

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



THAYNÁ MELO DE LIMA MORAIS

# ESTUDO CLÍNICO-PATOLÓGICO E IMUNOISTOQUÍMICO COMPARATIVO DOS ACHADOS HISTOLÓGICOS NAS GLÂNDULAS SALIVARES MENORES NA SÍNDROME DE SJÖGREN E NAS SIALOADENITES CRÔNICAS

# COMPARATIVE CLINICAL-PATHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF HISTOLOGICAL FINDINGS IN MINOR SALIVARY GLANDS IN SJÖGREN'S SYNDROME AND IN CHRONIC SIALOADENITIS

Piracicaba – SP 2022 THAYNÁ MELO DE LIMA MORAIS

# ESTUDO CLÍNICO-PATOLÓGICO E IMUNOISTOQUÍMICO COMPARATIVO DOS ACHADOS HISTOLÓGICOS NAS GLÂNDULAS SALIVARES MENORES NA SÍNDROME DE SJÖGREN E NAS SIALOADENITES CRÔNICAS

# COMPARATIVE CLINICAL-PATHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF HISTOLOGICAL FINDINGS IN MINOR SALIVARY GLANDS IN SJÖGREN'S SYNDROME AND IN CHRONIC SIALOADENITIS

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de doutora em Estomatopatologia, na Área de Patologia.

Thesis presented to the Piracicaba Dental School of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of doctor in Stomatopathology, in pathology area.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Ramôa Pires

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA THAYNÁ MELO DE LIMA MORAIS E ORIENTADA PELO PROF. DR. FÁBIO RAMÔA PIRES

> Piracicaba – SP 2022

"Tudo o que fizerem, seja em palavra seja em ação, façam-no em nome do Senhor Jesus, dando por meio dele graças a Deus Pai".

Colossenses 3:17

#### Agência(s) de formento e nº(s) de processo: Capes, 88882.329960/2019-01

Ficha catalográfica Universidade Estadual de Campinas Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba Marilene Girello - CRB 8/6159

M792e	Morais, Thayná Melo de Lima, 1993- Estudo clínico-patológico e imunoistoquímico comparativo dos achados histológicos nas glândulas salivares menores na síndrome de Sjögren e nas sialoadenites crônicas / Thayná Melo de Lima Morais. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2022.
	Orientador: Fábio Ramôa Pires. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.
	<ol> <li>Síndrome de Sjogren. 2. Glândulas salivares menores. 3. Sialoadenite.</li> <li>Histologia. 5. Imuno-histoquímica. I. Pires, Fábio Ramôa. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.</li> </ol>

#### Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Comparative clinical-pathological and immunohistochemical study of histological findings in minor salivary glands in Sjögren's syndrome and in chronic sialoadenitis Palavras-chave em inglês: Sjogren's syndrome Salivary glands, minor Sialadenitis Histology Immunohistochemistry Área de concentração: Patologia Titulação: Doutora em Estomatopatologia Banca examinadora: Fábio Ramôa Pires [Orientador] Pablo Agustin Vargas Luiz Alcino Monteiro Gueiros Sonia Maria Soares Ferreira Aline Corrêa Abrahão Data de defesa: 14-04-2022 Programa de Pós-Graduação: Estomatopatologia

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a) - ORCID do autor: https://orcid.org/0000-0002-2997-8016 - Currículo Lattes do autor: http://lattes.cnpq.br/6332504451335257



# UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS Faculdade de Odontologia de Piracicaba

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 14 de abril de 2022, considerou a candidata THAYNÁ MELO DE LIMA MORAIS aprovada.

PROF. DR. FÁBIO RAMÔA PIRES

PROF. DR. LUIZ ALCINO MONTEIRO GUEIROS

PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. SONIA MARIA SOARES FERREIRA

PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. ALINE CORRÊA ABRAHÃO

PROF. DR. PABLO AGUSTIN VARGAS

A Ata da defesa, assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

## DEDICATÓRIA

Esta tese é dedicada às pessoas mais importantes da minha vida: minha família. Mãe, pai, Jorge Neto, Maria José (Zezé), Janeyd, Pedro Henrique, Maria Júlia e Lucas Daniel. Amo todos vocês mais do que consigo colocar em palavras.

Esta tese é dedicada à memória do meu avô/pai, Jorge Ferreira de Lima.

#### AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas, na pessoa do Magnífico Reitor, Prof. Dr. Marcelo Knobel.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa de seu Diretor, Prof. Dr. Francisco Haiter Neto e seu Diretor Associado, Prof. Dr. Flávio Henrique Baggio Aguiar.

À Profa. Dra. Karina Gonzales Silvério Ruiz, Coordenadora Geral da Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

Ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia, Prof. Dr. Pablo Agustin Vargas.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fábio Ramoa Pires, pela credibilidade dada e por seus ensinamentos. Admiro muito sua carreira, sua competência e comprometimento profissional. Fico honrada de ser sua orientanda e de aprender com o senhor. Obrigada por se preocupar sempre com meu crescimento profissional.

Aos Profs. Drs. das áreas de Semiologia e Patologia: Alan Roger dos Santos Silva, Edgard Graner, Jacks Jorge Júnior, Márcio Ajudarte Lopes, Oslei Paes de Almeida, Pablo Agustin Vargas, Ricardo Della Colleta.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

#### AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Deus, em primeiríssimo lugar, por ter me dado o dom da vida, por ter colocado em meu caminho pessoas que me inspiram, me ajudam, me desafiam e me encorajam a ser uma pessoa melhor a cada dia. Agradeço ao Senhor por todas as coisas boas e ruins que me aconteceram, pois cada uma delas, ao seu modo, me fizeram chegar onde eu cheguei, e me fizeram ser quem sou hoje. Foi a minha jornada de tropeços, vitórias e derrotas, que me fez mais resiliente.

À minha família, especialmente aos meus pais, meus avós e meu irmão.

Aos meus pais, Cícero Roberto de Morais e Janayna Melo de Lima Morais, pela vida, pelo amor incondicional e pelo apoio de sempre. Não tenho palavras para descrever o quanto sou grata e quão importantes vocês são. Além de tudo, o amor de vocês dedicado a mim torna-se uma peça fundamental para o fortalecimento das minhas conquistas. Saibam que vocês são meus exemplos de vida e minha fortaleza. Serei eternamente grata a Deus por ter me dado pais tão abençoados. Amo vocês.

A meu irmão Jorge Ferreira de Lima Neto pelo seu amor e seu companheirismo ao longo desta vida. Jorge Neto é meu exemplo diário de irmão, filho, neto e profissionalismo.

Aos meus avós, Jorge Ferreira de Lima (*in memorian*) e Maria José Melo de Lima (Zezé), por serem a razão de tudo isto hoje. Agradeço a vocês por toda educação, dedicação e amor. Apesar da distância física durante anos, vocês sempre estiveram em meu coração. Quero que saibam que abdiquei da presença de vocês como forma de retribuir tudo que me foi dado no passado, quero ser motivo de orgulho para vocês!

Agradeço a minha tia Janeyd Melo de Lima por ter contribuído com minha formação e por ter me presenteado com Pedro Henrique e Maria Júlia, motivo de vários sorrisos.

Agradeço, de forma especial, ao meu esposo Lucas que entrou em minha vida durante essa jornada. Faltam palavras para te agradecer por todo apoio durante a caminhada. Você tornou-se essencial no meu crescimento pessoal, espiritual e

profissional. Você é propósito em minha vida, te amo! Que Deus continue abençoando a sua vida e a nossa família!

Agradeço, especialmente, à Prof. Dra. Sonia Maria Soares Ferreira, minha eterna orientadora, por todo ensinamento dado, por contribuir na minha formação durante a graduação em odontologia e mesmo na pós-graduação e por sempre me motivar a crescer. Obrigada por sua amizade, a senhora é peça fundamental na minha formação profissional e pessoal.

Sou grata ao suporte que recebi no início da minha jornada laboratorial, em especial à Fabiana Facco Casarotti. Te desejo sucesso!

Aos meus amigos da pós-graduação, especialmente aqueles com quem mais convivi: Anna Luiza (Anninha), Jamille (Jham), Carla Rodrigues (Carlinha), Maria Eduarda (Duda), Cínthia, Klinger, Anne e Allen.

Aos amigos da igreja e da vida que me deram forças e foram essenciais durante a jornada: Jucimara, Pâmala, Mel, Maurício, Thaís Basso e Ana Júlia. Agradeço por cada conversa que tivemos, palavra motivacional e oração. Vocês são luz em minha vida!

#### RESUMO

A Síndrome de Sjögren (SS) é uma desordem autoimune crônica que afeta principalmente as glândulas salivares e lacrimais. A análise histológica das glândulas salivares de pacientes com SS mostra um infiltrado inflamatório crônico focal que é um importante critério diagnóstico para definir SS. No entanto, as alterações histológicas observadas nas glândulas na SS são de difícil interpretação e podem ser encontradas em outras sialodenites crônicas. O objetivo deste trabalho foi analisar comparativamente as características morfológicas e o infiltrado linfo-histiocitário dos focos inflamatórios encontrados na SS e em outras sialodenites crônicas sugestivas de SS. A amostra foi composta por 80 espécimes incluídos em parafina, sendo 20 casos de cada grupo: sialoadenite linfocítica focal associada à SS, sialoadenite crônica, sialoadenite crônica associada à hiperplasia fibrosa inflamatória e glândulas salivares menores normais. Reações imunoistoquímicas para CD3, CD20, CD4, CD8, CD68, CD163 e IL-17 foram realizadas. Todas as lâminas coradas em hematoxilina e eosina e da técnica imunoistoquímica foram digitalizadas em alta resolução de imagens usando o Aperio Scanscope CS Slide Scanner (Aperio Technologies Inc., Vista, Califórnia, EUA) e analisadas e comparadas entre os guatro grupos. O número médio de focos e o tamanho médio dos focos foram maiores na SS. As glândulas salivares menores da SS apresentaram maior frequência de dilatação ductal (p=0,000), infiltração perivascular (p=0,002) e periductal (p<0,001). A presença de células CD4+ foi mais comum na sialoadenite crônica inespecífica e na SS (p=0,002) e o escore de expressão de IL-17 foi maior na SS (p=0,000). Assim, os resultados do estudo mostraram que a distribuição dos focos inflamatórios dos grupos foi diferente. O número de focos, o tamanho médio dos focos, a dilatação ductal e a infiltração perivascular/periductal foram mais comuns na SS, além de maior expressão de CD3 e IL-17. Desta forma, os resultados sugerem que existem diferenças histológicas e imunoistoquímicas nos focos inflamatórios da SS e nas sialodenites crônicas sugestivas de SS.

**Palavras-chave:** Síndrome de Sjögren; glândulas salivares menores; sialoadenite crônica; histologia; imunoistoquímica; infiltrado inflamatório.

