,015	0,326	0,283	0,418*
CD20 (D)	-0,048	-0,166	-0,175	0,218	-0,117	-0,014
CD20 (G)	0,266	0,340	0,248	0,352	0,356	0,382*
CD20 (TCS)	0,142	0,184	0,079	0,461*	0,315	0,450*
CD21 (D)	0,202	0,141	-0,015	0,240	0,270	0,312
CD21 (G)	0,418*	0,408*	0,299	0,590*	0,518*	0,596*
CD21 (TCS)	0,533*	0,543*	0,254	0,404*	0,479*	0,598*
CD4 (D)	-0,310	-0,384*	-0,256	-0,010	-0,148	-0,276
CD4 (G)	-0,328	-0,420*	-0,308	0,053	-0,046	-0,229
CD4 (TCS)	-0,362*	-0,457*	-0,314	-0,021	-0,021	-0,161
CD123 (D)	-0,072	-0,096	0,126	-0,138	-0,108	-0,291
CD123 (G)	0,035	-0,026	0,071	0,071	-0,116	-0,123
CD123 (TCS)	0,108	0,133	0,198	-0,015	0,037	-0,117
IgG4 (D)	-0,207	-0,157	-0,033	-0,192	-0,310	-0,390*
IgG4 (G)	-0,278	-0,228	-0,104	-0,075	-0,152	-0,164
IgG4 (TCS)	-0,136	0,025	-0,031	0,008	-0,026	-0,065
CD68 (D)	-0,160	-0,162	-0,168	0,165	0,178	0,284
CD68 (G)	-0,447*	-0,469*	-0,420*	-0,012	-0,092	-0,092
CD68 (TCS)	-0,408*	-0,444*	-0,384*	0,060	-0,098	0,042
BCL6 (D)	-0,162	-0,060	0,019	-0,112	-0,043	0,021
BCL6 (G)	0,149	0,135	0,075	-0,153	0,084	-0,078
BCL6 (TCS)	0,450*	0,487*	0,448*	-0,204	0,075	0,147

* Coeficiente de correlação estatisticamente significativo.

*Correlação de Spearman

Variáveis	CD8 (D)	CD8 (G)	CD8 (TCS)	Langerina (D)	Langerina (G)	Langerina (TCS)
ESSDAI	-0,268	-0,114	-0,019	0,087	0,177	0,004
Tempo Diagnóstico	0,261	0,172	0,107	0,349	0,148	0,239
Escore Focal	0,627*	0,590*	0,572*	0,620*	0,407*	0,450*
CD1a (D)	0,436*	0,668*	0,737*	0,443*	0,179	0,288
CD1a (G)	0,390*	0,641*	0,660*	0,296	0,107	0,190
CD1a (TCS)	0,143	0,422*	0,392*	0,357	0,079	0,015
CD3 (D)	0,627*	0,484*	0,553*	0,249	0,271	0,326
CD3 (G)	0,439*	0,553*	0,470*	0,274	0,383*	0,283
CD3 (TCS)	0,461*	0,453*	0,592*	0,245	0,388*	0,418*
CD8 (D)	-	0,795*	0,705*	0,486*	0,358	0,489*
CD8 (G)	0,795*	-	0,753*	0,539*	0,418*	0,382*
CD8 (TCS)	0,705*	0,753*	-	0,446*	0,228	0,364*
Langerina (D)	0,486*	0,539*	0,446*	-	0,748*	0,556*
Langerina (G)	0,358	0,418*	0,228	0,748*	-	0,632*
Langerina (TCS)	0,489*	0,382*	0,364*	0,556*	0,632*	-
CD20 (D)	0,514*	0,259	0,239	0,441*	0,339	0,448*
CD20 (G)	0,278	0,429*	0,293	0,216	0,387*	0,231
CD20 (TCS)	0,274	0,283	0,309	0,111	0,268	0,316
CD21 (D)	0,208	0,249	0,325	0,391*	0,512*	0,315
CD21 (G)	0,425*	0,504*	0,575*	0,348	0,446*	0,299
CD21 (TCS)	0,430*	0,496*	0,603*	0,287	0,374*	0,271
CD4 (D)	0,088	-0,133	-0,284	0,067	-0,061	0,029
CD4 (G)	0,138	-0,072	-0,268	0,127	0,045	0,010
CD4 (TCS)	-0,111	-0,227	-0,345	0,067	0,078	0,038
CD123 (D)	0,051	0,061	-0,196	0,305	0,186	-0,070
CD123 (G)	0,125	0,141	0,049	0,288	0,202	0,333
CD123 (TCS)	-0,098	0,097	-0,272	0,122	0,203	0,174
IgG4 (D)	-0,190	-0,270	-0,253	-0,166	-0,121	-0,291
IgG4 (G)	-0,111	-0,216	-0,236	-0,032	0,040	-0,115
IgG4 (TCS)	-0,111	-0,177	-0,182	-0,252	-0,079	-0,217
CD68 (D)	-0,035	-0,199	-0,139	-0,082	0,034	-0,142
CD68 (G)	-0,321	-0,579*	-0,452*	-0,229	-0,139	-0,191
CD68 (TCS)	-0,221	-0,514*	-0,296	-0,015	0,089	-0,113
BCL6 (D)	0,010	-0,014	-0,127	0,083	0,195	0,144
BCL6 (G)	0,041	0,209	0,027	0,103	0,067	-0,012
BCL6 (TCS)	-0,143	0,176	0,178	0,169	0,250	0,011

