

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO**

**Análise morfológica e imunoistoquímica de glândulas salivares menores na síndrome de Sjogren: correlação entre escore focal, centros germinativos e área dos focos.**

Trabalho de Conclusão de Curso

Área: Patologia Oral

Orientada: Karen Cristine Bortoletto

Orientador: Prof. Dr. Jorge Esquiche León

**Ribeirão Preto  
2018**

Agradeço a Deus pela proteção e iluminação, nos momentos de dificuldade e alegria.

À minha família, principalmente aos meus pais, Paulo e Lilian, pelo suporte, amor incondicional e dedicação a mim ao longo desta jornada.

Ao meu namorado Willian pelo carinho, compreensão e confiança em minhas capacidades.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de Iniciação Científica.

Ao meu professor orientador, pela disposição, paciência e por todos os aprendizados que me proporcionou ao longo da realização deste projeto.

Aos colegas de laboratório, pelo convívio amistoso e auxílio técnico.

A meus amigos da faculdade, que tornaram tudo mais divertido e leve de ser vivido.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da realização deste trabalho.

**Este trabalho foi realizado nos Laboratórios de Histopatologia, Microscopia e Imunopatologia e Análise Genética** do Departamento de Estomatologia, Saúde Coletiva e Odontologia Legal da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP/USP).

## RESUMO

A síndrome de Sjögren (SS) é uma doença autoimune crônica, que afeta principalmente as glândulas salivares e lacrimais, causando xerostomia e xeroftalmia. Notavelmente, o diagnóstico histopatológico das glândulas salivares menores (GSm), mostrando sialadenite linfocítica focal (SLF), com escore focal (EF)  $\geq 1$ , é um critério diagnóstico importante para definir SS. Também podem ser detectados em muitos casos, centros germinativos (CGs) ectópicos nos infiltrados linfocíticos na SLF, os quais têm sido relacionados a um maior risco de desenvolvimento de linfoma tipo MALT. Os imunomarcadores CD10, CD23 e Bcl-6 também podem ser úteis na detecção de CGs. Outro critério que tem sido considerado importante no diagnóstico histológico da doença é a área dos focos. Este estudo tem como objetivo utilizar as técnicas morfológica e imunoistoquímica na detecção de CGs, determinar a relação entre o EF e a presença de CGs em biópsias de GSm de pacientes com SS primária. Neste estudo, foram selecionados 50 casos diagnosticados com SS primária, nos quais foi realizada análise morfológica (H&E), obtendo-se o EF para cada caso e quantificados os CGs e a área dos focos. Os cortes também foram submetidos à técnica imunoistoquímica (marcadores CD10, CD23 e Bcl-6), para avaliar a presença e quantidade de CGs na SLF. Além disso, foi feita uma análise da correlação entre EF e CGs, em cada caso. Na análise morfológica, 42% dos casos apresentaram CGs consolidados, já 72% apresentaram CGs em formação. O marcador CD23 mostrou-se mais sensível na detecção destas estruturas. Já o marcador CD10 foi fraco e inespecífico. Bcl-6 foi específico, porém a sensibilidade foi menor do que CD23. Os imunomarcadores foram capazes de detectar CGs consolidados em 48% dos casos, 6% a mais do que na análise morfológica. Em média, a área ocupada pelos focos foi de 17% da área total da glândula. Além disso, houve correlação estatisticamente significativa entre o EF e a presença de CGs consolidados ( $p < 0,05$ ). Nossos resultados mostram a importância de incluir a imunoistoquímica na análise dos CGs, os quais pelo seu valor prognóstico devem ser cuidadosamente avaliados na SLF de pacientes com SS, em correlação com o EF e área dos focos.

**Palavras-chave:** síndrome de Sjogren; glândulas salivares menores; infiltrados linfocíticos; centros germinativos; imunoistoquímica; CD10; CD23; bcl6; área dos focos.

## ABSTRACT

Sjögren's syndrome (SS) is a chronic autoimmune disease, which mainly affects the salivary and lacrimal glands, causing xerostomia and xerophthalmia. Notably, the histopathological diagnosis of the minor salivary glands (MSGs), showing focal lymphocytic sialadenitis (FLS) with focus score (FS)  $\geq 1$ , is an important diagnostic criterion for defining SS. In many cases, ectopic germinal centers (GCs) may also be detected in lymphocytic infiltrates of FLS, which have been linked to an increased risk of developing MALT lymphoma. CD10, CD23 and Bcl-6 immunomarkers may also be useful in the detection of GCs. Another criterion that has been considered important in the histological diagnosis of the disease is the foci area. This study aims to use morphological and immunohistochemical techniques in the detection of GCs, to determine the relationship between EF and the presence of GCs in MSG biopsies of patients with primary SS. In this study, 50 cases diagnosed with primary SS were selected, in which a morphological analysis (H&E) was performed, obtaining the FS for each case and quantifying the GCs and the foci area. The sections were also submitted to the immunohistochemical technique (CD10, CD23 and Bcl-6 markers), to evaluate the presence and amount of GCs in FLS. In addition, a correlation analysis between FS and GCs was performed in each case. In the morphological analysis, 42% of the cases presented consolidated GCs, and 72% presented GCs in formation. The CD23 marker was more sensitive in the detection of these structures. The CD10 marker, however, was weak and non-specific. Bcl-6 was specific, but the sensitivity was lower than CD23. The immunomarkers were able to detect GCs in 48% of the cases, 6% more than in the morphological analysis alone. On average, foci represented 17% of the glandular area. In addition, there was a statistically significant correlation between EF, number of foci and foci area with the presence of consolidated CGs ( $p < 0.05$ ). Our results show the importance of including immunohistochemistry in the analysis of CGs, which by their prognostic value must be carefully evaluated in the SLF of patients with SS, in correlation with FS and foci area.

**Key words:** Sjogren's syndrome; minor salivary glands; lymphocytic infiltrates; germinal centers; immunohistochemistry; CD10; CD23; bcl 6; foci area.

**SUMÁRIO**

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>07</b>
<b>2. PROPOSIÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODO.....</b>	<b>12</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>17</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>21</b>
<b>7. APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....</b>	<b>24</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>25</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A síndrome de Sjögren (SS), é uma doença autoimune crônica progressiva, que afeta glândulas exócrinas, principalmente as lacrimais e salivares, sendo a segunda doença autoimune sistêmica mais prevalente, atingindo cerca de 0,5% da população. A população mais afetada são mulheres, na quarta e quinta décadas de vida (Cartee et al, 2015).

A doença caracteriza-se pela infiltração linfocítica nas glândulas exócrinas, produção de citocinas inflamatórias, ativação de linfócitos B e produção de autoanticorpos. Além das glândulas exócrinas, outros órgãos e sistemas também podem ser afetados, incluindo o sistema musculoesquelético (causando artralgia e mialgia), pulmões, fígado, pele e rins (Mavragani; Moutsopoulos, 2014). Apesar de sua etiologia pouco conhecida, pode haver fatores genéticos, hormonais e agentes infecciosos relacionados ao seu desenvolvimento.

Os principais sintomas são xerostomia (boca seca) e xerofthalmia (olhos secos), entretanto os pacientes também podem apresentar outras complicações odontológicas como alterações no paladar e dificuldade em utilizar próteses removíveis, maior risco de cáries e candidíase, sendo responsabilidade do cirurgião-dentista auxiliar o paciente na higiene oral e na prevenção das doenças bucais, melhorando assim sua qualidade de vida. (Cartee et al., 2015).