## ABSTRACT

Sjögren's Syndrome (SS) is a chronic autoimmune disorder that mainly affects the salivary and lacrimal glands. Histological analysis of salivary glands from patients with SS shows a focal chronic inflammatory infiltrate which is an important diagnostic criterion to define SS. However, the histological changes observed in the glands in SS are difficult to interpret and can be found in other chronic sialodenitis. The objective of this study was to comparatively analyze the morphological characteristics and the lymphohistiocytic infiltrate of the inflammatory foci found in SS and in other chronic sialodenitis suggestive of SS. The sample consisted of 80 paraffin-embedded specimens, including 20 cases each of focal lymphocytic sialadenitis associated with SS, chronic sialadenitis, chronic sialadenitis associated with inflammatory fibrous hyperplasia and normal minor salivary glands. Immunohistochemical reactions for CD3, CD20, CD4, CD8, CD68, CD163 and IL-17 were performed. All HE-stained and immunohistochemical slides were scanned into high resolution images using the Aperio Scanscope CS Slide Scanner (Aperio Technologies Inc., Vista, California, USA), and were analyzed and compared among the four groups. The mean number of foci and mean foci size were higher in SS. The minor salivary glands of SS had a higher frequency of ductal (p=0.000), perivascular (p=0.002) and periductal (p<0.001) dilatation. The presence of CD4+ cells was more common in nonspecific chronic sialoadenitis and in SS (p=0.002) and the IL-17 expression score was higher in SS (p=0.000). Thus, the results of the study showed that the distribution of inflammatory foci in the groups was different. Number of foci, mean foci size, ductal dilatation and perivascular/periductal infiltration were more common in SS, in addition to higher expression of CD3 and IL-17. Thus, the results suggest that there are histological and immunohistochemical differences in the inflammatory foci of SS and in chronic sialodenitis suggestive of SS.

**Keywords**: Sjögren's Syndrome; minor salivary glands; chronic sialadenitis; histology; immunohistochemistry; inflammatory infiltrate.

#### LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Figure 3.** Histological characteristics of the nonspecific chronic sialadenitis (NCS) and minor salivary glands in inflammatory fibrous hyperplasia (IFH). (a) Low-power view showing inflammatory foci in NCS (H&E, 4x). (b) Detail of inflammatory foci and ductal dilatation in NCS (H&E, 10x). (c) Periductal predominantly lymphocytic infiltrate in NCS (H&E, 40x). (d) Perivascular and periductal inflammatory infiltrate in IFH (H&E, 10x). (e) Detail of the predominantly lymphocytic infiltrate in IFH (H&E, 40x).

Figure 6. Immunohistochemical expression of CD68, CD163 and IL-17 in focal lymphocytic sialadenitis (FLS-SS), nonspecific chronic sialadenitis (NCS), minor

salivary glands associated with inflammatory fibrous hyperplasias (IFH), and	normal
minor salivary glands (NMSG)	45

#### LISTA DE TABELAS

**Table 1.** Distribution of the histological features in the four studied groups (FLS-SS -focal lymphocytic sialadenitis; NCS - nonspecific chronic sialoadenitis; NMSG - normalminor salivary glands; IFH - minor salivary glands associated with inflammatory fibroushyperplasias)38

## LISTA DE ABREVIATURAS

- FLS Focal lymphocytic sialadenitis
- IFH Inflammatory fibrous hyperplasia
- MSG Minor salivary gland
- NCS Nonspecific chronic sialadenitis
- NMSG Normal minor salivary gland
- SS Sjögren's syndrome

# SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 ARTIGO: Comparative study of the lymphohistiocytic infiltrate in Sjögre	en´s syndrome
and chronic sialadenitis	20
3 CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS	49
ANEXO 1 - Certificado do comitê de ética em pesquisa	51
ANEXO 2 - Comprovante de submissão do artigo	61
ANEXO 3 - Relatório de similaridade (Turnitin)	62

#### 1. INTRODUÇÃO

A Síndrome de Sjögren (SS) é uma doença inflamatória autoimune crônica que acomete com maior frequência glândulas exócrinas. A síndrome pode ser subclassificada como primária quando envolve apenas glândulas ou secundária quando está associada a uma doença subjacente ao tecido conjuntivo (artrite reumatoide ou lúpus eritematoso sistêmico) (Tincani, Andreoli, Cavazzana *et al.*, 2013).

O quadro histológico da SS assemelha-se a uma sialoadenite periductal crônica (Regezi, Sciubba & Jordan, 2017). Nos estágios iniciais da doença, agregados linfocitários aparecem nos lóbulos glandulares infiltrando espaços ao redor de pequenos ductos interlobulares/intralobulares e, posteriormente, provocam a involução atrófica dos ácinos. Na progressão da doença, o infiltrado inflamatório linfocitário se dissemina para o parênquima causando a perda da arquitetura tecidual. Além disso, os linfócitos provocam danos aos ductos com a formação de lesões epiteliais-mioepiteliais. Como resultado, um material hialino semelhante a membrana basal está presente no lúmen dos ductos (Tincani, Andreoli, Cavazzana *et al.*, 2013; Regezi, Sciubba & Jordan, 2017).

Embora as características histológicas da SS estejam bem estabelecidas na literatura, a etiopatogênese da SS e das sialoadenites crônicas inespecíficas permanecem obscuras. Estudos sugerem que a suscetibilidade a SS pode ser atribuída à fatores genéticos, ambientais e hormonais (Peri, Agmon-Levin, Theodor *et al.*, 2012; Ice, Li, Adrianto *et al.*, 2012), enquanto a sialoadenite crônica pode estar associada a doenças infecciosas e não infecciosas.

Quanto a SS, estudos têm mostrado que as reações e as respostas do hospedeiro na doença consistem na estimulação de uma rede de citocinas e quimiocinas, as quais envolvem o fator de necrose tumoral e interleucinas (D'Elia, Bjuman, Rehnberg *et al.*, 2009; Brito-Zerón, Baldini, Bootsma *et al.*, 2016).

Além disso, alguns autores descrevem a importância das células epiteliais glandulares em pacientes com SS, pois estas células dirigem e regulam as respostas auto-imunes locais mediando a acumulação, ativação e diferenciação de células imunes (Tzioutas, Kapsogeorgou & Moutsopoulos, 2012). As células imunes e o microambiente inflamatório ativam ainda mais as células epiteliais ou regulam sua

sobrevivência, criando um ciclo vicioso de interação entre células epiteliais e células imunes que perpetua as respostas autoimunes na SS (Moutsoupoulos, 1994; Hillen, Ververs, Kruize *et al.*, 2014).

Desta forma, pesquisas têm sugerido que as células epiteliais glandulares expressam uma grande quantidade de moléculas imunocompetentes que estão implicadas no recrutamento, ativação, diferenciação, proliferação, expansão e organização de células imunes. Estas moléculas incluem os antígenos leucocitários humanos, membros da superfamília 5 do fator de necrose tumoral, moléculas de adesão, receptor do fator de necrose tumoral 6, citocinas pró-inflamatórias, citocinas envolvidas na diferenciação de células linfoides e quimiocinas que atraem células T (Manoussakis & Kapsogeorgou, 2010; Tzioutas, Kapsogeorgou & Moutsopoulos, 2012; Hillen, Ververs, Kruize *et al.*, 2014).

Além disso, demonstrou-se que as células epiteliais glandulares ativam células TCD4+, in vitro, e medeiam sua diferenciação em células T auxiliares foliculares (Gong *et al.*, 2014), o que aumenta a sobrevivência de células B (Manoussakis & Kapsogeorgou, 2010; Tzioutas, Kapsogeorgou & Moutsopoulos, 2012; Youinou, Saraux & Pers, 2012). As células epiteliais glandulares também influenciam a diferenciação de células B (Brito-Zerón, Baldini, Bootsma *et al.*, 2016).

A ativação imune na SS pode ser desencadeada por células sentinelas, tais como células dentríticas, como sugerido no modelo experimental demonstrado por Hillen, Ververs, Kruize *et al.* (2014). A associação genética entre os antígenos leucocitários humanos e a patogênese da SS sugere o envolvimento das células T, por meio da secreção de interferon gama e da interleucina 17, os quais estão associados a danos teciduais (Nguyen, Hu, Li *et al.*, 2008; Bikker *et al.*, 2010).

Citocinas como a interleucina 7 são super expressas nas células epiteliais glandulares em paciente com SS. A interleucina 7 mostrou-se capaz ainda de direcionar as células T efetoras para induzirem sialodenite em camundongos (Jin, Kawai, Cha *et al.*, 2013). Outras citocinas também são super expressas na SS, tais como as interleucinas 7, 17, 21, 22 e 23 (Nocture & Mariette, 2013; Brito-Zerón, Baldini, Bootsma *et al.*, 2016). Estas citocinas têm demonstrado contribuir para a resposta anormal de células T/B e podem desempenhar papel crucial na SS aumentando a neurogênese linfoide (Nocture & Mariette, 2013; Hillen, Ververs, Kruize *et al.*, 2014; Aluno *et al.*, 2015).

Apesar do conhecimento sobre a ativação imunológica nos tecidos epiteliais na SS e, consequentemente, parte de sua fisiopatologia, ainda não se sabe ao certo os fatores que diferem a sialodenite crônica associada a SS das sialodenites crônicas inespecíficas associadas a outros fatores etiológicos. Além disso, existem poucos estudos na literatura que tenham avaliado as diferenças morfológicas existentes entre esses dois grupos, dificultando a compreensão de sua patogênese assim como limitando a sua utilização como parâmetro diagnóstico (Fisher *et al.*, 2017).

Desta forma, o presente estudo teve como objetivo analisar comparativamente as características morfológicas e o infiltrado linfo-histiocitário em glândulas salivares menores envolvidas pela síndrome de Sjögren e por outras sialodenites crônicas.

#### 2. ARTIGO

Comparative study of the lymphohistiocytic infiltrate in Sjögren's syndrome and chronic sialadenitis

#### Running title: Lymphohistiocytic infiltrate in Sjögren's syndrome

**Keywords:** Sjogren's syndrome; minor salivary glands; chronic sialadenitis; histology; immunohistochemistry; inflammatory infiltrate.

Thayná Melo de Lima Morais - Oral Pathology, Oral Diagnosis Department, Piracicaba Dental School, University of Campinas, Av. Limeira, 901, Areião, Piracicaba/SP, CEP 13414-903, Brazil. E-mail: <u>moraistml@gmail.com</u>

Carla Isabelly Rodrigues Fernandes - Oral Pathology, Oral Diagnosis Department, Piracicaba Dental School, University of Campinas, Av. Limeira, 901, Areião, Piracicaba/SP, CEP 13414-903, Brazil. E-mail: <u>carla.rodrigues212@gmail.com</u>

Anna Luíza Araujo Damaceno - Oral Pathology, Oral Diagnosis Department, Piracicaba Dental School, University of Campinas, Av. Limeira, 901, Areião, Piracicaba/SP, CEP 13414-903, Brazil. E-mail: <u>anna luizaf5ph@hotmail.com</u>

Teresa Cristina Ribeiro Bartholomeu dos Santos - Oral Pathology, Diagnosis and Therapeutics Department, Dental School, Rio de Janeiro State University, Av. 28 de Setembro, 157, Vila Isabel, Rio de Janeiro/RJ, CEP 20551-030, Brazil. E-mail: tcnath2507@gmail.com

Oslei Paes de Almeida - Oral Pathology, Oral Diagnosis Department, Piracicaba Dental School, University of Campinas, Av. Limeira, 901, Areião, Piracicaba/SP, CEP 13414-903, Brazil. E-mail: <u>oslei@fop.unicamp.br</u>

Fábio Râmoa Pires - Oral Pathology, Diagnosis and Therapeutics Department, Dental School, Rio de Janeiro State University, Av. 28 de Setembro, 157, Vila Isabel, Rio de Janeiro/RJ, CEP 20551-030, Brazil; and Oral Pathology, Oral Diagnosis Department, Piracicaba Dental School, University of Campinas, Av. Limeira, 901, Areião, Piracicaba/SP, CEP 13414-903, Brazil. E-mail: <a href="mailto:ramoafop@yahoo.com">ramoafop@yahoo.com</a>

**Corresponding author:** Fábio Râmoa Pires, DDS, PhD – Professor - Oral Pathology, Diagnosis and Therapeutics Department, Dental School, Rio de Janeiro State University, Av. 28 de Setembro, 157, Vila Isabel, Rio de Janeiro/RJ, CEP 20551-030, Brazil. Phone: + 55 21 2868-8284; Email: <u>ramoafop@yahoo.com</u>.