* Coeficiente de correlação estatisticamente significativo.

*Correlação de Spearman

Variáveis	CD20 (D)	CD20 (G)	CD20 (TCS)	CD21 (D)	CD21 (G)	CD21 (TCS)
ESSDAI	-0,064	0,204	0,332	0,092	0,277	0,252
Tempo Diagnóstico	0,211	-0,118	-0,186	0,054	0,073	-0,111
Escore Focal	0,561*	0,496**	0,409*	0,283	0,181	0,194
CD1a (D)	-0,048	0,266	0,142	0,202	0,418*	0,533*
CD1a (G)	-0,166	0,340	0,184	0,141	0,408*	0,543*
CD1a (TCS)	-0,175	0,248	0,079	-0,015	0,299	0,254
CD3 (D)	0,218	0,352	0,461*	0,240	0,590*	0,404*
CD3 (G)	-0,117	0,356	0,315	0,270	0,518*	0,479*
CD3 (TCS)	-0,014	0,382*	0,450*	0,312	0,596*	0,598*
CD8 (D)	0,514**	0,278	0,274	0,208	0,425*	0,430*
CD8 (G)	0,259	0,429*	0,283	0,249	0,504*	0,496*
CD8 (TCS)	0,239	0,293	0,309	0,325	0,575*	0,603*
Langerina (D)	0,441*	0,216	0,111	0,391*	0,348	0,287
Langerina (G)	0,339	0,387*	0,268	0,512*	0,446*	0,374*
Langerina (TCS)	0,448*	0,231	0,316	0,315	0,299	0,271
CD20 (D)	-	0,297	0,410*	0,405*	0,162	-0,013
CD20 (G)	0,297	-	0,839*	0,462*	0,473*	0,450*
CD20 (TCS)	0,410*	0,839*	-	0,488*	0,508*	0,332
CD21 (D)	0,405*	0,462*	0,488*	-	0,531*	0,465*
CD21 (G)	0,162	0,473*	0,508*	0,531*	-	0,707*
CD21 (TCS)	-0,013	0,450*	0,332	0,465*	0,707*	-
CD4 (D)	0,490*	0,077	0,201	-0,021	-0,196	-0,434*
CD4 (G)	0,455*	0,136	0,186	-0,007	-0,143	-0,369*
CD4 (TCS)	0,296	0,027	0,126	-0,050	-0,211	-0,480*
CD123 (D)	0,099	0,044	0,063	0,021	0,098	-0,058
CD123 (G)	0,215	0,024	0,137	-0,050	0,155	-0,216
CD123 (TCS)	-0,033	0,088	-0,027	-0,002	0,061	-0,067
IgG4 (D)	-0,163	-0,141	-0,145	-0,187	-0,012	-0,095
IgG4 (G)	-0,063	-0,171	-0,022	0,025	0,145	-0,103
IgG4 (TCS)	-0,326	0,018	-0,032	-0,120	0,010	0,069
CD68 (D)	-0,393*	-0,366*	-0,414*	-0,409*	-0,066	0,005
CD68 (G)	-0,152	-0,430*	-0,282	-0,332	-0,313	-0,313
CD68 (TCS)	0,014	-0,335	-0,217	-0,089	-0,194	-0,203
BCL6 (D)	-0,172	-0,068	0,040	0,014	0,030	-0,071
BCL6 (G)	-0,222	-0,341	-0,380*	-0,054	0,080	0,188
BCL6 (TCS)	-0,408*	0,095	-0,030	0,202	0,174	0,426*

* Coeficiente de correlação estatisticamente significativo.