Não há cura para a doença, o tratamento é individual e multiprofissional e se baseia em aliviar os sintomas e prevenir complicações, incluindo uso de colírios e saliva artificial ou até mesmo a prescrição de medicamentos imunossupressores, nos casos em que há envolvimento sistêmico. Em muitos pacientes, a síndrome encontra-se associada a outras doenças reumáticas autoimunes, como artrite reumatoide e lúpus eritematoso sistêmico, quadro conhecido como SS secundária.

Uma complicação da SS é um aumento de 40-44 vezes (quando comparado com a população normal) na probabilidade de desenvolver linfoma não-Hodgkin (especificamente, o linfoma da zona marginal extranodal do tecido linfóide associado à mucosa [linfoma tipo MALT]), a neoplasia mais comum na SS. O desenvolvimento de linfoma MALT ocorre em 5 a 10% dos pacientes com a síndrome, levando a um aumento significativo da morbidade e da mortalidade.

Histopatologicamente, na biópsia de glândulas salivares menores (GSm) pode ser observada a sialoadenite linfocítica focal (SLF), definida como a presença de ao menos um foco contendo 50 células mononucleares, principalmente linfócitos, em

localização perivascular ou periductal, com arquitetura glandular preservada (Theander et al., 2006).

Através da análise morfológica por H&E pode ser detectada, em muitos casos, a presença de centros germinativos (CGs) nos infiltrados linfocíticos, os quais têm sido relacionados a um maior risco de desenvolvimento de linfoma do tipo MALT e alterações sorológicas. Uma prevalência destas estruturas em até 68% dos pacientes tem sido relatada nos casos de biópsias de parótida, e varia entre 18% e 59% em GSm. No entanto, os CGs ectópicos não necessariamente apresentam a morfologia clássica dos órgãos linfoides (segregação entre a zona clara e escura), dificultando sua observação. Por isso, é sugerida a utilização de marcadores imunistoquímicos, como o CD10, CD23 e Bcl-6 (Fisher et al., 2016). No entanto, ainda são necessários mais estudos para determinar como essas características microscópicas se correlacionam com a prática clínica, como impactam na saúde bucal e se podem afetar os protocolos terapêuticos dos pacientes com SS.

A SS se inicia nas glândulas exócrinas, onde é possível encontrar um infiltrado de linfócitos T e B e macrófagos nas glândulas salivares dos pacientes (Christodoulou et al., 2010), sendo que em 20%-25% das biópsias, podem ser detectadas estruturas denominadas CGs ectópicos (Jonsson et al., 2007), similares aos observados nos linfonodos, tonsilas e baço, os quais estão formados por grandes agregados de células B em processo de maturação, células T e densas populações de células B proliferativas próximas às células dendríticas foliculares. A presença e quantidade de CGs está relacionada a um aumento nos níveis de auto-anticorpos (Ro/SSA e La/SSB) e outras alterações sorológicas, bem como à diminuição do fluxo salivar (Jonsson et al., 2007).

Interessantemente, foi sugerida uma associação entre a presença dos CGs e o desenvolvimento de linfoma tipo MALT, na SS (Johnsen et al., 2014; Jonsson et al., 2007; Amft et al., 2001). Uma possível explicação para o maior desenvolvimento de linfoma entre os pacientes com SS, parece estar relacionada a uma mútua estimulação entre células dendríticas foliculares e linfócitos presentes no tecido glandular, levando a uma expansão clonal e eventual transformação neoplásica das células B. A detecção de CGs (constituídos por células dendríticas foliculares e linfócitos, compartimentalizados) foi proposto como fator preditivo para o desenvolvimento de linfoma não-Hodgkin, permitindo que os pacientes sejam classificados de acordo com seu risco, podendo ser iniciada uma imunoterapia



preventiva direcionada às células B. Assim, a alta sensibilidade na detecção de CGs em GSms na SS é crucial (Johnsen et al., 2014; Christodoulou et al., 2010; Jonsson et al., 2007; Amft et al., 2001).

O panorama da SS mudou nos últimos anos, devido aos novos critérios para o diagnóstico e aos avanços terapêuticos (Shibosky et al, 2017). A nova forma de classificação da SS primária, de acordo com os critérios estabelecidos em 2016 pelo American College of Rheumatology (ACR), se baseia em 5 testes objetivos, cada um com um peso designado de acordo com sua importância: SLF com EF  $\geq 1$  (peso 3), positividade para anti-SSA/Ro (peso 3), OSS (Ocular Staining Score)  $\geq 5$  ou VBS (Van Bijsterveld Score)  $\geq 4$  em ao menos um dos olhos (peso 1), teste de Schirmer's  $\leq 5$  mm/5 minutos em ao menos um olho (peso 1) e UWS (taxa de fluxo salivar sem estímulo)  $\leq 0.1$  ml/minuto (peso 1); sendo que será considerado diagnóstico de SS quando o escore total for  $\geq 4$  (Shibosky et al, 2017).

O parâmetro histopatológico mais importante no diagnóstico da SS é o EF  $\geq 1$ . O cálculo do EF é baseado no número de focos (infiltrados linfocíticos) em relação a 4mm<sup>2</sup> de área glandular. Recentemente, tem sido sugerida uma análise mais detalhada das características histológicas, como a contagem dos CGs e a determinação da área ocupada pelos focos, parâmetros que podem estar correlacionados positivamente ao EF.

Estudos recentes revelam a importância da observação e quantificação dos CGs. A organização progressiva dos focos, podendo mostrar presença de CGs, apresenta consequências patológicas, pois ocupam área glandular, promovendo possivelmente perda na produção salivar, além de agirem como órgãos linfoides terciários (Jonsson et al., 2007) e aumentarem o risco de transformação maligna. De acordo com Risselada et al. (2013), a presença de CGs está associada a um maior EF, um maior nível de auto-anticorpos e a uma menor produção de saliva. Entre os pacientes CG+, 14% desenvolveram linfoma, já entre aqueles com ausência de CGs (CG-), apenas 0,8% apresentaram linfoma.

Também tem sido sugerido que, além do cálculo do EF (número de focos/4mm<sup>2</sup> de área glandular), seja analisada a área ocupada pelos focos, já que se torna importante determinar, além do número de focos, a área ocupada pelo infiltrado, a fim de determinar o grau de dano às GSM. De acordo com a classificação de Chrisholm & Mason, é estabelecido um número de 0 a 4, sendo 0 a ausência de infiltração e 4 a presença de focos confluentes. Ainda, o grau de

infiltração pode ser estabelecido calculando-se a proporção entre a área ocupada pelo infiltrado e a área total da glândula. O grau médio de infiltração é em torno de 6,4%. O grau de infiltração está relacionado com o número de manifestações extraglandulares da SS, ANA, e com os anticorpos antiSSA/Ro e antiSSB/La (Cartee et al, 2015).

A técnica imunoistoquímica se mostra relevante na detecção de CGs (inclusive nos estágios iniciais de formação, não visualizados pela análise morfológica convencional) nos infiltrados linfocíticos multifocais observados nas GS<sub>m</sub> na SS. O antígeno CD10 é uma enzima proteolítica encontrada na membrana de linfócitos B em maturação nos CGs, bem como em linfomas derivados destas estruturas. O antígeno CD23 é encontrado numa variedade de células, incluindo as células dendríticas foliculares, constituinte fundamental do arcabouço dos folículos linfoides com função de processamento e apresentação de antígenos. O antígeno Bcl-6 é expresso no núcleo de células B durante a sua diferenciação, e seu papel está associado ao desenvolvimento e função de CGs, coordenando as ações das células B e T. Dessa forma, a utilização destes imunomarcadores é útil para detectar a presença de CGs, inclusive aqueles em fase inicial de formação, aumentando a sensibilidade com impacto no protocolo terapêutico e prognóstico desses pacientes (Johnsen et al., 2014; Christodoulou et al., 2010).