Date of submission: March 2<sup>nd</sup> 2022

#### ABSTRACT

The histological alterations observed in Sjogren's syndrome salivary glands are difficult to interpret and can be found in other chronic sialadenitis. Objective: To comparatively analyze the morphological features and the lymphohistiocytic infiltrate in minor salivary glands from Sjogren's syndrome and other chronic sialadenitis. Materials and Methods: Eighty paraffin-embedded specimens, including focal lymphocytic sialadenitis associated with Sjogren's syndrome, chronic sialadenitis, chronic sialadenitis associated to inflammatory fibrous hyperplasia, and normal minor salivary glands, were selected. Immunohistochemical reactions for CD3, CD20, CD4, CD8, CD68, CD163 and IL-17 were performed. HE-stained and immunohistochemical slides were compared among the four groups. Results: Mean foci number and mean focus size were higher in Sjogren's syndrome. Sjogren's syndrome minor salivary glands showed a higher frequency of duct dilatation (p=0.000), and perivascular (p=0.002) and periductal (p<0.001) infiltration. The presence of CD4+ cells was more common in nonspecific chronic sialadenitis and Sjogren's syndrome (p=0.002) and IL-17 expression score was higher in Sjogren's syndrome (p=0.000). Conclusion: there are histological and immunohistochemical differences in minor salivary glands from Sjogren's syndrome in comparison with nonspecific chronic sialadenitis, and their usefulness in both diagnosis and prognosis of the syndrome should be further evaluated.

#### INTRODUCTION

Sjogren's syndrome (SS) is an autoimmune disorder characterized by infiltration of the salivary and lacrimal glands by mononuclear cells, especially lymphocytes, causing xerostomia and xerophthalmia (Nocturne & Mariette, 2013; Bautista-Vargas, Vivas & Tobón, 2020; Tian, Yang, Liu, Li & Chen, 2021). The etiology of SS is unknown and multiple factors (infectious, hormonal, stress-related and genetic) may play a role in its pathogenesis (Bautista-Vargas et al., 2020).

Diagnosis of SS is complex because the clinical and histological characteristics of the disease are usually not specific, and several diagnostic criteria have been suggested. In 1993 the European classification criteria was proposed (Vitali et al., 1993), and subsequently reassessed by the American-European Consensus Group (AECG) in 2002 (Vitali et al., 2002). The AECG aimed to improve the preestablished diagnostic criteria, including evidences of autoimmunity by autoantibodies (anti-Ro and anti-La) and presence of focal lymphocytic sialadenitis (FLS) in biopsies from minor salivary glands (MSG) (Vitali et al., 2002). In 2012 the American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism (ACR/EULAR) suggested a set of classification criteria for primary SS, which was validated by a consensus group in 2016 (Shiboski et al., 2012; Shiboski et al., 2017). The classification criteria included five items: more than one focus of inflammatory infiltrate of mononuclear cells (mostly lymphocytes) containing  $\geq$  50 inflammatory cells per 4 mm<sup>2</sup> on MSG glands obtained by biopsy (3 points); presence of serum anti-SSA antibodies (3 points); SICCA ocular staining score of  $\geq$  5 (1 point); Schirmer test showing  $\leq$  5mm result for 5 minutes (1 point); and unstimulated salivary flow of  $\leq 0,1$ ml per minute (1 point). A total score  $\geq 4$ is compatible with the diagnosis of primary SS (Shiboski et al., 2017). Nevertheless, both classification systems seem equivalent, that is, patients who meet the AECG criteria generally also meet the ACR/EULAR classification criteria (Billings, Amin Hadavand & Alevizos, 2018).

The presence of a predominantly lymphocytic focal infiltration in MSG has been associated with SS in several studies (Chisholm & Mason, 1968; Greenspan, Daniels, Talal & Sylvester, 1974; Tarpley, Anderson & White, 1974; Daniels & Whitcher, 1994; Daniels et al., 2011; Fisher et al., 2017; Kroese, Haacke & Bombardieri, 2018). However, the morphological pattern of SS-like chronic inflammation can occur in nonspecific chronic sialadenitis (NCS) and chronic sclerosing sialadenitis (Daniels, 1984; Daniels et al., 2011; Fisher et al., 2017). Thus, the accuracy of biopsy interpretation and the impact on disease classification has been studied by several work groups (Wise & Woodruff, 1993; Al-Hashimi, Wright, Cooley & Nunn, 2001; Vivino, Gala & Hermann, 2002; Langerman, Blair, Sweiss & Taxy, 2007; Stewart et al., 2008; Costa et al., 2015; Bredahl, Reibel & Pedersen, 2021; Vivas et al., 2021). Histological patterns such as mononuclear cell infiltration, presence of acinar atrophy, ductal dilatation and presence of fibrosis have already been evaluated and compared in SS and NCS; however, lack of diagnostic agreement among pathologists reflects the importance of establishing tools to improve the consistency of histological interpretations (Stewart et al., 2008; Costa et al., 2015; Fisher et al., 2017). Apart from conventional histological analyses, immunohistochemical markers expressed in the MSG lymphocytic infiltrates can offer additional useful diagnostic information (Trivedi, Cornejo, O'Donnell, Dresser & Deng, 2021).

The inflammatory infiltrate in MSG from SS patients is predominantly lymphocytic, in contrast to the heterogeneous infiltrate found in NCS and other chronic sialadenitis. However, there is only few information on the detailed comparative lymphohistocytic composition of the infiltrate in these two conditions. Thus, the aim of this study was to comparatively analyze the morphological and immunohistochemical characteristics of MSG showing FLS-SS and NCS.

#### MATERIAL AND METHODS

#### 1. SAMPLES

The files of the Oral Pathology Laboratory, Dental School, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, Brazil, were reviewed and all cases representing MSG biopsies performed for diagnosis of SS and fibrous inflammatory hyperplasias containing MSG showing chronic inflammatory infiltrate were selected. All HE-stained histological slides were reviewed under light microscopy, and, after analysis of the integrity and representativeness of the specimens, 80 cases were selected and divided in four groups: FLS-SS (n=20), NCS (n=20), normal MSG without evident inflammatory infiltrate (NMSG, n=20), and inflamed MSG present in inflammatory

fibrous hyperplasias (IFH) (n=20). The first three groups (FLS-SS, NCS and NMSG) were selected from biopsies performed in labial MSG indicated for the diagnosis of SS.

#### 2. HISTOLOGICAL ANALYSES

Histological features in the MSG of the studied cases were described after analysis of 5µm HE-stained sections under light microscopy. The presence, type and distribution of the inflammatory infiltrate; periductal and perivascular infiltration; number of inflammatory foci, and presence of intraductal eosinophilic material, acinar atrophy, fibrosis, liposubstitution, germinal centers and focus score were evaluated in all cases.

#### 3. IMMUNOHISTOCHEMISTRY

Immunohistochemical reactions were performed using 4µm sections in silanized slides, deparaffinized in xylene, and hydrated in graded series of alcohol. Antigen retrieval was performed with pressure cooker and the activity of the endogenous peroxidase was blocked with one 15-minute bath in 10% hydrogen peroxidase. The primary antibodies incubated for 2 hours were CD3 (Polyclonal; DAKO; diluted. 1:300), CD4 (CD4-1F6; NOVOCASTRA; diluted 1:100), CD8 (C8/144B; DAKO; diluted 1:100), CD20 (L26; DAKO; diluted 1:200), CD68 (CD-68KP1; DAKO; diluted 1:200), CD163 (10D6; NOVOCASTRA; diluted 1:400) and interleukin 17 (IL-17) (Polyclonal; ABCAM; diluted 1:500). Sections were incubated with the super-sensitive non-biontin based immunohistochemical visualization system (AdvanceTM HRP Kit – DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA). Diaminobenzidine (DAB, Sigma, St. Louis, MO, USA) was used as chromogen and the slides were counterstained with Carazzi's hematoxylin.

# 4. DIGITAL QUANTIFICATION OF THE HE-STAINED AND IMMUNOHISTOCHEMICAL SLIDES

All HE-stained and immunohistochemical slides were scanned into highresolution images using the Aperio Scanscope CS Slide Scanner (Aperio Technologies Inc., Vista, California, USA). For the analysis of the sample, a focus of interest was selected and analyzed individually in each case. In HE analyses, the software ruler was used to measure ductal dilatation and the size of the focus at its largest diameter. For the analysis of immunohistochemistry, the same focus of interest considered in HE was demarcated and analysed for CD3, CD4, CD8, CD20, CD68 and CD163. Ducts and acini that could interfer on the cell count were excluded. Antibody expressions were analyzed using the Membrane algorithm (Aperio Technologies Inc.), considering the number of positive and negative cells in the focus of interest (Figure 1).

For IL-17 the digitized images were analyzed with the Pixel Count V9 algorithm (Aperio Technologies Inc.) in three distinct medium power fields in each case. Staining was quantified in terms of percentage of positivity and according to the intensity; weak staining scored 1, moderate 2, and strong 3 (Figure 1). The calculation of the final score for each case was the sum of the percentage of each category multiplied by their intensity scores using the following formula: [(% weak x 1) + (% moderate x 2) + (% strong x 3)]. Results ranged from 100 to 300, similarly to previous studies published by our group (Fonseca *et al.*, 2015; Morais *et al.*, 2019).

#### 5. STATISTICAL ANALYSIS

Statistical analysis was performed by using SPSS software version 26 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA). Descriptive frequency statistics were performed for qualitative variables related to patient gender, number of fragments, presence of inflammatory infiltrate, acinar atrophy, presence of ductal dilatation, periductal infiltration, perivascular infiltration, presence of intraductal eosinophilic material, presence of fibrosis, liposubstitution and germinal centers. Statistical analysis of qualitative variables was performed using Fisher's Exact Test or Chi-Square Test.

Quantitative variables were submitted to descriptive statistics and the assessment of normality – Gauss curve, asymmetry, and kurtosis. In addition, a statistical test, Shapiro-Wilk, was performed to assess normality. Asymmetric variables (age, number of foci, average size of focus, average size of ductal dilatation, CD3, CD20, CD4, CD8 and CD163) were analyzed using the Kruskal Wallis test, while variables with normal distribution (CD68 and IL- 17) were submitted to ANOVA. Tukey's Post-hoc Test was performed after ANOVA. Data were also examined using

Spearman's correlation test. The level of significance considered was 5% ( $p \le 0.05$ ) for all tests.