*Correlação de Spearman

Variáveis	CD4 (D)	CD4 (G)	CD4 (TCS)	CD123 (D)	CD123 (G)	CD123 (TCS)
ESSDAI	-0,125	-0,089	-0,044	0,291	0,255	0,135
Tempo Diagnóstico	0,072	-0,032	-0,046	0,155	0,344	0,181
Escore Focal	0,297	0,341	0,273	0,004	0,157	-0,184
CD1a (D)	-0,310	-0,328	-0,362*	-0,072	0,035	0,108
CD1a (G)	-0,384*	-0,420*	-0,457*	-0,096	-0,026	0,133
CD1a (TCS)	-0,256	-0,308	-0,314	0,126	0,071	0,198
CD3 (D)	-0,010	0,053	-0,021	-0,138	0,071	-0,015
CD3 (G)	-0,148	-0,046	-0,021	-0,108	-0,116	0,037
CD3 (TCS)	-0,276	-0,229	-0,161	-0,291	-0,123	-0,117
CD8 (D)	0,088	0,138	-0,111	0,051	0,125	-0,098
CD8 (G)	-0,133	-0,072	-0,227	0,061	0,141	0,097
CD8 (TCS)	-0,284	-0,268	-0,345	-0,196	0,049	-0,272
Langerina (D)	0,067	0,127	0,067	0,305	0,288	0,122
Langerina (G)	-0,061	0,045	0,078	0,186	0,202	0,203
Langerina (TCS)	0,029	0,010	0,038	-0,070	0,333	0,174
CD20 (D)	0,490**	0,455*	0,296	0,099	0,215	-0,033
CD20 (G)	0,077	0,136	0,027	0,044	0,024	0,088
CD20 (TCS)	0,201	0,186	0,126	0,063	0,137	-0,027
CD21 (D)	-0,021	-0,007	-0,050	0,021	-0,050	-0,002
CD21 (G)	-0,196	-0,143	-0,211	0,098	0,155	0,061
CD21 (TCS)	-0,434*	-0,369*	-0,480*	-0,058	-0,216	-0,067
CD4 (D)	-	0,931*	0,866*	0,421*	0,306	0,097
CD4 (G)	0,931*	-	0,859*	0,363*	0,269	0,052
CD4 (TCS)	0,866*	0,859*	-	0,363*	0,360	0,013
CD123 (D)	0,421*	0,363*	0,363*	-	0,443*	0,125
CD123 (G)	0,306	0,269	0,360	0,443*	-	0,184
CD123 (TCS)	0,097	0,052	0,013	0,125	0,184	-
IgG4 (D)	0,024	0,136	0,079	0,236	0,296	0,138
IgG4 (G)	0,086	0,170	0,170	0,331	0,459*	0,016
IgG4 (TCS)	-0,079	0,007	0,082	0,207	0,227	-0,135
CD68 (D)	-0,197	-0,132	-0,042	-0,053	-0,132	0,003
CD68 (G)	0,356	0,327	0,540*	0,141	0,007	-0,062
CD68 (TCS)	0,152	0,182	0,371*	0,001	-0,059	-0,249
BCL6 (D)	-0,047	-0,118	-0,026	0,422*	0,392*	0,209
BCL6 (G)	-0,116	-0,130	-0,096	0,284	0,144	0,437*
BCL6 (TCS)	-0,577*	-0,561**	-0,463*	0,124	0,050	0,185

* Coeficiente de correlação estatisticamente significativo.