## 2. PROPOSIÇÃO

O presente estudo tem como objetivo geral determinar a quantidade e localização dos centros germinativos utilizando as análises morfológica e imunohistoquímica, verificar a correlação entre o escore focal e a presença de centros germinativos, e determinar a área dos focos em glândulas salivares menores de pacientes com síndrome de Sjogren primária.

O presente estudo tem como objetivos específicos:

- 1- Obtenção do escore focal de cada biópsia de glândula salivar menor com diagnóstico de síndrome de Sjogren e avaliar sua correlação com a presença de centros germinativos;
- 2- Localizar e quantificar os centros germinativos presentes nas biópsias, através das técnicas morfológica (coloração histoquímica de hematoxilina e eosina [H&E]) e imunohistoquímica (utilizando os marcadores CD10, CD23 e bcl-6);
- 3- Determinar a área ocupada pelos focos.

### 3. MATERIAL E MÉTODO

#### 3.1 – Seleção da amostra.

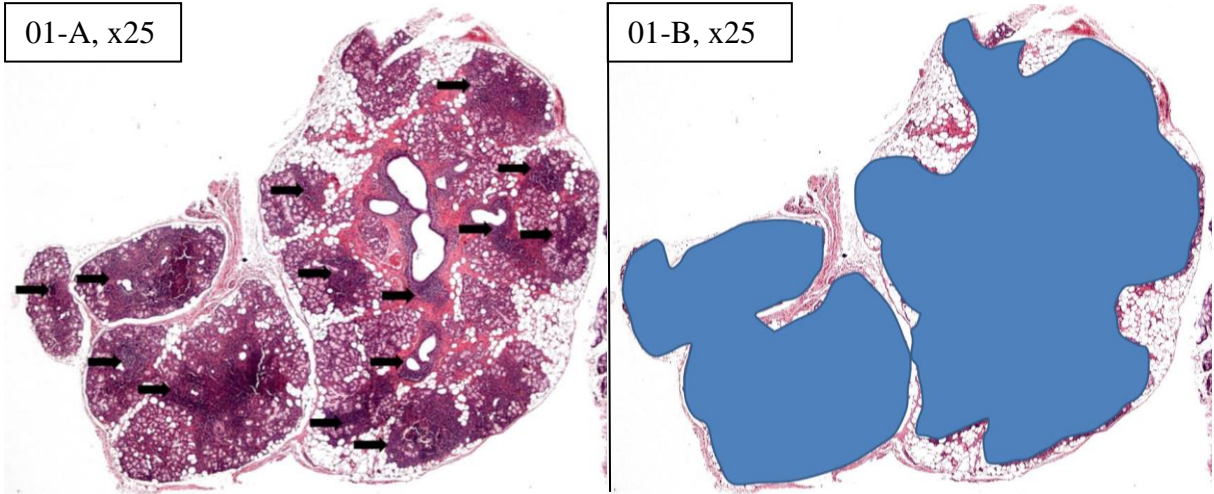
A obtenção dos dados clínicos das amostras foi realizada através dos formulários clínicos de encaminhamento das biópsias ao Laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (FMRP-USP). Em todos os casos fornecidos, o procedimento clínico utilizado para obtenção dos tecidos foi biópsia excisional de 5 a 7 GSm de lábio inferior, com as quais foram confeccionados blocos de parafina de biópsia no Laboratório de Patologia da FMRP-USP. Foi feita a seleção dos casos diagnosticados com SS, além da avaliação histopatológica dos mesmos em lâminas coradas com H&E, enfatizando a análise do infiltrado linfocitário focal ou multifocal. Buscando confirmar o diagnóstico de SS, foi feita uma revisão histopatológica detalhada das lâminas coradas com H&E, enfatizando a análise do infiltrado linfocitário focal ou multifocal.

Para a seleção, foram escolhidos os casos que apresentaram informações clínicas completas, com disponibilidade de tecido em parafina, tendo como critério de exclusão eventuais casos com alterações na fixação e/ou processamento do tecido, bem como qualquer caso com história de tratamento local ou sistêmico.

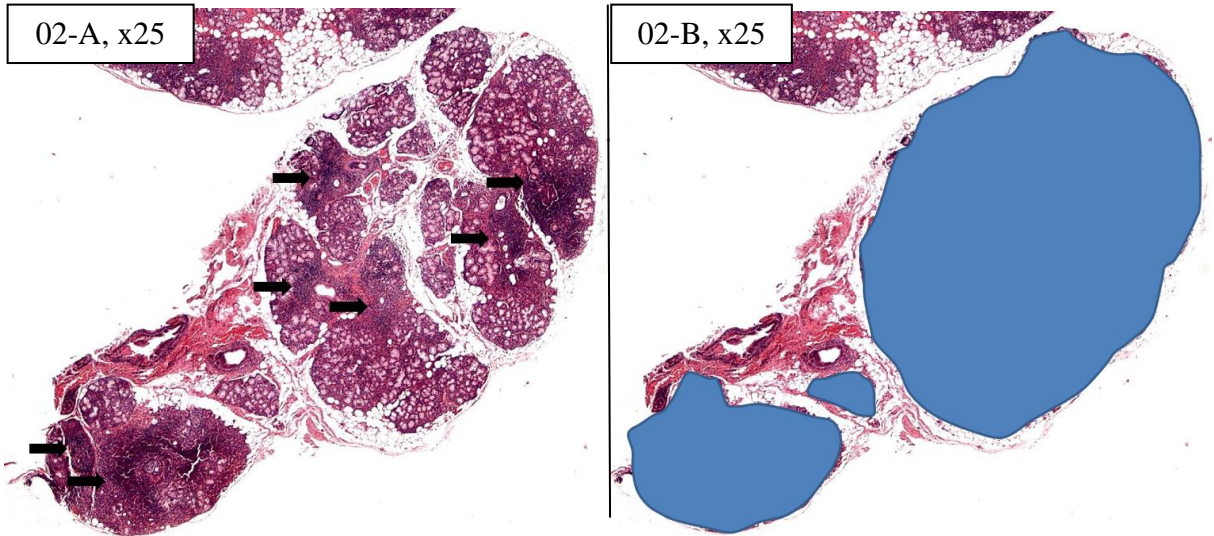
Foram selecionados 50 casos diagnosticados como SS (blocos de parafina de biópsia, n=50), nos quais foram observados os infiltrados linfocíticos característicos da doença, utilizando as lâminas coradas com H&E para análise dessas características morfológicas. Todos apresentaram um  $EF > 1$ , tornando-os compatíveis com SS (Shiboski et al., 2017; Vitali et al., 2002).

#### 3.2 – Análise histopatológica das lâminas coradas com H&E e obtenção do EF.

Para obtenção do EF, foi realizada primeiramente a documentação fotográfica de toda a área glandular de cada caso, em aumento de x25. Em seguida, foi feita a contagem dos focos (**figura 01-A**), e a medição da área total das glândulas utilizando o *software* IM-60, excluindo os tecidos gorduroso, epitelial e conjuntivo (**figura 01-B**).



**Figuras 01-A e 01-B.** Imagens microscópicas de GSM mostrando SLF, evidenciando os focos (Figura 01-A, x25, setas) e demonstrando a medição da área glandular (Figura 01-B, x25).



**Figuras 02-A e 02-B.** Imagens microscópicas de GSM mostrando SLF, evidenciando os focos (Figura 02-A, x25, setas) e demonstrando a medição da área glandular (Figura 02-B, x25).