This study was conducted in accordance with the ethical principles of the World Medical Association Declaration of Helsinki (466/2012) and it was approved by the Institutional Ethical Board of the University of Campinas (process number 29278919.0.0000.5418).

#### RESULTS

The FLS-SS group consisted of 19 women and 1 man with a mean age of 49.3 years (range 29 to 75 years). Histologically, all cases presented periductal, perivascular and interacinar inflammatory infiltrate. Inflammatory foci were mostly composed by lymphocytes and caused replacement of adjacent glandular structures (Figure 2). Lymphocytic foci were present throughout the salivary glands, both in the center and periphery, and foci coalesced with each other in some cases (Figure 2). There was an average of 12.3 foci per case (range 3 to 24). Thirteen cases had acinar atrophy and 17 intraductal eosinophilic material and fibrosis. All cases presented liposubstitution, and only 1 case presented germinal center formation (Table 1 and Figure 2). Inflammatory foci showed an average size of 62105.63  $\mu$ m (median 565.48  $\mu$ m) and ducts showed an average size of 81.11  $\mu$ m. Immunohistochemical findings in the focus showed a mean of 87.3% CD3+ cells and 79.1% CD20+ cells. CD4+ and CD8+ lymphocytes showed a mean of 30.2 % and 30.1% respectively. IL-17 mean expression score was 175.5 (Figures 4, 5 and 6).

The NCS group was composed by 17 women and 3 men with a mean age of 50.8 years (range 23 to 76). Histological analysis showed an inflammatory infiltrate in all cases, sometimes resembling the pattern found in the FLS-SS group (Figures 3A and 3B). However, there was an average of 3.7 foci per case (range 1 to 8), and they showed no coalescence to each other. Nineteen and 11 cases presented, respectively, periductal and perivascular inflammatory infiltrate (Figure 3C). Intraductal eosinophilic material was present in 19 cases, 13 cases had fibrosis and 10 cases showed liposubstitution (Table 1). The NCS cases had a mean focus size of 316.22  $\mu$ m (median 274.74  $\mu$ m), and mean ductal size was 58.74  $\mu$ m. Immunoreactions in the selected focus showed a mean frequency of 78.7%, 62.8%, 53.0%, and 55.3%, respectively for CD3+, CD20+, CD4+ and CD8+ cells. Histiocyte markers showed a frequency of 30.3% for CD68+ cells and 34.3% for CD163+ cells. Mean IL-17 expression score was 166.2 (Figures 4, 5 and 6).

The NMSG group consisted of 17 women and 3 men with a mean age of 48.3 years (range 28 to 77). Microscopically, scattered diffuse, periductal, and perivascular inflammatory cells, including mostly lymphocytes and plasma cells, were found in 8 cases, but they were not associated with foci formation. Two cases showed intraductal eosinophilic material, and 11 cases had acinar atrophy and liposubstitution, while 17 cases had fibrosis (Table 1). The mean ductal size was 53.39  $\mu$ m. CD3+, CD20+, CD4+, CD8+, CD68+, and CD163+ were encountered as isolated cells, but no focus formation was found. Mean IL-17 expression score was 158.8 (Figures 4, 5 and 6).

Twelve women and 8 men made up the IFH group. The mean age was 59.8 years (range 19 to 78). All cases showed an inflammatory infiltrate, with an average of 2.7 foci per case. In these cases, the inflammatory foci were mostly present in the periphery of the MSG (Figures 3D and 3E). Perivascular inflammatory infiltrate and fibrosis were not frequent, however, 11 cases had periductal inflammatory infiltrate and intraductal eosinophilic material. Seven cases showed acinar atrophy and 2 cases showed liposubstitution (Table 1). The average size of the foci was 293.86  $\mu$ m (median 292.70  $\mu$ m), and the average ductal size was 73.17  $\mu$ m. The mean frequency of CD3+, CD20+, CD4+, and CD8+ cells were, respectively, 76.7%, 57.1%, 25.4%, and 55.0%. Histiocytic markers showed a mean expression of 35.0% and 27.8%, respectively, for CD68+ and CD163+ cells. IL-17 mean expression score was 159.8 (Figures 4, 5 and 6).

Statistical analysis showed that ductal dilatation was more common in FLS-SS and IFH (p<0.00). Intraductal eosinophilic material was more common in FLS-SS and NCS (p<0.001), while liposubstitution was more common in FLS-SS, NMSG and NCS (p<0.001). Perivascular (p=0.002) and periductal (p<0.001) inflammatory infiltrate were more common in FLS-SS and NCS. The differences in the number of focus (p=0.000), focus mean size (p=0.000), presence of CD4+ cells (p= 0.002) and IL-17 expression score (p=0.000) were significantly different when comparing the four groups.

There was a moderate positive correlation between CD3+ and CD20+ cells (r=0.401; p=0.002), CD20+ and CD4+ cells (r=0.351; p=0.008), CD20+ cells and IL-17 expression score (r=0.412; p=0.002) and CD4+ cells and IL-17 expression score (r=0.334; p=0.013). A weak correlation was observed between CD3+ and CD4+ cells (r=0.272; p=0.04), CD3+ and CD8+ cells (r=0.260; p=0.049), CD8+ and CD68+ cells (r=0.267; p=0.045), CD8+ cells and IL-17 expression score (r=0.284; p=0.034) and CD68+ and CD163+ cells (r=0.283; p=0.039).

#### DISCUSSION

SS is a chronic autoimmune disease that primarily affects the salivary and lacrimal glands from middle-aged adults (Bautista-Vargas et al., 2020). It may manifest alone (primary SS) or associated with other disorders (Mariette & Criswell, 2018). Notably, histological analysis of the MSG of patients with SS shows a FLS, which is an important diagnostic criterion to define SS (Chisholm & Mason, 1968; Daniels & Whitcher, 1994; Fisher et al., 2017; Shiboski et al., 2017). It has been shown that FLS and focus score show sensitivity of 62.5 to 98.7%, specificity of 61.2 to 100%, and high positive (57 to 63.6%) and negative (95.5 to 97.5%) predictive values in the diagnosis of SS (Yazisiz, Avci, Erbasan, Kiris & Terzioglu, 2009; Daniels et al., 2011; Guellec et al., 2013; Wicheta, Van der Groen, Faquin & August, 2017; Kroese et al., 2018; Wicheta, Van der Groen, Faquin & August, 2019; Bredahl et al., 2021). Nevertheless, it is estimated that 18 to 40% of the primary SS patients show a focus score < 1, and that 6 to 9% of non-SS healthy patients show a focus score > 1 (Kroese et al., 2018). Besides an important criterion for diagnosis, cumulative evidences have shown that the histological features in SS-affected salivary glands can serve as biomarkers for prognosis and a guide for treatment (Risselada et al., 2014; Fisher, Brown, Bowman & Barone, 2015). However, it is not uncommon in routine Oral Pathology that, apart from biopsies obtained for SS diagnosis, other biopsies containing MSG may also show focal inflammatory infiltrate resembling the SS pattern, such as NCS and chronic sclerosing sialadenitis (Daniels, 1984; Daniels et al., 2011; Fisher et al., 2017; Wicheta et al., 2019). In these cases, the definitive diagnosis is complex, as clinical, and histological data may be not specific and, in addition to the consensus established for SS diagnosis, immunostaining would be a helpful tool to understand SS diagnosis and pathogenesis (Trivedi *et al.*, 2021).

The present study aimed to compare the morphology and the pattern of the lymphohistiocytic aggregates present in FLS-SS, NCS, NMSG and IFH. The first three groups were included as they represent the routine when interpreting MSG biopsies performed for SS diagnosis. We have also included a fourth group (IFH) for comparison as, although not associated to SS, MSG from these lesions were exposed to an inflammatory stimulus (trauma) and can present morphological alterations that resemble those observed in SS. Lymphocytic infiltrate was present in three groups (FLS-SS, NCS and IFH), but the infiltration pattern differed from each other. In FLS-SS and NCS, periductal, perivascular and interacinar infiltration were evident in the center and periphery of the glands, while in IFH it was almost exclusively present at the periphery of the glands. The literature presents well-established data regarding the presence of inflammatory foci in FLS-SS and NCS (Vitali et al., 1993; Vitali et al., 2002; Shiboski et al., 2017), but not on the relevant histological features to distinguish salivary gland inflammatory disorders. NCS is characterized by infiltration of lymphocytes, macrophages and plasma cells located in glandular lobes that exhibit a combination of acinar atrophy, interstitial fibrosis, duct dilation and luminal mucus (Daniels et al., 2011; Fisher et al., 2017). Meanwhile, FLS-SS is characterized by irregular periductal and perivascular mononuclear infiltrates (lymphocytes, plasma cells and macrophages) adjacent to normal-appearing mucous acini (Fisher et al., 2017), usually lacking both duct dilatation and fibrosis (Stewart et al., 2008).

The present results showed divergent results between FLS-SS and NCS, regarding acinar atrophy, presence of fibrosis and duct dilatation. These results could be at least partially due to the use of whole slide imaging (WSI), which provides better observation of details that cannot be easily visualized in a conventional light microscope (Parwani, Hassell, Glassy & Pantanowitz, 2014). WSI consists of converting glass slides into high resolution digital images scanned by a camera, and the software assembles the image and allows it to be viewed as a single image (Boyce, 2015; Araújo *et al.*, 2018). WSI has been important for helping the diagnosis in routine oral pathology and has been also used in research, education, telepathology and immunohistochemical analysis (Araújo *et al.*, 2018).

Furthermore, the presence of acinar atrophy and fibrosis in FLS-SS can be due to overexpression of TGF- $\beta$ , resulting in the replacement of the normal salivary

gland parenchyma by connective tissue (Hall *et al.*, 2010). The present study also analyzed ductal dilatation by measuring the size of the ductal lumen with WSI. The presence of periductal and perivascular reactive lymphoid cells is a characteristic finding of SS, and it has been demonstrated that salivary gland epithelial and acinar cells adjacent to sites of intense inflammation can recruit, activate, differentiate, and propagate inflammatory cells (Manoussakis & Kapsogeorgou, 2010), which may also explain the presence of lymphocyte aggregates in NCS and IFH. However, due to the aberrant expression of various immunoreactive factors, glandular epithelial cells from primary SS appear to have the potential to actively participate in and modulate immune responses in inflammatory lesions (Manoussakis & Kapsogeorgou, 2010).

As expected, the present results showed that the mean number of focus and the mean focus size were significantly higher in FLS-SS in comparison to the other groups. This finding reaffirms the importance of the lymphocytic focus in the diagnosis of SS and the importance of applying a homogenous histological interpretation on their evaluation (Vivino *et al.*, 2002; Fisher *et al.*, 2017). Furthermore, our results showed the utility of using WSI to measure the size of the focus, encouraging its use in upcoming similar studies. Liposubstitution was more prominent in FLS-SS, followed by NMSG and NCS. It has been suggested that there is a premature early liposubstituion in SS-affected salivary glands (Izumi, Eguchi, Nakamura, Nagataki & Nakamura, 1997), but it is difficult to interpret, by the present methods, if it may represent a nonspecific finding associated with advancing age or any specific phenomenon linked to FLS-SS or NCS.