*Correlação de Spearman

Variáveis	CD68 (D)	CD68 (G)	CD68 (TCS)	BCL6 (D)	BCL6 (G)	BCL6 (TCS)
ESSDAI	0,056	0,075	0,119	0,387	0,251	0,540*
Tempo Diagnóstico	-0,110	-0,173	-0,049	0,263	-0,082	-0,124
Escore Focal	-0,113	-0,174	-0,004	-0,190	-0,225	-0,133
CD1a (D)	-0,160	-0,447*	-0,408*	-0,162	0,149	0,450*
CD1a (G)	-0,162	-0,469*	-0,444*	-0,060	0,135	0,487*
CD1a (TCS)	-0,168	-0,420*	-0,384*	0,019	0,075	0,448*
CD3 (D)	0,165	-0,012	0,060	-0,112	-0,153	-0,204
CD3 (G)	0,178	-0,092	-0,098	-0,043	0,084	0,075
CD3 (TCS)	0,284	-0,092	0,042	0,021	-0,078	0,147
CD8 (D)	-0,035	-0,321	-0,221	0,010	0,041	-0,143
CD8 (G)	-0,199	-0,579*	-0,514*	-0,014	0,209	0,176
CD8 (TCS)	-0,139	-0,452*	-0,296	-0,127	0,027	0,178
Langerina (D)	-0,082	-0,229	-0,015	0,083	0,103	0,169
Langerina (G)	0,034	-0,139	0,089	0,195	0,067	0,250
Langerina (TCS)	-0,142	-0,191	-0,113	0,144	-0,012	0,011
CD20 (D)	-0,393*	-0,152	0,014	-0,172	-0,222	-0,408*
CD20 (G)	-0,366*	-0,430*	-0,335	-0,068	-0,341	0,095
CD20 (TCS)	-0,414*	-0,282	-0,217	0,040	-0,380*	-0,030
CD21 (D)	-0,409*	-0,332	-0,089	0,014	-0,054	0,202
CD21 (G)	-0,066	-0,313	-0,194	0,030	0,080	0,174
CD21 (TCS)	0,005	-0,313	-0,203	-0,071	0,188	0,426*
CD4 (D)	-0,197	0,356	0,152	-0,047	-0,116	-0,577*
CD4 (G)	-0,132	0,327	0,182	-0,118	-0,130	-0,561*
CD4 (TCS)	-0,042	0,540**	0,371*	-0,026	-0,096	-0,463*
CD123 (D)	-0,053	0,141	0,001	0,422*	0,284	0,124
CD123 (G)	-0,132	0,007	-0,059	0,392*	0,144	0,050
CD123 (TCS)	0,003	-0,062	-0,249	0,209	0,437*	0,185
IgG4 (D)	0,029	0,194	0,051	0,272	0,210	0,143
IgG4 (G)	0,062	0,148	0,115	0,496*	0,293	0,185
IgG4 (TCS)	0,157	0,290	0,256	0,324	0,111	0,247
CD68 (D)	-	0,545*	0,556**	0,197	0,189	0,081
CD68 (G)	0,545*	-	0,838**	-0,018	0,057	-0,291
CD68 (TCS)	0,556*	0,838*	-	-0,032	-0,116	-0,198
BCL6 (D)	0,197	-0,018	-0,032	-	0,387*	0,426*
BCL6 (G)	0,189	0,057	-0,116	0,387*	-	0,481*
BCL6 (TCS)	0,081	-0,291	-0,198	0,426*	0,481*	-

* Coeficiente de correlação estatisticamente significativo.