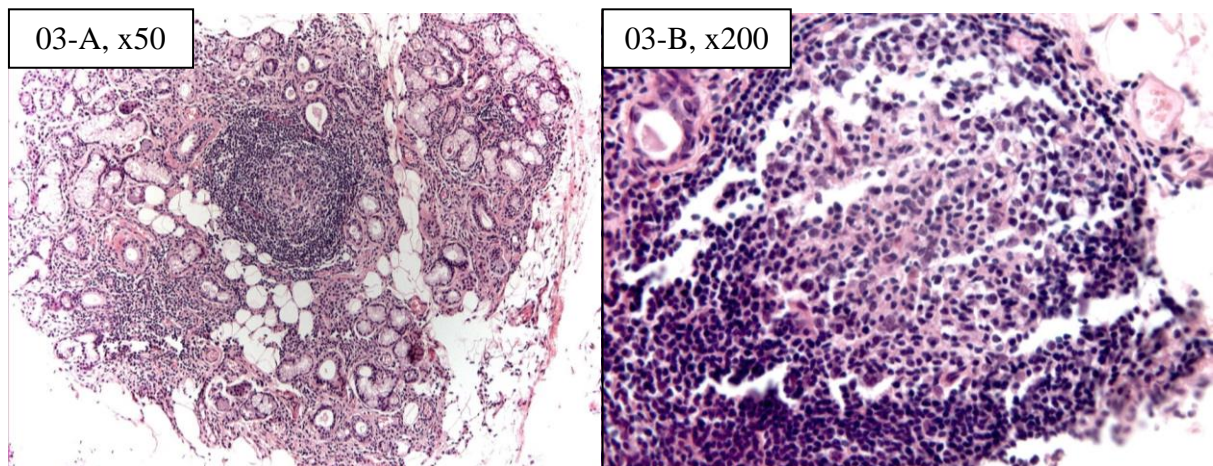
Finalmente, baseado nesses dois valores (número de focos e área total da glândula salivar menor) foi aplicada para cada caso a seguinte proporção:

$\frac{\text{n}^\circ \text{ total de focos}}{\text{X focos}} = \frac{\text{área total da glândula}}{4 \text{ mm}^2}$
---

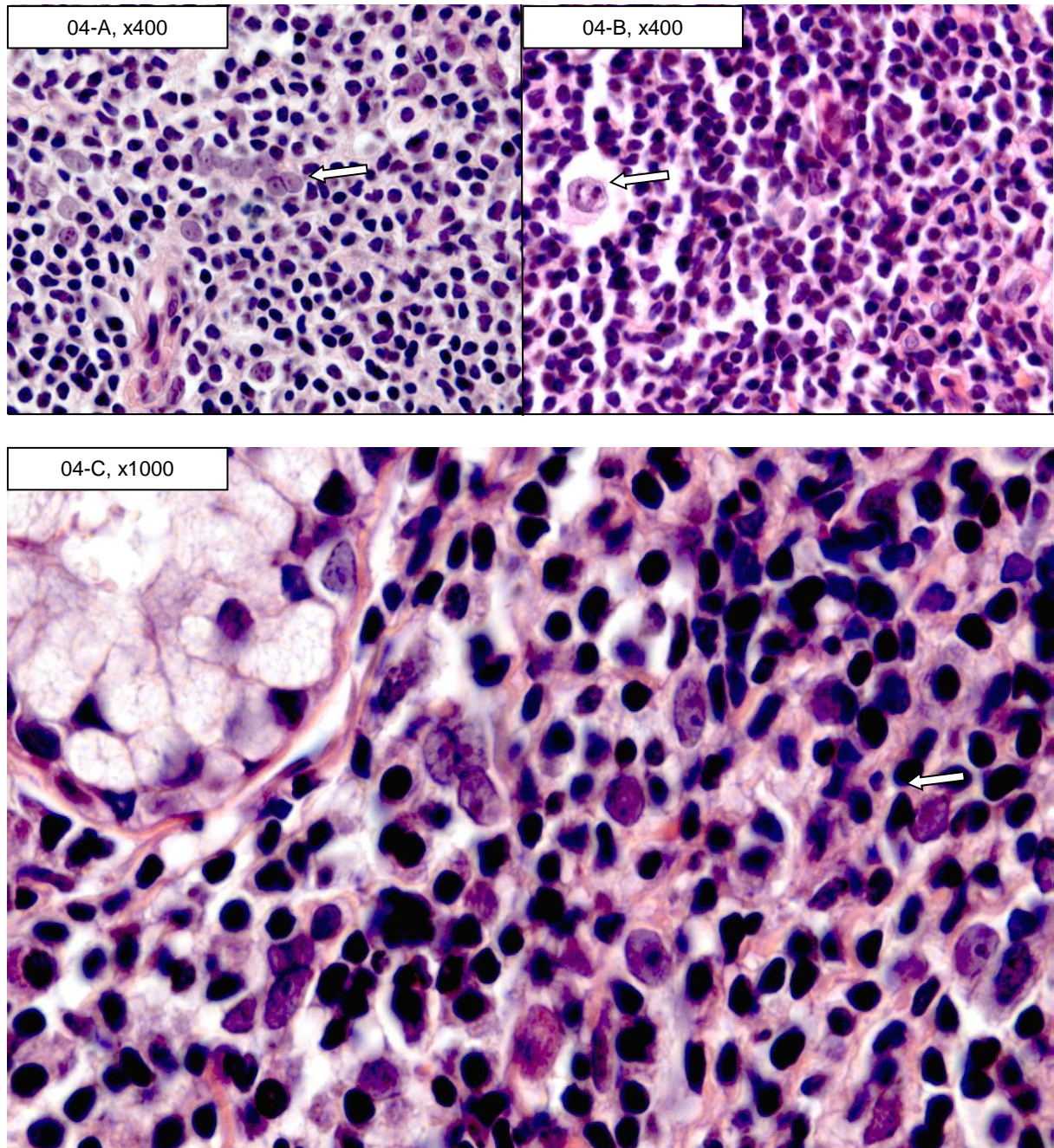
na qual o valor de X indicará o EF.

### 3.3 – Contagem dos CGs consolidados e incipientes pela análise morfológica da coloração H&E.

Foi realizada contagem dos CGs, dividindo os mesmos em duas categorias: CGs consolidados, os quais podem ser visualizados em menor aumento (x50 e x200) como uma área mais clara dentro de um foco (**Figuras 03-A e 3-B**); e CGs em formação, os quais necessitam de uma análise mais detalhada para serem detectados, apresentando, em grande aumento (x400 e x1000), células dendríticas foliculares (**Figura 04-A**), centroblastos (**Figura 04-B**) e macrófagos de corpo tingível (**Figura 04-C**).



**Figuras 03-A e 03-B.** Imagens microscópicas de GSm mostrando CG consolidado (Figura 03-A, x50, seta). A mesma área em maior aumento (Figura 03-B, x 400).



**Figuras 04-A, 04-B e 04-C.** Imagens microscópicas de GSM evidenciando células dendríticas foliculares (Figura 04-A, x 400, seta), um centroblasto (Figura 04-B, x 400, seta) e macrófagos de corpo tingível (Figura 04-C, x1000, seta).

### **3.4 – Contagem dos CGs consolidados e incipientes pela análise imunoistoquímica: CD10, CD23 e Bcl-6.**

Primeiramente, foi realizada padronização das reações de imunoistoquímica para os marcadores CD10, CD23 e Bcl-6, empregando tonsila palatina como controle, utilizando três (03) anticorpos primários: CD10, CD23 e Bcl-6. Os

anticorpos CD10, CD23 e Bcl-6 permitem avaliar a presença, tamanho e quantidade de CGs nas biópsias de GSMs.