Immunoreactions performed in the present study have shown that the inflammatory aggregates in FLS-SS, NCS and IFH were composed by CD20+ B cells; CD3+, CD4+, and CD8+ T cells; and CD68+ and CD163+ histiocytes. IL-17 expression was mostly observed in FLS-SS. Immunohistochemical stains provide pathologists with more reliable and reproducible identification and quantification of cellular types, helping to understanding SS etiopathogenesis (Trivedi *et al.*, 2021). The present results showed that CD3+ T cells are the predominant lymphocytes in FLS-SS, in accordance with the literature (Trivedi *et al.*, 2021). The presence of CD20+ B cells increases with the progression of the disease and possibly reflects its severity, serving as a guide for treatment (Costa *et al.*, 2016). Counting B and T cells with the aid of digital strategies, as used in the present study, turns interpretation of the results and correlation with disease activity/severity more precise and reproducible (Costa *et al.*, 2016).

*al.*, 2016; Fisher *et al.*, 2017). We observed statistically significant differences in the presence of CD4+ cells and IL-17 expression when comparing the four groups, IFH showing a lower expression of CD4+ cells in their microenvironment when compared to FLS-SS. This finding can be explained based on previous studies suggesting that primary SS is related to abnormal activity of CD4+ helper 1 (Th1) T cells (Skopouli *et al.*, 1991; Tian *et al.*, 2021). This evidence is also supported by the high level of interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) and Th1 cells in the serum of SS patients (Van Woerkom *et al.*, 2005; Chivasso, Sarrand, Perret, Delporte & Soyfoo, 2021). Furthermore, the higher expression of IL-17 in SS is correlated with the recruitment and polarization of CD4+ T helper 17 (Th17) cells. Th17 cells produce IL-17 and other inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor alfa (TNF- $\alpha$ ), IL-22 e IL-26, and IL-17 overexpression has been previously reported in SS (Verstappen, Corneth, Bootsma & Kroese, 2018; Zhang *et al.*, 2018). However, the pathogenic role of Th17 cells in SS and in other inflammatory salivary gland disorders is not completely understood.

Another interesting finding in our study was the correlation between CD3+/CD20+ cells, CD20+/CD4+ cells and CD20+ cells/IL-17 expression. B cells play an important role in the development of SS, including an early activation of B cells by the innate system (Chivasso *et al.*, 2021; Tian *et al.*, 2021). The IFN signaling pathway (the main SS pathway) interacts with B cells to trigger the production of autoantibodies (Nocturne & Mariette, 2013). Furthermore, regulatory B cells (another B cell subtype present in SS) exert their regulatory function through the production of IL-10. These cells induce the expansion of Treg cells (through the action of IL-10) that regulate the actions of TNF- $\alpha$ , Th17 cells and dendritic cells (Chivasso *et al.*, 2021).

In conclusion, the results of the present study showed that the distribution pattern of mononuclear cell infiltration in FLS-SS, NCS, IFH, and NMSG was different. Higher number of focus and mean focus size, and duct dilatation and perivascular/periductal infiltrate were more common in FLS-SS, followed by NCS. There were also differences on the presence of CD3+, CD20+, CD4+ and CD8+ cells, and IL-17 expression when comparing the four groups. These results suggest that there are both histological and immunohistochemical differences in the immune cell infiltration, and in the morphological alterations in SS-affected minor salivary glands when comparing with other chronic sialadenitis. The analysis of the signaling pathways activated in SS in comparison with other sialadentis, and the value of these

immunoinflammatory differences in both the diagnosis and prognosis of the disease should be encouraged in upcoming studies.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

Authors wish to thank FAPERJ (Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, Brazil), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil) for the support. There is no potential conflict of interest associated with the present study.

#### **AUTHOR'S CONTRIBUTIONS**

Thayná Melo de Lima Morais: Conceptualization; data curation; formal analysis; investigation; methodology; project administration; resources; writing-original draft. Carla Isabelly Rodrigues Fernandes: Formal analysis; resources; writing-original draft. Anna Luíza Damaceno Araújo: Formal analysis; resources; writing-original draft. Teresa Cristina Ribeiro Bartholomeu dos Santos: Methodology; resources; writing-review & editing. Oslei Paes de Almeida: Resources; writing-review & editing. Fábio Râmoa Pires: Conceptualization; investigation; methodology; project administration; funding acquisition; resources; supervision; writing-review & editing.

#### REFERENCES

Al-Hashimi, I., Wright, J. M., Cooley, C. A., & Nunn, M. E. (2001). Reproducibility of biopsy grade in Sjögren's syndrome. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, *30*(7), 408-412. doi: 10.1034/j.1600-0714.2001.300705.x.

Araújo, A. L. D., Amaral-Silva, G. K., Fonseca, F. P., Palmier, N. R., Lopes, M. A., Speight, P. M., ... Santos-Silva, A. R. (2018). Validation of digital microscopy in the histopathological diagnoses of oral diseases. *Virchows Archiv*, *473*(3), 321-327. doi: 10.1007/s00428-018-2382-5.

Bautista-Vargas, M., Vivas, A. J., & Tobón, G. J. (2020). Minor salivary gland biopsy: its role in the classification and prognosis of Sjögren's syndrome. *Autoimmunity Reviews*, *19*(12), 102690. doi: 10.1016/j.autrev.2020.102690.

Billings, M., Amin Hadavand, M., & Alevizos, I. (2018). Comparative analysis of the 2016 ACR-EULAR and the 2002 AECG classification criteria for Sjögren's syndrome: findings from the NIH cohort. *Oral Diseases*, *24*(1-2), 184-190. doi: 10.1111/odi.12772. Boyce, B. F. (2015). Whole slide imaging: uses and limitations for surgical pathology and teaching. *Biotechnic* & *Histochemistry*, *90*(5), 321-330. doi: 10.3109/10520295.2015.1033463.

Bredahl, S. K., Reibel, J., & Pedersen, A. M. L. (2021). Value of multilevel sectioning of labial salivary gland biopsies in the diagnosis of Sjögren's syndrome. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology*, *131*(1), 85-91. doi: 10.1016/j.0000.2020.09.013.

Chisholm, D. M., & Mason, D. K. (1968). Labial salivary gland biopsy in Sjögren's disease. *Journal of Clinical Pathology*, *21*(5), 656-660. doi: 10.1136/jcp.21.5.656.

Chivasso, C., Sarrand, J., Perret, J., Delporte, C., & Soyfoo, M. S. (2021). The involvement of innate and adaptive immunity in the initiation and perpetuation of Sjögren's syndrome. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(2), 658. doi: 10.3390/ijms22020658.

Costa, S., Quintin-Roué, I., Lesourd, A., Jousse-Joulin, S., Berthelot, J. M., Hachulla, E., ... Devauchelle-Pensec, V. (2015). Reliability of histopathological salivary gland biopsy assessment in Sjögren's syndrome: a multicentre cohort study. *Rheumatology*, *54*(6), 1056-1064. doi:10.1093/rheumatology/keu453.

Costa, S., Schutz, S., Cornec, D., Uguen, A., Quintin-Roué, I., Lesourd, A., ... Devauchelle-Pensec, V. (2016). B-cell and T-cell quantification in minor salivary glands in primary Sjögren's syndrome: development and validation of a pixel-based digital procedure. *Arthritis Research & Therapy*, *18*, 21. doi: 10.1186/s13075-016-0924-2. Daniels, T. E. (1984). Labial salivary gland biopsy in Sjögren's syndrome. Assessment as a diagnostic criterion in 362 suspected cases. *Arthritis and Rheumatism*, *27*(2), 147-156. doi: 10.1002/art.1780270205.

Daniels, T. E., Cox, D., Shiboski, C. H., Schiødt, M., Wu, A., Lanfranchi, H., ... Greenspan, J. S. (2011). Associations between salivary gland histopathologic diagnoses and phenotypic features of Sjögren's syndrome among 1,726 registry participants. *Arthritis and Rheumatism*, 63(7), 2021-2030. doi: 10.1002/art.30381.

Daniels, T. E., & Whitcher, J. P. (1994). Association of patterns of labial salivary gland inflammation with keratoconjunctivitis sicca. Analysis of 618 patients with suspected Sjögren's syndrome. *Arthritis and Rheumatism*, *37*(6), 869-877. doi: 10.1002/art.1780370615.

Fisher, B. A., Brown, R. M., Bowman, S. J., & Barone, F. (2015). A review of salivary gland histopathology in primary Sjögren's syndrome with a focus on its potential as a clinical trials biomarker. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 74(9), 1645–1650. doi:10.1136/annrheumdis-2015-207499.

Fisher, B. A., Jonsson, R., Daniels, T., Bombardieri, M., Brown, R. M., Morgan, P., ... & Barone, F. (2017). Standardisation of labial salivary gland histopathology in clinical trials in primary Sjögren's syndrome. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *76*(7), 1161–1168. doi:10.1136/annrheumdis-2016-210448.

Fonseca, F. P., Basso, M. P., Mariano, F. V., Kowalski, L. P., Lopes, M. A., Martins, M. D., ... Vargas, P. A. (2015). Vascular endothelial growth factor immunoexpression is increased in malignant salivary gland tumors. *Annals of Diagnostic Pathology*, *19*(3), 169-174. doi: 10.1016/j.anndiagpath.2015.03.010.

Greenspan, J. S., Daniels, T. E., Talal, N., & Sylvester, R. A. (1974). The histopathology of Sjögren's syndrome in labial salivary gland biopsies. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology*, *37*(2), 217-229. doi: 10.1016/0030-4220(74)90417-4.

Guellec, D., Cornec, D., Jousse-Joulin, S., Marhadour, T., Marcorelles, P., Pers, J. O., ... Devauchelle-Pensec, V. (2013). Diagnostic value of labial minor salivary gland biopsy for Sjögren's syndrome: a systematic review. *Autoimmunity Reviews*, *12*(1), 416–420. doi: 10.1016/j.autrev.2012.08.001.

Hall, B. E., Zheng, C., Swaim, W. D., Cho, A., Nagineni, C. N., Eckhaus, M. A., ... Kulkarni, A. B. (2010). Conditional overexpression of TGF-beta1 disrupts mouse salivary gland development and function. *Laboratory Investigation*, 90(4), 543-555. doi: 10.1038/labinvest.2010.5.

Izumi, M., Eguchi, K., Nakamura, H., Nagataki, S., & Nakamura, T. (1997). Premature fat deposition in the salivary glands associated with Sjögren syndrome: MR and CT evidence. *AJNR American Journal of Neuroradiology*, *18*(5), 951-958.

Kroese, F. G. M., Haacke, E. A., & Bombardieri, M. (2018). The role of salivary gland histopathology in primary Sjögren's syndrome: promises and pitfalls. *Clinical and Experimental Rheumatology*, *36*(Suppl 112): S222-S233.

Langerman, A. J., Blair, E. A., Sweiss, N. J., & Taxy, J. B. (2007). Utility of lip biopsy in the diagnosis and treatment of Sjogren's syndrome. *Laryngoscope*, *117*(6), 1004-1008. doi: 10.1097/MLG.0b013e31804654f7.

Manoussakis, M. N., & Kapsogeorgou, E. K. (2010). The role of intrinsic epithelial activation in the pathogenesis of Sjögren's syndrome. *Journal of Autoimmunity*, *35*(3), 219-224. doi: 10.1016/j.jaut.2010.06.011.