*Correlação de Spearman

		CD1a ↑			Langerina ↑			CD21 ↑			CD123 ↑		
		D	G	TCS	D	G	TCS	D	G	TCS	D	G	TCS
ESSDAI		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
TD		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
EF		SR	NS	NS	SR	SR	SR	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CD1a	D	--	S	S	SR	NS	NS	NS	SR	SR	NS	NS	NS
	G	S	--	S	NS	NS	NS	NS	SR	SR	NS	NS	NS
	TCS	S	S	--	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CD3	D	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	SR	SR	NS	NS	NS
	G	0,420* ↑	0,414* ↑	NS	NS	0,383* ↑	NS	NS	SR	SR	NS	NS	NS
	TCS	0,430* ↑	0,425* ↑	NS	NS	0,388* ↑	0,418* ↑	NS	SR	SR	NS	NS	NS
CD8	D	SR	SR	NS	0,486* ↑	NS	0,489* ↑	NS	S	S	NS	NS	NS
	G	SR	SR	SR	0,539* ↑	0,418* ↑	0,382* ↑	NS	S	S	NS	NS	NS
	TCS	SR	SR	SR	0,446* ↑	NS	0,364* ↑	NS	S	S	NS	NS	NS
Lang	D	0,443* ↑	NS	NS	--	S	S	SR	NS	NS	NS	NS	NS
	G	NS	NS	NS	S	--	S	SR	SR	SR	NS	NS	NS
	TCS	NS	NS	NS	S	S	--	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CD20	D	NS	NS	NS	S	NS	S	0,405* ↑	NS	NS	NS	NS	NS
	G	NS	NS	NS	NS	S	NS	0,462* ↑	0,473* ↑	0,450* ↑	NS	NS	NS
	TCS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,488* ↑	0,508* ↑	NS	NS	NS	NS
CD21	D	NS	NS	NS	S	S	NS	--	S	S	NS	NS	NS
	G	0,418* ↑	0,408* ↑	NS	NS	S	NS	S	--	S	NS	NS	NS
	TCS	0,533* ↑	0,543* ↑	NS	NS	S	NS	S	S	--	NS	NS	NS
CD4	D	NS	(-)S	NS	NS	NS	NS	NS	NS	-0,434* ↓	0,421* ↑	NS	NS
	G	NS	(-)S	NS	NS	NS	NS	NS	NS	-0,369* ↓	0,363* ↑	NS	NS
	TCS	(-)SR	(-)S	NS	NS	NS	NS	NS	NS	-0,480* ↓	0,363* ↑	NS	NS
CD123	D	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	--	S	NS
	G	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	S	--	NS
	TCS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	--
IgG4	D	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	G	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	S	NS
	TCS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CD68	D	NS	NS	NS	NS	NS	NS	(-)SR	NS	NS	NS	NS	NS
	G	(-)SR	(-)SR	(-)SR	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	TCS	(-)SR	(-)SR	(-)SR	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
BCL6	D	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,422* ↑	0,392* ↑	NS
	G	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,437* ↑
	TCS	SR	SR	SR	NS	NS	NS	NS	NS	SR	NS	NS	NS

Legenda: * Coeficiente de correlação significativa.

D: Região ductal; **G:** Região glandular; **TCS:** Região de tecido de Substituição; **NS:** Não Significante, **SR:** Significante Repetido, **S:** Significante, (↑): Diretamente proporcional, **(-)SR:** Significante Repetido Inversamente Proporcional, **(↓):** Inversamente proporcional

		CD68 ↑			CD3 ↑			CD8 ↑			CD4 ↑		
		D	G	TCS	D	G	TCS	D	G	TCS	D	G	TCS
ESSDAI		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
TD		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
EF		NS	NS	NS	SR	SR	SR	SR	SR	SR	NS	NS	NS
CD1a	D	NS	-0,447' ↓	-0,408' ↓	NS	SR	SR	0,436' ↑	0,668' ↑	0,737' ↑	NS	NS	(-)S
	G	NS	-0,469' ↓	-0,444' ↓	NS	SR	SR	0,390' ↑	0,641' ↑	0,660' ↑	(-)S	(-)S	(-)S
	TCS	NS	-0,420' ↓	-0,384' ↓	NS	NS	NS	NS	0,422' ↑	0,392' ↑	NS	NS	NS
CD3	D	NS	NS	NS	--	S	S	SR	SR	SR	NS	NS	NS
	G	NS	NS	NS	S	--	S	SR	SR	SR	NS	NS	NS
	TCS	NS	NS	NS	S	S	--	SR	SR	SR	NS	NS	NS
CD8	D	NS	NS	NS	0,627' ↑	0,439' ↑	0,461' ↑	--	S	S	NS	NS	NS
	G	NS	-0,579' ↓	-0,514' ↓	0,484' ↑	0,553' ↑	0,453' ↑	S	--	S	NS	NS	NS
	TCS	NS	-0,452' ↓	NS	0,553' ↑	0,470' ↑	0,592' ↑	S	S	--	NS	NS	NS
Lang	D	NS	NS	NS	NS	NS	NS	SR	SR	SR	NS	NS	NS
	G	NS	NS	NS	NS	SR	SR	NS	SR	NS	NS	NS	NS
	TCS	NS	NS	NS	NS	NS	SR	SR	SR	SR	NS	NS	NS
CD20	D	-0,393' ↓	NS	NS	NS	NS	NS	SR	NS	NS	0,490'' ↑	0,455' ↑	NS
	G	-0,366' ↓	-0,430' ↓	NS	NS	NS	SR	NS	SR	NS	NS	NS	NS
	TCS	-0,414' ↓	NS	NS	SR	NS	SR	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CD21	D	(-)S	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	G	NS	NS	NS	S	S	S	S	S	S	NS	NS	NS
	TCS	NS	NS	NS	S	S	S	S	S	S	(-)SR	SR	(-) SR
CD4	D	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	--	S	S
	G	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	S	--	S
	TCS	NS	0,540'' ↑	0,371' ↑	NS	NS	NS	NS	NS	NS	S	S	--
CD123	D	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	SR	SR	SR
	G	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	TCS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
IgG4	D	NS	NS	NS	NS	NS	(-)SR	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	G	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	TCS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CD68	D	--	S	S	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	G	S	--	S	NS	NS	NS	NS	-0,579' ↓	-0,452' ↓	NS	NS	SR
	TCS	S	S	--	NS	NS	NS	NS	-0,514' ↓	NS	NS	NS	SR
BCL6	D	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	G	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	TCS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	(-) SR	(-) SR	(-) SR