Assim, após várias tentativas no processo de padronização, foi definido o seguinte protocolo imunistoquímico:

- 4- Lâminas revestidas com organo-silano (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA).
- 5- Recuperação antigênica: usando a solução buffer pH ácido (Citrato Buffer, Target Retrieval Solution, pH 6.0).
- 6- Diluições: CD10 (clone 56C6, diluição 1:500, Leica Biosystems, Newcastle Upon-Tyne, England); CD23 (clone 1B12, diluição 1:500, Leica Biosystems, Newcastle-Upon-Tyne, England ); e Bcl-6 (clone LN22 , diluição 1:200, Leica Biosystems Newcastle-Upon-Tyne, England).
- 7- Diluente: usado para os anticorpos primários (DAKO; Antibody Diluent with Background-Reducing Components).
- 8- Método da estreptavidina-biotina-peroxidase (Universal LSAB™+ Kit/HRP, Rb/Mo/Goat, K0690, Dako): para avaliar os anticorpos primários individuais.

A avaliação das lâminas foi feita, primeiramente em aumento de x100, e em seguida foram avaliadas mais minuciosamente nos aumentos de x200 e x400 para detectar CGs incipientes ou em estágio inicial de formação. As áreas com imunopositividade foram selecionadas e registradas num campo microscópico de x400 (0,785mm<sup>2</sup>). Foram realizadas contagens independentes de CGs para cada caso.

### **3.5 – Determinação da área dos focos**

Para determinação da área ocupada pelos focos, foi realizada a medição da área ocupada pelos focos utilizando o *software* IM-60, em todos os casos estudados. Em seguida, o valor obtido foi multiplicado por 100 e dividido pela área total da glândula, obtendo-se um valor em porcentagem, que indica o grau de infiltração.



### **3.6 - Análise Estatística**

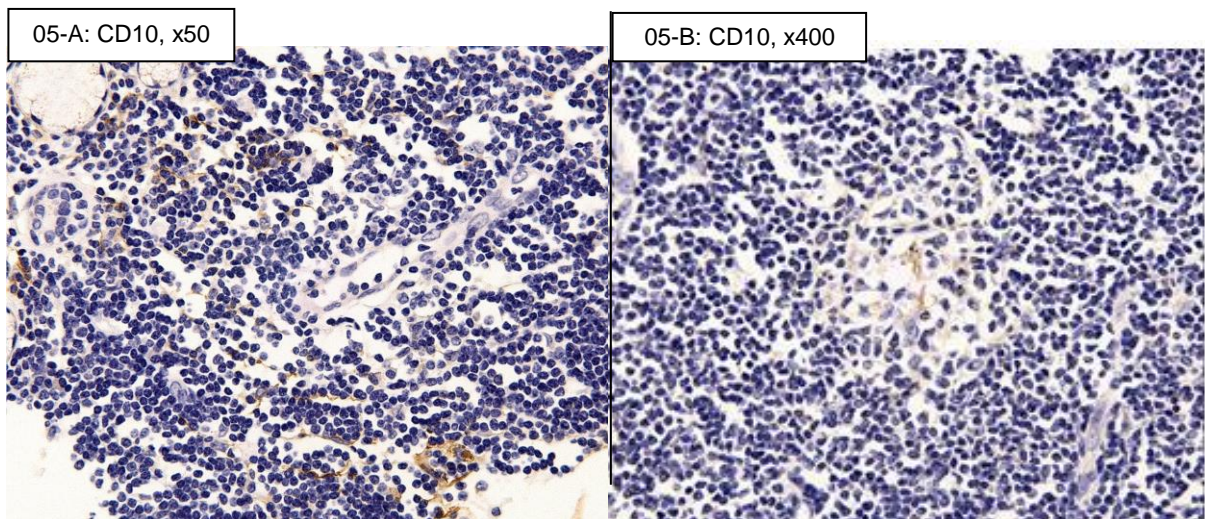
Foi realizada análise estatística dos dados obtidos utilizando o Teste U de Mann-Whitney e o Coeficiente de correlação de Spearman, adotando uma significância de 5%, por meio do software SAS.

Foi testada a correlação entre o valor do EF, número de focos e área dos focos com o número de CGs.

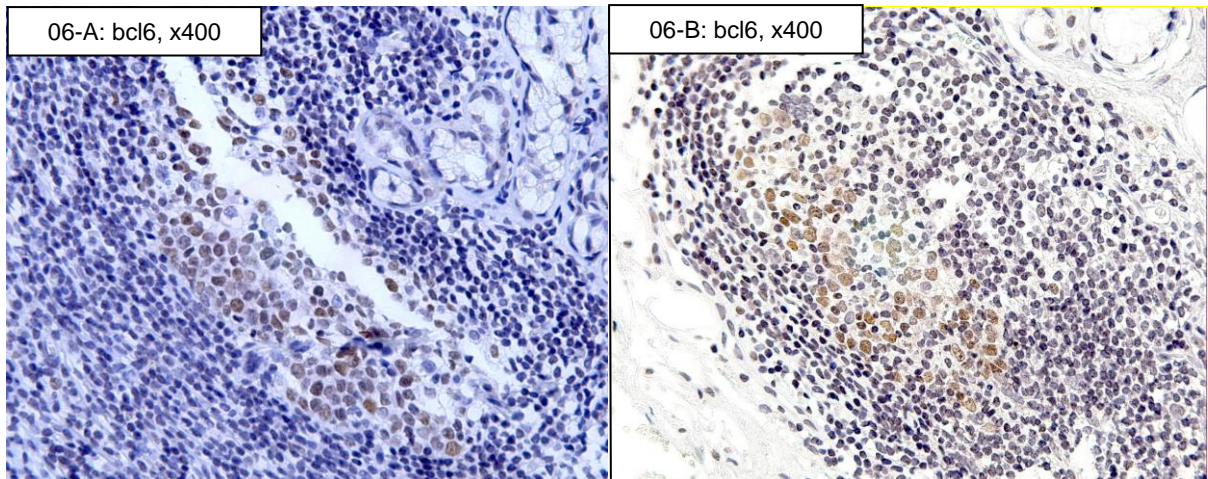
## 4. RESULTADOS

Dentre os 50 casos analisados, 46 corresponderam ao gênero feminino e 4 ao gênero masculino, com intervalo de idade de 12 a 77 anos. Todos os casos analisados mostraram um  $EF > 1$ , variando entre 1,1 e 11,4 (média de 3,4). A média do número de focos encontrados para cada caso foi de 12,2. Na análise morfológica, 42% dos casos apresentaram CGs consolidados, já 72% apresentaram CGs em formação. O número médio de CGs consolidados nos casos estudados foi de 3,8. O marcador CD23 mostrou-se mais sensível na detecção destas estruturas, confirmando os achados morfológicos. Já o marcador CD10 foi fraco e inespecífico. Bcl-6 foi específico, porém a sensibilidade foi menor do que CD23. Os imunomarcadores foram capazes de detectar 48% de casos com CGs consolidados, representando um aumento de 6% em relação à análise morfológica. Além disso, houve correlação estatisticamente significativa entre o EF, número de focos e área dos focos com a presença de CGs consolidados ( $p < 0,05$ ). A média de área ocupada pelos focos nos casos observados foi de 17% da área total da glândula.