Mariette, X., & Criswell, L. A. (2018). Primary Sjögren's Syndrome. *New England Journal of Medicine*, 378(10), 931-939. doi: 10.1056/NEJMcp1702514.

Morais, T. M., Soares, C. D., Aguirre Urizar, J. M., Alberdi-Navarro, J., Almeida, O. P., & Pires, F. R. (2019). Peri-implant peripheral giant cell lesions: report of 13 new cases and comparative histological and immunohistochemical analysis with peripheral and central giant cell lesions. *Medicina Oral Patología Oral Cirugia Bucal*, 24(6), e739-e745. doi: 10.4317/medoral.23088.

Nocturne, G., & Mariette, X. (2013). Advances in understanding the pathogenesis of primary Sjögren's syndrome. *Nature Reviews. Rheumatology*, *9*(9), 544-556. doi: 10.1038/nrrheum.2013.110.

Parwani, A. V., Hassell, L., Glassy, E., & Pantanowitz, L. (2014). Regulatory barriers surrounding the use of whole slide imaging in the United States of America. *Journal of Pathology Informatics*, *5*(1), 38. doi: 10.4103/2153-3539.143325.

Risselada, A. P., Kruize, A. A., Goldschmeding, R., Lafeber, F. P. J. G., Bijlsma, J. W. J., & van Roon, J. A. G. (2014). The prognostic value of routinely performed minor salivary gland assessments in primary Sjögren's syndrome. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *73*(8), 1537–1540. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-204634.

Skopouli, F. N., Fox, P. C., Galanopoulou, V., Atkinson, J. C., Jaffe, E. S., & Moutsopoulos, H. M. (1991). T cell subpopulations in the labial minor salivary gland

histopathologic lesion of Sjögren's syndrome. *The Journal of Rheumatology*, *18*(2), 210-214.

Shiboski, C. H., Shiboski, S. C., Seror, R., Criswell, L. A., Labetoulle, M., Lietman, T. M., ... Mariette, X. (2017). 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. *Arthritis & Rheumatology*, *69*(1), 35-45. doi: 10.1002/art.39859.

Shiboski, S. C., Shiboski, C. H., Criswell, L., Baer, A., Challacombe, S., Lanfranchi, H., ... Daniels, T. (2012). American College of Rheumatology classification criteria for Sjögren's syndrome: a data-driven, expert consensus approach in the Sjögren's International Collaborative Clinical Alliance cohort. *Arthritis Care & Research*, *64*(4), 475-487. doi: 10.1002/acr.21591.

Stewart, C. M., Bhattacharyya, I., Berg, K., Cohen, D. M., Orlando, C., Drew, P., ... Reeves, W. (2008). Labial salivary gland biopsies in Sjögren's syndrome: still the gold standard? *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology, and Endodontics*, *106*(3), 392-402. doi: 10.1016/j.tripleo.2008.04.018.

Tarpley, T. M. Jr., Anderson, L. G., & White, C. L. (1974). Minor salivary gland involvement in Sjögren's syndrome. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology*, *37*(1), 64-74. doi: 10.1016/0030-4220(74)90160-1.

Tian, Y., Yang, H., Liu, N., Li, Y., & Chen, J. (2021). Advances in pathogenesis of Sjögren's Syndrome. *Journal of Immunology Research*, *2021*, 5928232. doi: 10.1155/2021/5928232.

Trivedi, A., Cornejo, K. M., O'Donnell, P., Dresser, K., & Deng, A. (2021). Employing immunohistochemical staining to labial minor salivary gland biopsies from patients with Sjogren's syndrome increases diagnostic certainty. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, *50*(1), 98-102. doi: 10.1111/jop.13119.

Van Woerkom, J. M., Kruize, A. A., Wenting-van Wijk, M. J., Knol, E., Bihari, I. C., Jacobs, J. W., ... van Roon, J. A. (2005). Salivary gland and peripheral blood T helper 1 and 2 cell activity in Sjögren's syndrome compared with non-Sjögren's sicca syndrome. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *64*(10), 1474-1479. doi: 10.1136/ard.2004.031781.

Verstappen, G. M., Corneth, O. B. J., Bootsma, H., & Kroese, F. G. M. (2018). Th17 cells in primary Sjögren's syndrome: pathogenicity and plasticity. *Journal of Autoimmunity*, 87, 16-25. doi: 10.1016/j.jaut.2017.11.003.

Vitali, C., Bombardieri, S., Jonsson, R., Moutsopoulos, H. M., Alexander, E. L., Carsons, S. E., ... Weisman, M. H. (2002). Classification criteria for Sjögren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *61*(6), 554-558. doi: 10.1136/ard.61.6.554.

Vitali, C., Bombardieri, S., Moutsopoulos, H. M., Balestrieri, G., Bencivelli, W., Bernstein, R. M., ... Youinou, P. (1993). Preliminary criteria for the classification of Sjögren's syndrome. Results of a prospective concerted action supported by the European Community. *Arthritis and Rheumatism*, 36(3), 340-347. doi: 10.1002/art.1780360309.

Vivas, A. J., Bautista-Vargas, M., Portacio, S., Garcés-Palacio, A., Urbano, M. A., Agualimpia, A., ... Tobón, G. J. (2021). Reproducibility of minor salivary gland biopsy reports in Sjögren's syndrome and its correlation with disease biomarkers. *Clinical Rheumatology*, *40*(6), 2285-2292. doi: 10.1007/s10067-020-05532-3.

Vivino, F. B., Gala, I., & Hermann, G. A. (2002). Change in final diagnosis on second evaluation of labial minor salivary gland biopsies. *The Journal of Rheumatology*, 29(5), 938-944.

Wicheta, S., Van der Groen, T., Faquin, W. C., & August, M. (2019). Discrepancies in interpretation of the minor salivary gland biopsy in the diagnosis of Sjögren syndrome. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 77(8), 1628-1635. doi: 10.1016/j.joms.2019.01.052.

Wicheta, S., Van der Groen, T., Faquin, W. C., & August, M. (2017). Minor salivary gland biopsy – an important contributor to the diagnosis of Sjögren syndrome. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, *75*(12), 2573-2578. doi: 10.1016/j.joms.2017.05.021.
Wise, C. M., & Woodruff, R. D. (1993). Minor salivary gland biopsies in patients investigated for primary Sjögren's syndrome. A review of 187 patients. *The Journal of Rheumatology*, *20*(9), 1515-1518.

Yazisiz, V., Avci, A. B., Erbasan, F., Kiris, E., & Terzioglu, E. (2009). Diagnostic performance of minor salivary gland biopsy, serological and clinical data in Sjögren's syndrome: a retrospective analysis. *Rheumatology International*, *29*(4), 403–409. doi: 10.1007/s00296-008-0698-1.

Zhang, L. W., Zhou, P. R., Wei, P., Cong, X., Wu, L. L., & Hua, H. (2018). Expression of interleukin-17 in primary Sjögren's syndrome and the correlation with disease

severity: a systematic review and meta-analysis. *Scandinavian Journal of Immunology*, 87(4), e12649. doi: 10.1111/sji.12649.

#### TABLES

Table 1. Distribution of the histological features in the four studied groups (FLS-SS - focal lymphocytic sialadenitis; NCS - nonspecific chronic sialoadenitis; NMSG - normal minor salivary glands; IFH - minor salivary glands associated with inflammatory fibrous hyperplasias).

Histological parameter	Groups (n=20, each group)				
	FLS-SS	NCS	NMSG	IFH	
Presence of inflammatory infiltrate	20 (100%)	20 (100%)	8 (40%)	20 (100%)	
Mean number of foci	12.3	3.7	0	2.7	
Focus size (average in µm)	62105.63	316.22	0	293.86	
Focus size (median in $\mu$ m)	565.48	274.74	0	292.70	
Perivascular infiltrate	13 (65%)	11 (55%)	4 (20%)	3 (15%)	
Periductal infiltrate	20 (100%)	19 (95%)	4 (20%)	11 (55%)	
Duct size (average in µm)	81.11	58.74	53.39	73.17	
Acinar atrophy	13 (65%)	10 (50%)	11 (55%)	7 (35%)	
Intraductal eosinophilic material	17 (85%)	19 (95%)	2 (10%)	11 (55%)	
Fibrosis	17 (85%)	13 (65%)	17 (85%)	9 (45%)	
Liposubstitution	20 (100%)	10 (50%)	11 (55%)	2 (10%)	
Germinal center	1 (5%)	0	0	0	

Table 2. Distribution of the mean frequency (in %, range in parenthesis) of CD3+, CD20+, CD4+, CD8+, CD68+ and CD163+ cells in the focus and IL-17 expression in the whole salivary gland by group (FLS-SS - focal lymphocytic sialadenitis; NCS - nonspecific chronic sialoadenitis; IFH - minor salivary glands associated with inflammatory fibrous hyperplasias; NMSG - normal minor salivary glands).

Immunohistochemical	Groups (n	nean frequency i	n %; range in pa	renthesis)
marker	FLS-SS	NCS	IFH	NMSG
	87.3	78.7	76.7	
CD3+ cens	(65.9 – 98.9)	(42.6 – 98.7)	(46.6 – 97.6)	NA
	79.1	62.8	57.1	
CD20+ cells	(38.2 – 94.3)	(6.3 – 94.9)	(10.6 – 94.9)	NA
	36.3	53.0	25.4	
CD4+ cells	(2.2 – 95.7)	(12.0 – 90.2)	(2.3 – 77.7)	NA
	65.1	55.3	55.0	
CD8+ cells	(27.0 – 84.6)	(23.1 – 77.2)	(28.5 – 70.3)	NA
	30.2	30.3	35.0	
CD68+ cells	(7.1 – 62.3)	(7.6 – 69.3)	(11.3 – 70.4)	NA
	30.1	34.3	27.8	
CD163+ cells	(7.8 – 65.8)	(9.8 – 82.1)	(12.3 – 46.1)	NA
IL-17 expression	175.5	166.2	159.8	158.8
score	(149.0 – 200.7)	(143.7 – 191.4)	(140.5 – 181.2)	(147.9 – 179.7)

#### FIGURES

Figure 1. Method used for immunohistochemical analysis using the Aperio Scanscope NCS Slide Scanner (Aperio Technologies Inc., Vista, California, USA). For immunohistochemical analysis of CD3, CD20, CD4, CD8, CD68, and CD163, a focus of interest was circled and demarcated in the reactions. For IL-17, three distinct medium power fields were evaluated for each case.



Figure 2. Histological characteristics of the focal lymphocytic sialadenitis in Sjögren's syndrome. (a) Low-power view showing five lymphocytic foci (H&E, 4x). (b) Perivascular and periductal lymphocytic infiltration (H&E, 20x). (c) Detail of the predominantly lymphocytic infiltrate (H&E, 40x). (d) Presence of a germinal center and liposubstitution (H&E, 10x).



Figure 3. Histological characteristics of the nonspecific chronic sialadenitis (NCS) and minor salivary glands in inflammatory fibrous hyperplasia (IFH). (a) Low-power view showing inflammatory foci in NCS (H&E, 4x). (b) Detail of inflammatory foci and ductal dilatation in NCS (H&E, 10x). (c) Periductal predominantly lymphocytic infiltrate in NCS (H&E, 40x). (d) Perivascular and periductal inflammatory infiltrate in IFH (H&E, 10x). (e) Detail of the predominantly lymphocytic infiltrate in IFH (H&E, 40x).