Legenda: * Coeficiente de correlação significativa.

D: Região ductal; **G:** Região glandular; **TCS:** Região de tecido de Substituição; **NS:** Não Significante, **SR:** Significante Repetido, **S:** Significante, (↑): Diretamente proporcional, **(-)SR:** Significante Repetido Inversamente Proporcional, (↓): Inversamente proporcional

		CD20 ↑			IgG4 ↑			BCL6 ↑			ESSDAI ↑	TD	EF ↑
		D	G	TCS	D	G	TCS	D	G	TCS			
ESSDAI		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	SR	--	NS	NS
TD		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	--	NS
EF		SR	SR	SR	SR	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	--
CD1a	D	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,450* ↑	NS	NS	0,382* ↑
	G	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,487* ↑	NS	NS	NS
	TCS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,448* ↑	NS	NS	NS
CD3	D	NS	NS	S	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,455* ↑
	G	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,391* ↑
	TCS	NS	S	S	-0,390* ↓	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,421* ↑
CD8	D	S	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,627* ↑
	G	NS	S	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,590* ↑
	TCS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,572* ↑
Lang	D	S	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,620* ↑
	G	NS	S	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,407* ↑
	TCS	S	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,450* ↑
CD20	D	--	NS	S	NS	NS	NS	NS	NS	-0,408* ↓	NS	NS	0,561* ↑
	G	NS	--	S	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,496* ↑
	TCS	S	S	--	NS	NS	NS	NS	-0,380* ↓	NS	NS	NS	0,409* ↑
CD21	D	SR	SR	SR	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	G	NS	SR	SR	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	TCS	NS	SR	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,426* ↑	NS	NS	NS
CD4	D	SR	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	-0,577* ↓	NS	NS	NS
	G	SR	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	-0,561* ↓	NS	NS	NS
	TCS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	-0,463* ↓	NS	NS	NS
CD123	D	NS	NS	NS	NS	NS	NS	SR	NS	NS	NS	NS	NS
	G	NS	NS	NS	NS	S	NS	SR	NS	NS	NS	NS	NS
	TCS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	S	NS	NS	NS	NS
IgG4	D	NS	NS	NS	--	S	S	NS	NS	NS	NS	NS	-0,431* ↓
	G	NS	NS	NS	S	--	S	S	NS	NS	NS	NS	NS
	TCS	NS	NS	NS	S	S	--	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CD68	D	(-)SR	(-)SR	(-)SR	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	G	NS	(-)SR	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	TCS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
BCL6	D	NS	NS	NS	NS	S	NS	--	S	S	NS	NS	NS
	G	NS	NS	(-)SR	NS	NS	NS	S	--	S	NS	NS	NS
	TCS	(-)SR	NS	NS	NS	NS	NS	S	S	--	0,540* ↑	NS	NS

Legenda: * Coeficiente de correlação significativa.

TD: Tempo de Diagnóstico; **EF:** Escore Focal; **D:** Região ductal; **G:** Região glandular; **TCS:** Região de tecido de Substituição; NS: Não Significante, **SR:** Significante Repetido, **S:** Significante, (↑): Diretamente proporcional, **(-)SR:** Significante Repetido Inversamente Proporcional, (↓): Inversamente proporcional