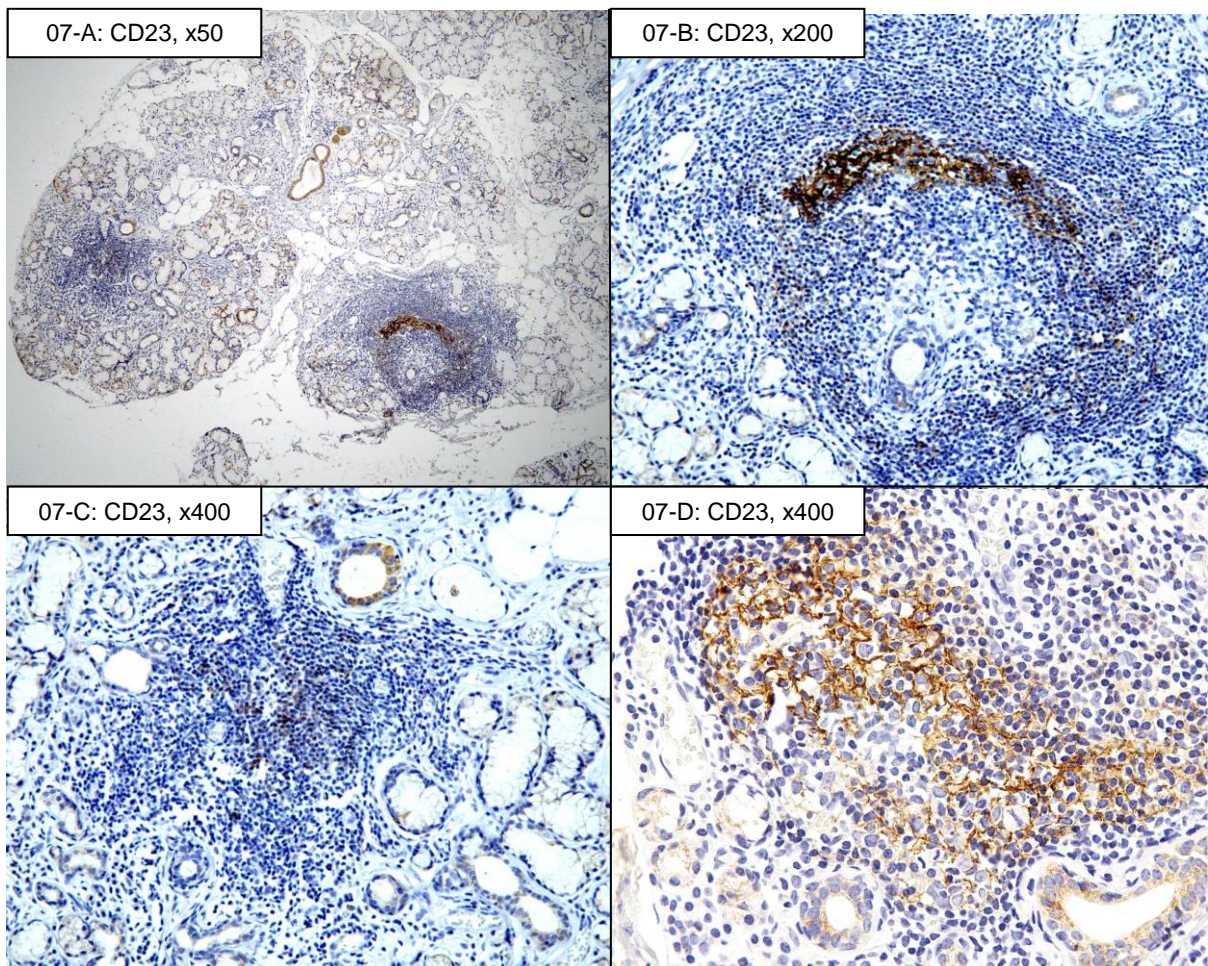
### 4.1 – Documentação fotográfica das lâminas coradas em H&E.



Figuras 05-A e 05-B. Imagens microscópicas de GS<sub>m</sub> mostrando células com positividade para CD10 (cor marrom) evidenciando a presença de CGs (Figura 05-A, x400; Figura 05-B, x400).



**Figuras 06-A e 06-B.** Imagens microscópicas de GSm mostrando centroblastos com positividade para Bcl-6 (cor marrom), evidenciando a presença de um CG (Figura 06-A, x400; Figura 06-B, x400).



**Figuras 07-A, 07-B e 07-C.** Imagens microscópicas de GSm contendo células dendríticas foliculares positivas para CD23 (cor marrom), evidenciando a presença de CGs (Figura 07-A, x50; Figura 07-B, x200; Figura 07-C, x400; Figura 07-D, x400).

## 4.2 – Tabulação dos Resultados

**Tabela 1.** Caracterização do escore focal (EF), área dos focos e a presença de centros germinativos (CGs) encontrados com a coloração H&E, no presente estudo.

Caso	Focos	Centros Germinativos			Área Total da Glândula (mm <sup>2</sup> )	Escore Focal	Área dos Focos (mm <sup>2</sup> )
		HE					
		C	F	T			
01	20	0	3	3	16,45	4,9	6,1
02	13	0	2	2	22,2	2,3	1
03	25	6	4	10	30,3	3,3	11,8
04	16	2	2	4	16,4	3,9	2,7
05	6	0	0	0	8,3	2,9	0,45
06	4	0	0	0	8,7	1,8	0,35
07	3	0	0	0	3,3	3,6	0,5
08	5	0	0	0	9,7	2,1	0,5
09	6	1	2	3	13,8	1,7	0,3
10	5	0	1	1	14,5	1,4	0,35
11	13	1	1	2	13,1	4,0	3,1
12	26	6	3	9	34,7	3,0	5,5
13	22	9	0	9	23,5	3,7	4
14	4	0	0	0	6,5	2,5	1
15	12	3	2	5	44,5	1,1	0,5
16	5	1	1	2	6,5	3,1	1,2
17	11	1	0	1	10,4	4,2	1,8
18	14	0	2	2	22,8	2,5	1,5
19	11	2	0	2	14,1	3,1	1,1
20	7	1	4	5	12,3	2,3	3,8
21	9	3	2	5	7,2	5,0	1,2
22	5	1	0	1	3,45	5,8	1,6
23	45	8	7	15	32	5,6	11
24	15	6	4	10	26,6	2,3	0,7
25	18	0	3	3	20,8	3,5	4,1
26	23	2	8	10	32,15	2,9	7
27	18	6	3	9	32	2,3	13,2
28	4	0	0	0	2,25	7,1	0,3
29	9	0	1	1	18,65	1,9	1
30	4	0	2	2	9,6	1,7	0,4
31	12	0	3	3	11,3	4,2	1,3
32	5	2	2	4	9,1	2,2	3,7
33	10	1	5	6	22,6	1,8	2,4
34	16	3	3	6	35,5	1,8	1,5
35	15	2	5	7	16,6	3,6	3,5
36	13	1	4	5	20,9	2,5	2
37	3	0	0	0	9,65	1,2	0,2

38	10	0	6	6	3,5	11,4	1,8
39	12	2	3	5	10,7	4,5	1
40	7	3	2	5	20,85	1,3	1,5
41	5	0	2	2	7,4	2,7	0,6
42	29	7	5	12	36,5	3,2	5,3
43	10	1	0	1	7,7	5,2	2,6
44	11	1	1	2	39	1,1	1,3
45	4	1	0	1	11,65	1,4	1,5
46	15	2	4	6	12,85	4,7	1,6
47	16	1	1	2	17,2	3,7	1,5
48	6	0	2	2	5,9	4,1	0,5
49	11	0	4	4	4,5	9,8	2
50	21	2	4	6	12,85	6,5	4,5

**Legenda:** C= consolidado, F= em formação, T=total.

## 5. DISCUSSÃO

No presente estudo avaliamos 50 casos diagnosticados com SS primária, dos quais 46 corresponderam ao gênero feminino e 4 ao gênero masculino, com intervalo de idade de 12 a 77 anos. Todos os casos analisados mostraram um EF>1 (variando entre 1,1 e 11,4, com média de 3,4). A média do número de focos foi de 12,2. Na análise morfológica, 42% dos casos apresentaram CGs consolidados, corroborando resultados de estudos anteriores. Já 72% dos casos apresentaram CGs em formação.