Figure 4. Graphic illustration of the immunohistochemical expression of CD3 (a), CD20 (b), CD4 (c), CD8 (d), CD68 (e), CD163 (f) and IL-17 (g) in focal lymphocytic sialadenitis (FLS-SS), nonspecific chronic sialadenitis (NCS), minor salivary glands associated with inflammatory fibrous hyperplasias (IFH), and normal minor salivary glands (NMSG).



Figure 5. Immunohistochemical expression of CD3, CD20, CD4, and CD8 in focal lymphocytic sialadenitis (FLS-SS), nonspecific chronic sialadenitis (NCS), minor salivary glands associated with inflammatory fibrous hyperplasias (IFH), and normal minor salivary glands (NMSG).



Figure 6. Immunohistochemical expression of CD68, CD163 and IL-17 in focal lymphocytic sialadenitis (FLS-SS), nonspecific chronic sialadenitis (NCS), minor salivary glands associated with inflammatory fibrous hyperplasias (IFH), and normal minor salivary glands (NMSG).



#### 3. CONCLUSÃO

O número de focos predominantemente linfocíticos, assim como seu tamanho médio, além da presença de dilatação ductal e infiltração perivascular/periductal, foram mais comuns na SS em comparação com as sialoadenites crônicas inespecíficas. A presença de células T CD4+ foi mais frequente na SS e nas sialoadenites crônicas inespecíficas e os escores de imunoexpressão de IL-17 foram maiores na SS. Os resultados sugerem que existem diferenças histológicas e imunoistoquímicas nas glândulas salivares menores na SS em comparação com outras sialoadenites crônicas.

#### REFERÊNCIAS

Aluno A *et al*. T regulatory and T helper 17 cells in primary Sjögren syndrome: facts and persprctive. Mediators Inflamm. 2015;243723.

Bikker A *et al.* Increased expression of interleukin-7 in labial salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome correlates with primary inflammation. Arthritis Rheum. 2010;62:969-77.

Brito-Zerón P, Baldini C, Bootsma H *et al*. Sjögren's syndrome. Nat Rev Dis Primers. 2016;2:16047.

D'Elia HF, Bjuman C, Rehnberg E *et al.* Interleukin 6 and it soluble receptor in a central role at the neuroimmunoendocrine interface in Sjögren syndrome: an explanatory interventional study. Ann Rheum Dis. 2009;68:285-6.

Fisher BA *et al.* Standardisation of labial salivary gland histopathology in clinical trials in primary Sjögren's syndrome. Ann Rheum Dis. 2017;76:1161-8.

Gong YZ *et al*. Differentiation of follicular helper T cells by salivary gland epithelial cells in primary Sjögren's syndrome. J Autoimmun. 2014;51:57-66.

Hillen MR, Mervers FA, Kruize AA *et al.* Dendritic cells, T-cell and epithelial cells: a crucial interplay in immunopathology of primary Sjögren's syndrome. Expert Rev Clin Immunol. 2014;10:521-31.

Ice JA, Li H, Adrianto I *et al*. Genetics of Sjögren's syndrome in the genome – wide association era. Autoimmun. 2012;39:57-63.

Jin JO, Kawai T, Cha S *et al.* Interleukin-7 enhances the Th1 response to promote the development of Sjögren's syndrome-like autoimmune exocrinopathy in mice. Arthritis Rheum. 2013;65:2132-42.

Manoussakis MN, Kapsogeorgou EK. The role of intrinsic epithelial activation in the pathogenesis of Sjögren syndrome. J Autoimmun. 2010;35:219-24.

Moutsopoulos HM. Sjögren's syndrome: autoimmune epithelitis. Clin Immunol Immunopathol. 1994;72:162-5.

Nguyen CQ, Hu MH, Li Y *et al.* Salivary gland tissue expression of interleukin-23 and interleukin-17 in Sjögren's syndrome: findings in humans and mice. Arthritis Rheum. 2008;58:734-43.

Nocture G, Mariette X. Advance in understanding the pathogenesis of primary Sjögren's syndrome. Nat Rev Rheumatol. 2013;9:544-56.

Peri Y, Agmon-Levin N, Theodor E *et al*. Sjögren's syndrome, the old and the new. Best Pract Clin Rheumatol. 2012;26:105-17.

Regezi JA, Sciubba JJ, Jordan RCK. Patologia oral correlações clinicopatológicas. Rio de Janeiro. Editora Elsevier. 7 Edição, 2017.

Ticani A, Andreoli L, Cavazzana I *et al.* Novel aspects of Sjögren's syndrome in 2012. BMC Medicine. 2013;11:93.

Tzioutas AG, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM. Pathogenesis of Sjögren's syndrome: what we know and what we should learn. J Autoimmun. 2012;39:4-8.

Youinou P, Saraux A, Pers JO. B-lymphocytes govern the pathogenesis of Sjögren's syndrome. Curr Pharm Biotechnol. 2012;13:2071-7.

#### ANEXO 1 – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

TÍTUIO da Pesquisa: ESTUDO CLÍNICO-PATOLÓGICO E IMUNOISTOQUÍMICO COMPARATIVO DOS ACHADOS HISTOLÓGICOS ENCONTRADOS NAS GLÂNDULAS SALIVARES MENORES NA SÍNDROME DE SJÖGREN E NA SIALOADENITE CRÓNICA INESPECÍFICA

Pesquisador: Thayna Meio de Lima Morals Área Temática: Versão: 3 CAAE: 29278919.0.0000.5418 Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Unicamp Patrocinador Principal: Financiamento Proprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.942.950

Apresentação do Projeto:

Transcrição editada do conteudo do registro do protocolo e dos arquivos anexados a Plataforma Brasil A EQUIPE DE PESQUISA citada na capa do projeto de pesquisa inclui THAYNÁ MELO DE LIMA MORAIS (Cirurgia Dentista, Doutoranda no PPPG em Estomatopatologia da FOP-UNICAMP, Pesquisadora responsavel, Orientanda) e FABIO RÂMOA PIRES (Cirurgiao Dentista, Docente da area de Patologia Bucal da UERJ, Pesquisador participante, Orientador), o que e confirmado na declaração dos pesquisadores e na PB.

Delineamento da pesquisa: Trata-se de estudo com o objetivo de availar e comparar os achados histologicos nas giandulas salivares menores na SS e na sialodenites cronicas inespecíficas, alem de availar e comparar o perfil imunoistoquímico do infiltrado inflamatorio encontrado na SS e na sialodenite cronica inespecífica. O estudo sera desenvolvido na Facuidade de Odontologia de Piracicaba – FOP/UNICAMP no laboratorio de Patologia Oral. A amostra sera composta por 80 casos de SS e 80 casos de sialodenite cronica inespecífica. Os casos serao resgatados do BIOBANCO da Facuidade de Odontologia de Piracicaba e so serao incluidos na pesquisa os casos que apresentarem material suficiente para os cortes histologicos de pacientes maiores de 18 anos e

Endereço: Av Limeira 901 Cabo Bairro: Areião	a Postal 52 CEP:	13.414-903	
UF: SP Municipio: Telefone: (19)2106-5349	PIRACICABA Fax: (19)2106-5349	E-mail: cep@fop.unicamp.br	
			Página 01 de 10





Continuação do Parecer: 3.942.950

que assinaram o TCLE previamente. Para analise imunohistoquímica serao realizados os anticorpos CD3, CD20, CD4, CD8, IL-17, IL-18, TNF-a e IFN-g. Apos as reações imunoistoquímicas os cortes histológicos serao escaneados e analisados pelo Aperio imageScope. A estatística sera realizada no software SPSS. Criterios de inclusao: Os biocos de parafinas serao selecionados quanto a quantidade e a qualidade de fixação do material atraves da sua comparação com a lamina original arquivada. A quantidade de tecido presente no bioco devera possibilitar a obtenção de 20 cortes de 4m de espessura e não devera ser esgotado para que não ocorra prejurzo ao paciente ou a instituição.

Criterios de exclusao: Caso o material do bioco seja insuficiente para tal quantidade e sobra, este sera excluido da amostra.

MATERIAL E MÉTODOS:

Tipo de estudo: Estudo quantitativo analítico do tipo caso-controle de base laboratorial.

Componentes da amostra: Apos a aprovação do comite de etica em pesquisa da Facuidade de Odontologia de Piracicaba – FOP/Unicamp, serao usados nesta pesquisa biocos de parafina provenientes do Biobanco da Instituição. A amostra sera composta por 80 casos de Sindrome de SJÓGREN e 80 casos de Inflamação cronica inespecífica da giandula salivar. O numero da amostra foi obtido atraves do caículo de amostragem, No =  $1/(Eo) 2 e n = N x no/ N + no. No qual, foi utilizado a expressão de primeira aproximação de 5% e numero de população de 100 casos. As informações clínicas dos casos serão obtidas junto aos registros dos pacientes. As analises histológicas e imunoistoquímicas serão realizadas utilizando o material arquivado em bioco de parafina orlundo de procedimentos cirurgicos previos para o diagnostico da Sindrome de Sjogren. A partir dos biocos de parafina serão obtidos cortes histológicas com espessura de 4<math>\mu$ m cada. Estes cortes serão corados em Hematoxilina e Eosina (HE) para analise histopatológica. Apos a revisão e a confirmação dos diagnosticos, os biocos serão submetidos a novos cortes de espessura de 4 $\mu$ m para realização da tecnica de imunoistoquímica.

Analise histologica: Na analise histologica sera observado se ha material suficiente para uma analise robusta e conflavel, topicos para analise no anexo, no qual sera realizado por dois observadores (TMLM e FRP). Um numero de no minimo quatro giandulas salivares menores serao necessarias ou uma area de no minimo 8 mm de superficie giandular. Presença e a distribuição das celulas inflamatorias serao descritas. Alem disso, atrofia acinar, dilatação ductal, fibrose e a evidencia de focos adjacentes ao parenquima normal tambem serao notificados (Fisher BA et al.,

Endereço: Av.Limeira 901 C	aixa Postal 52		
Bairro: Areião	CEP:	13.414-903	
UF: SP Municípi	D: PIRACICABA		
Telefone: (19)2106-5349	Fax: (19)2106-5349	E-mail: cep@fop.unicamp.br	

52

Página 02 de 10





Continuação do Parecer: 3.942.950

2017). Para analise da atrofia acinar sera selecionado uma area de normalidade do fragmento histologico, ou seja, uma area de acinos glandulares normals, nos quais estes acinos serao medidos em milimetros (padrao de normalidade) e, posteriormente, comparados com areas de atrofia acinar. Resultados com mais de 20% de redução acinar serao considerados como atroficos. Quanto a presença de dilatação ductal, fibrose e evidencias de focos adjacentes ao parenquima serao avalladas comparativamente com as estruturas anatomicas circunvizinhas. Para calcular o score do foco, o numero total de focos da amostra sera dividido pela area de superficie glandular e multiplicado por quatro, para fornecer o numero de focos por 4 mm2. Focos em areas de atrofia, dilatação ductal e fibrose serao incluidos no calculo do score (Fisher BA et al., 2017). Vale ressaitar que o calculo da atrofia acinar e do score do foco serao calculados com ajuda do Software Aperio imagescope.