O marcador CD23 mostrou-se mais sensível na detecção destas estruturas, confirmando os achados morfológicos. Já o marcador CD10 foi fraco e inespecífico. Bcl-6 foi específico, porém a sensibilidade foi menor do que CD23. Assim, o marcador mais confiável para detecção de CGs em nosso estudo foi CD23, seguido por Bcl-6. O marcador CD10, pelos nossos resultados, não é recomendável para avaliar CGs nas GSms na SS. Os imunomarcadores foram capazes de detectar 48% de casos com CGs consolidados (um aumento de 6% em relação à análise morfológica). Estes resultados mostram a importância da utilização dos marcadores imunohistoquímicos para maior detecção de CGs.

Além disso, mostramos que as GSm (no presente estudo) e glândulas salivares maiores (GSM) (Bomdardieri et al. 2007) na SS podem exibir uma frequência similar de CGs ectópicos, e que a imunohistoquímica confirma os achados morfológicos, além de detectar outros casos pouco evidentes na coloração de H&E. Vários estudos mostram que a presença de CGs nas GSm na SS está associado com valor preditivo significativo (16%) para desenvolver linfoma, especialmente o tipo MALT. Assim, devido a estas implicações, uma análise cuidadosa destas estruturas microscópicas é recomendada e sua presença deve ser incluída no laudo histopatológico de pacientes com SS.

O grau médio de infiltração é em torno de 6,4% (Gerli et al, 1997). O grau de infiltração está relacionado com o número de manifestações extraglandulares da SS, ANA, e com os anticorpos antiSSA/Ro e antiSSB/La. Neste trabalho, a média de área ocupada pelos focos foi de 17%.

### 5.1 – Lista de publicações avaliando a frequência de CGs em GSm/GSM na síndrome de Sjogren.

**Tabela 2.** Publicações científicas avaliando a presença de centros germinativos (CGs) na SS. (Pesquisa no site Pubmed com as palavras-chave “germinal center sjogren syndrome”)

Artigo	Ano	Biópsia	Autor	Frequência de CGs
1	2018	GSm	Sène et al.	16,5%
2	2017	GSm	He et al.	28,6%
3	2017	GSm	Haacke et al.	18,0%
4	2016	GSm	Lee et al.	30,1%
5	2014	GSm	Johnsen et al.	43,0%
6	2011	GSm	Theander et al.	24,6%
7	2011	GSm	Szyszkowski et al.	33,3%
8	2009	GSm	Reksten et al.	23,5%
9	2009	GSm	Le Pottier et al.	27,5%
10	2009	GSm	Gatumu et al.	58,8%
11	2008	GSm	Jonsson et al.	18,3%
12	2007	GSm	Manoussakis et al.	19,0%
13	2007	GSm e GSM	Bomdardieri et al.	42,1%
14	2007	GSm	Jonsson et al.	27,8%
15	2006	GSm	Daridon et al.	39,9%
16	2005a	GSm	Jonsson et al.	25,4%
17	2005b	GSm	Jonsson et al.	54,5%
18	2005	GSm	Szodoray et al.	42,1%

Conforme evidenciado pela Tabela 1, os resultados do presente estudo mostram similaridade com os estudos de Johnsen et al. (2016), Bomdardieri et al. (2007) e Szodoray et al. (2005).

## **6. CONCLUSÕES**

**6.1.** Em conformidade com estudos prévios da literatura científica (**Tabela 1**), foi observada alta frequência de CGs (42% e 48%, pela morfológica e imunoistoquímica, respectivamente) nas GSm na SS.

**6.2.** Nossos resultados sugerem uma histopatologia similar das GSm e GSM na SS, em relação à formação e detecção de CGs.

**6.3.** Considerando que recentes estudos ressaltam a importância de incluir a presença ou ausência de CGs no laudo histopatológico da SLF na SS, nosso estudo fornece bases morfológicas e imunoistoquímicas da caracterização destas importantes estruturas microscópicas com impacto prognóstico na SS.

**6.4.** Corroborando estudos anteriores, nossos resultados mostram correlação entre o EF, número de focos e área dos focos com a presença de CGs em GSm na SS.



## **7. APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA.**

Este trabalho faz parte do projeto de pesquisa “Estudo imunoistoquímico e distribuição tissular de subpopulações de células dendríticas e linfócitos B e T na síndrome de Sjogren” (CAAE: 68748117.0.0000.5440).

## 8. REFERÊNCIAS

1. Amft N, Curnow SJ, Scheel-Toellner D, et al. Ectopic expression of the B cell-attracting chemokine BCA-1 (CXCL13) on endothelial cells and within lymphoid follicles contributes to the establishment of germinal center-like structures in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 2001 Nov;44(11):2633-41.
2. Bowman SJ. Biologic therapies in primary Sjogren's syndrome. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012 Aug;13(10):1997-2008.
3. Bombardieri M, Barone F, Humby F, et al. Activation-induced cytidine deaminase expression in follicular dendritic cell networks and interfollicular large B cells supports functionality of ectopic lymphoid neogenesis in autoimmune sialoadenitis and MALT lymphoma in Sjögren's syndrome. *J Immunol.* 2007 Oct 1;179(7):4929-38.
4. Brito-Zerón P, Ramos-Casals M; EULAR-SS task force group. Advances in the understanding and treatment of systemic complications in Sjögren's syndrome. *Curr Opin Rheumatol.* 2014 Sep;26(5):520-7
5. Cartee DL, Maker S, Dalonges D, et al. Sjögren's Syndrome: Oral Manifestations and Treatment, a Dental Perspective. *J Dent Hyg.* 2015 Dec;89(6):365-71.
6. Christodoulou M, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM. Characteristics of the minor salivary gland infiltrates in Sjögren's syndrome *J Autoimmune.* 2010 Jun;34(4):400-7.
7. Clio P. Mavragani, MD and Haralampos M. Moutsopoulos, MD. Sjögren syndrome. *CMAJ.* 2014 Oct 21; 186(15):
8. Daniels TE, Cox D, Shiboski CH et al. Associations between salivary gland histopathologic diagnoses and phenotypic features of Sjögren's syndrome among 1,726 registry participants. *Arthritis Rheum.* 2011 Jul;63(7):2021-30.
9. Daniels TE, Fox PC. Salivary and oral components of Sjögren's syndrome. *Rheum Dis Clin North Am.* 1992 Aug;18(3):571-89.
10. Daridon C, Pers JO, Devauchelle V, et al. Identification of transitional type II B cells in the salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 2006. *Arthritis Rheum.* 2006 Jul;54(7):2280-8.
11. Dinescu ȘC, ForȚofoiu MC, Bumbea AM, et al. Histopathological and immunohistochemical profile in primary Sjögren's syndrome. *Rom J Morphol Embryol.* 2017;58(2):409-417.

12. Fisher BA, Brown RM, Bowman SJ, Barone F. A review of salivary gland histopathology in primary Sjögren's syndrome with a focus on its potential as a clinical trials biomarker. *Ann Rheum Dis.* 2015 Sep;74(9):1645-50. doi: 10.1136/annrheumdis-2015-207499. Epub 2015 Jun 1.
13. Fisher BA, Jonsson R, Daniels T, et al. Standardisation of labial salivary gland histopathology in clinical trials in primary Sjögren's syndrome. *ARD Online First*, published on December 13, 2016 as 10.1136/annrheumdis-2016-210448.
14. Gatumu MK, Jonsson MV, Øijordsbakken G, Skarstein K. Nuclear BCL10 in primary Sjögren's syndrome. *J Oral Pathol Med.* 2009 Jul;38(6):501-7.
15. Gerli R, Muscat C, Giansanti M, et al. Quantitative assessment of salivary gland inflammatory infiltration in primary Sjögren's syndrome: its relationship to different demographic, clinical and serological features of the disorder. *Br J Rheumatol* 1997; 36 969-75.
16. Grossman S, Tagliavini LB. Managing Sjögren's Syndrome. *Home Healthc Now.* 2015 Oct;33(9):487-92.
17. Haacke EA, van der Vegt B, Vissink A, et al. Germinal centres in diagnostic labial gland biopsies of patients with primary Sjögren's syndrome are not predictive for parotid MALT lymphoma development. *Ann Rheum Dis.* 2017 Oct;76(10):1781-1784.
18. Haacke EA, van der Vegt B, Meiners PM, et al. Abatacept treatment of patients with primary Sjögren's syndrome results in a decrease of germinal centres in salivary gland tissue. *Clin Exp Rheumatol.* 2017 Mar-Apr;35(2):317-320.
19. He J, Jin Y, Zhang X, et al. Characteristics of germinal center-like structures in patients with Sjögren's syndrome. *Int J Rheum Dis.* 2017 Feb;20(2):245-251.
20. Jonsson MV, Skarstein K, Jonsson R, Brun JG. Serological implications of germinal center-like structures in primary Sjögren's syndrome. *J Rheumatol.* 2007 Oct;34(10):2044-9.
21. Johnsen SJ, Berget E, Jonsson MV, et al. Evaluation of germinal center-like structures and B cell clonality in patients with primary Sjögren syndrome with and without lymphoma. *J Rheumatol.* 2014 Nov;41(11):2214-22.
22. Jonsson MV, Skarstein K. Follicular dendritic cells confirm lymphoid organization in the minor salivary glands of primary Sjögren's syndrome. *J Oral Pathol Med.* 2008 Oct;37(9):515-21.
23. Jonsson MV, Szodoray P, Jellestad S, et al. Association between circulating levels of the novel TNF family members APRIL and BAFF and lymphoid organization in primary Sjögren's syndrome. *J Clin Immunol.* 2005 May;25(3):189-201.

24. Kapsogeorgou EK, Christodoulou MI, Panagiotakos DB, et al. Minor salivary gland inflammatory lesions in Sjögren syndrome: do they evolve? *J Rheumatol*. 2013 Sep;40(9):1566-71.
25. Lee KE, Kang JH, Yim YR, et al. The Significance of Ectopic Germinal Centers in the Minor Salivary Gland of Patients with Sjögren's Syndrome. *J Korean Med Sci*. 2016 Feb;31(2):190-5.
25. Le Pottier L, Devauchelle V, Fautrel A, et al. Ectopic germinal centers are rare in sjogren's syndrome salivary glands and do not exclude autoreactive B cells. *J Immunol*. 2009 Mar 15;182(6):3540-7.
26. Llamas-Gutierrez FJ, Reyes E, Martinez B, Henandez-Molina. Histopathological environment besides the focus score in Sjogren's syndrome. *International Journal of Rheumatic Diseases* 2014; 17: 898–903.
27. Manoussakis MN, Boiu S, Korkolopoulou P, et al. Rates of infiltration by macrophages and dendritic cells and expression of interleukin-18 and interleukin-12 in the chronic inflammatory lesions of Sjögren's syndrome: Correlation with certain features of immune hyperactivity and factors associated with high risk of lymphoma development. *Arthritis Rheum*. 2007 Dec;56(12):3977-88.
28. Nishishinya MB, Pereda CA, Muñoz-Fernández S, et al. Identification of lymphoma predictors in patients with primary Sjögren's syndrome: a systematic literature review and meta-analysis. *Rheumatol Int*. 2015 Jan;35(1):17-26.
29. Reksten TR, Jonsson MV, Szyszko EA, et al. Cytokine and autoantibody profiling related to histopathological features in primary sjogren's syndrome. *Rheumatology (Oxford)*. 2009 Sep;48(9):1102-6.
30. Risselada A, Loojie M, Knize A, et al. 2013. The role of ectopic germinal centers in the immunopathology of primary Sjogren's syndrome: a systematic review. *Semin Arthritis Rheum*. 2013;42:368-76.
31. Sada PR, Isenberg D, Ciurtin C. Biologic treatment in Sjögren's syndrome. *Rheumatology (Oxford)*. 2015 Feb;54(2):219-30.
32. Saraux A, Pers JO, Devauchelle-Pensec V. Treatment of primary Sjögren syndrome. *Nat Rev Rheumatol*. 2016 Jul 14. doi: 10.1038/nrrheum.2016.100.
33. Sène D, Ismael S, Forien M, Charlotte F, Kaci R, Cacoub P, Diallo A, Dieudé P, Lioté F. Ectopic Germinal Center-Like Structures in Minor Salivary Gland Biopsy Tissue Predict Lymphoma Occurrence in Patients With Primary Sjögren's Syndrome. *Arthritis Rheumatol*. 2018 Sep;70(9):1481-1488. doi: 10.1002/art.40528. Epub 2018 Jul 29.

34. Shiboski CH, Shiboski SC, Seror R, et al; International Sjögren's Syndrome Criteria Working Group. 2016 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism classification criteria for primary Sjögren's syndrome: A consensus and data-driven methodology involving three international patient cohorts. *Ann Rheum Dis*. 2017 Jan;76(1):9-16.
35. Szodoray P, Alex P, Jonsson MV, et al. Distinct profiles of Sjögren's syndrome patients with ectopic salivary gland germinal centers revealed by serum cytokines and BAFF. *Clin Immunol*. 2005 Nov;117(2):168-76.
36. Szyszko EA, Brokstad KA, Oijordsbakken G, et al. Salivary glands of primary Sjögren's syndrome patients express factors vital for plasma cell survival. *Arthritis Res Ther*. 2011. Jan 7;13(1):R2.
37. Theander E, Henriksson G, Ljungberg O, et al. Lymphoma and other malignancies in primary Sjögren's syndrome: a cohort study on cancer incidence and lymphoma predictors. *Ann Rheum Dis*. 2006 Jun;65(6):796-803.
38. Theander E, Vasaitis L, Baecklund E et al. Lymphoid organisation in labial salivary gland biopsies is a possible predictor for the development of malignant lymphoma in primary Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis*. 2011 Aug;70(8):1363-8.
39. Valim V, Zandonade E, Pereira AM, et al. Primary Sjögren's syndrome prevalence in a major metropolitan area in Brazil. *Rev Bras Reumatol*. 2013 Feb;53(1):24-34.
40. Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, et al. European Study Group on Classification Criteria for Sjögren's Syndrome. Classification criteria for Sjögren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis*. 2002 Jun;61(6):554-8.
41. Vitali C, Bombardieri S, Moutsopoulos HM, et al. Preliminary criteria for the classification of Sjögren's syndrome: results of a prospective concerted action supported by the European Community. *Arthritis Rheum*. 1993 Mar;36(3):340-7.
42. Zintzaras E, Voulgarelis M, Moutsopoulos HM The risk of lymphoma development in autoimmune diseases: a meta-analysis. *Arch Intern Med*. 2005 Nov 14;165(20):2337-44.