Tecnica imunoistoquímica: Serao realizadas reações imunoistoquímicas contra os antigenos CD3, CD20, CD4, CD8, IL-17, IL-18, TNF-a e IFN-g. Todas as reações seguirao os protocolos do laboratorio de imunoistoquimica da FOP/UNICAMP. As reações serão interpretadas simultaneamente por dois pesquisadores (TMLM e FRP). Para isto, as laminas serao escaneadas com o auxilio do escaneador de laminas histologicas (Apetio @ Scanscope CS) do laboratorio de Patologia Digital da FOP/UNICAMP. Para analise quantitativa da expressao dos marcadores citopiasmaticos, sera utilizado o algoritimo Pixel Count V9 algorithm (Aperio Technologies), de acordo com parametros previamente estabelecidos, permitindo assim, fidedignidade dos dados obtidos. A intensidade de marcação sera interpretada em uma escala que varia de fraco, moderado e forte. Os dados serao tabulados e analisados de acordo com a formula: ([Porcentagem de fraco x 1] + [Porcentagem de forte x 3]), deixando os escores compreendidos em uma escala de 100 a 300. Os resultados serao divídidos em dois grupos principais - ausente ou fraco (100 a 200); moderado a forte (201 a 300). A analise dos marcadores nucleares sera realizada com auxilio do algoritimo Aperlo V9 algorithm (Aperio Technologies) que calcula a quantidade de celuías, sendo obtido um indice de positividade (em porcentagem). Ambas as metodologías de quantificação digital ja foram previamente utilizadas por nossa equipe e descritas no laboratorio de Patología Oral da FOP/UNICAMP. Os dados címicos, histologícos e imunoistoquímicos obtidos serao tabuíados, analisados descritivamente e submetidos a testes estatísticos para availar as diferenças entre grupos.

Considerações eticas: inicialmente sera solicitada anuencia do dirigente do local alvo do estudo, a

Endereço:	Av.Limeira 901 Caba	a Postal 52			
Bairro: Ar	oBier		CEP:	13.414-903	
UF: SP	Município:	PIRACICABA			
Telefone:	(19)2106-5349	Fax: (19)2106-5	349	E-mail:	cep@fop.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.942.950

fim de que se possa desenvolver a pesquisa. Em observancia a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saude, que trata da pesquisa envolvendo seres humanos, o protocolo de pesquisa sera cadastrado na Plataforma Brasil para emissao de parecer etico do Comite de Ética em Pesquisa da Facuidade de odontologia de Piracicaba – FOP/Unicamp. Uma vez concluïda a pesquisa, seus resultados serao apresentados no local alvo de estudo como forma de respeito aos principios eticos e a retroalimentação da pesquisa.

Analise dos dados: Para analise estatística sera usado o software SPSS (Statistical Package for Social Sciences), considerando o nível de significancia de 5% (p<0.05).

Local da pesquisa: A pesquisa sera desenvolvida na Facuidade de odontología de Piracicaba (FOP) em ambito laboratorial - Laboratorio de patología oral, Departamento de diagnostico oral, FOP/Unicamp.

O projeto de pesquisa inclui a descrição do orçamento da pesquisa, citando que serão necessarios R\$ 14.157,50 para aquisição de material de consumo para os experimentos.

O projeto de pesquisa inclui um anexo "PERGUNTAS PARA ANÁLISE HISTOLÓGICA".

Pendencia 1 (atendida em 30/03/20). Quanto as características esperadas dos participantes da pesquisa quanto a faixa etaria e distribuição por sexo, os pesquisadores informaram na carta resposta que "Espera-se compor uma amostra de 160 casos, o qual predomine pacientes do sexo feminino em uma faixa etaria entre a terceira e quinta decada de vida". A alteração foi incluída no projeto de pesquisa.

Pendencia 2 (atendida em 27/03/20). A descrição da metodología na PB foi atualizada.

Pendencia 3 (atendida em 30/03/20). A descrição dos grupos na PB foi ajustada.

Pendencia 4 (atendida em 27/03/20). A descrição da Metodología de Analise dos dados na PB foi ajustada.

Pendencia 5 (atendida em 27/03/20). O cronograma proposto para a pesquisa no projeto preve cerca de 36 meses para conclusao do estudo, sendo 24 meses em etapas preliminares e 12 meses na execução dos metodos específicos da pesquisa. Ja o cronograma descrito na PB indica que a pesquisa sera iniciada em 06/07/2020 e sera concluida em 07/06/2021, em cerca de 12 meses.

O arquivo ajustado do projeto de pesquisa, com as areas modificadas marcadas em amareio foi apresentado.

Objetivo da Pesquisa: Hipotese: Nao ha estudos comparando a Sindrome de Sjogren (SS) com a sialodenite cronica.

Endereço: Av.Limeira 901 Cabra Postal 52				
Bairro: Areião UE: SP Município:	CEP:	13.414-903		
Telefone: (19)2106-5349	Fax: (19)2106-5349	E-mail: cep@fop.unicamp.br		





Continuação do Parecer: 3.942.950

inespecifica. No entanto, hipotetizamos que ha diferença nos achados histologicos da SS e da sialodenite cronica inespecifica, alem de apresentar imunofenotipo distinto.

Objetivo primario: Avaliar e comparar os achados histológicos nas glandulas salivares menores na SS e na sialodenites cronicas inespecíficas; alem de, avaliar e comparar o perfil imunoistoquímico do inflitrado inflamatorio encontrado na SS e na sialodenite cronica inespecífica.

Objetivos secundarios: A. Analisar a distribuiçao arquitetonica do inflitrado inflamatorio nas giandulas salivares menores na SS;B. Analisar a distribuiçao arquitetonica do inflitrado inflamatorio nas giandulas salivares menores na Sialodenite cronica inespecifica;C. Comparar os achados histologicos encontrados nas giandulas salivares menores na SS e na Sialodenite cronica inespecifica;D. Availar a presença de infocitos T, TCD4, TCD8 e infocitos B na Sindrome de Sjogren;E. Availar a presença de linfocitos T, TCD4, TCD8 e linfocitos B na Sialodenite cronica inespecifica;F. Comparar a presença de linfocitos T, TCD4, TCD8 e linfocitos B na Sialodenite cronica inespecifica;G. Availar a presença de linfocitos T, TCD4, TCD8 e linfocitos B na Sialodenite cronica inespecifica;G. Availar a presença de linfocitos T, TCD4, TCD8 e linfocitos B na Sialodenite cronica inespecifica;G. Availar a expressao das citocinas (iL-17, iL-18, TNF alfa e iFN gama) na Sindrome de Sjogren;H. Availar a expressao das citocinas (iL-17, iL-18, TNF alfa e iFN gama) na Sindrome de Sjogren;H. Availar a expressao das citocinas (iL-17, iL-18, TNF alfa e iFN gama) na Sindrome de Sjogren;H. Availar a expressao das citocinas (iL-17, iL-18, TNF alfa e iFN gama) na Sindrome de Sjogren e na Sialodenite cronica inespecífica.

#### Avallação dos Riscos e Beneficios:

Quanto aos riscos e desconfortos previstos para os participantes, os pesquisadores informaram que "Nao ha previsao de desconfortos e riscos para os pacientes em função da participação na pesquisa."

Quanto aos beneficios diretos previstos para os participantes, os pesquisadores informaram que "Com a conclusao deste estudo espera-se conhecer as diferenças histologicas e imunoistoquímicas encontradas nas glandulas salivares menores na Sindrome de Sjogren e na Sialodenite cronica inespecífica. Nao ha previsao de beneficios diretos para os pacientes participantes. Como beneficios indiretos espera-se esclarecer a etiopatologia da Sindrome de Sjogren e da Sialodenite cronica inespecífica".

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Quanto ao modo de abordagem dos participantes da pesquisa para a obtenção do TCLEos pesquisadores informaram que "Os blocos de parafina serao recuperados de arquivo, assim como os dados epidemiológicos serao obtidos dos registros de solicitações de blopsias. Os participantes que se encalxarem na pesquisa serao incluidos na pesquisa caso ja tenha o TCLE assinado

Endereço: Av.Limeira 901 Caixa Postal 52				
Bairro: Ar	oßie	CEP:	13.414-903	
UF: SP	Município:	PIRACICABA		
Telefone:	(19)2106-5349	Fax: (19)2106-5349	E-mail:	cep@fop.unicamp.br

Página 05 de 10





Continuação do Parecer: 3.942.950

previamente. Para a realização deste projeto, tendo em vista que serão utilizados dados secundarios a partir do estudo de material ja coletado para fins diagnosticos apenas de pacientes que autorizaram, previamente, o uso do material para estudos futuros sem a necessidade de uma nova consulta para consentimento. Compreendemos que, na forma documentada (laminas histopatologicas e blocos de parafina), ainda estamos lidando, essencialmente, com o individuo e que e absolutamente necessaria e indispensavel a autorização do mesmo para o uso de material proveniente de si. Entretanto, reiteramos que essa autorização ja foi concedida no momento em que o paciente autorizou o uso do material em futuros estudos e que o presente estudo nao interfere, altera ou seguer apresenta riscos substanciais, visto que a necessidade de outrora da biopsia foi atendida com fim diagnostico direcionado para cura no passado momento em que foi executada e, no presente estudo, serao apenas interpretadas por um novo anguio para melhor compreensao da etiopatogenese e características clinicopatologicas dessas lesoes. Os materiais coletados (blocos) no Biobanco Patología Celular B-023 serao armazenados em caixas de papelao junto ao Biobanco B023, na Facuidade de Odontologia de Piracicaba - FOP/Unicamp, Av Limeira, 901, sala dos arguivos de biocos, setor de Patología, Departamento de Diagnostico Oral. Os biocos serao devolvidos ao Biobanco Patología Celular B-023 apos os cortes histologicos. As laminas serao guardadas em caixas de papeiao na geladeira, terceira prateleira, da sala C2-27 ate o final da pesquisa. Ao termino da pesquisa, as laminas serao arguivadas em caixas de madeira com identificações no arguivo da patologia".

Pendencia 6 (atendida em 27/03/20). Quanto a participação de grupos vulneraveis na pesquisa os pesquisadores informaram que "A pesquisa não incluira a participação de grupo vulneravei".

Quanto as medidas para proteção ou minimização dos desconfortos e riscos previsiveis os pesquisadores informaram que "Não ha previsão de medidas pois não ha risco ou desconforto previsivel relacionado a realização desta pesquisa".

Quanto as medidas de proteçao a confidencialidade os pesquisadores informaram que "Todos os dados relacionados a identificação dos pacientes necessarios para a realização desta pesquisa serao utilizados unica e exclusivamente pela equipe e não serão fornecidos a outras pessoas não relacionadas ao projeto ou divulgados por meio de midias. Os pesquisadores não divulgarão dados que permitam a identificação dos participantes".

Quanto a previsao de ressarcimento de gastos os pesquisadores informaram que "Os pacientes nao terao nenhum gasto para que a pesquisa seja realizada, portanto nao ha previsao de

Bairro: Areião CEP: 13.414-903	
UF: SP Município: PIRACICABA	
Telefone: (19)2106-5349 Fax: (19)2106-5349 E-mail: cep@top.unicamp.br	

Página 06 de 10





Continuação do Parecer: 3.942.950

#### ressarcimento".

Quanto a previsao de indenização e/ou reparação de danosos pesquisadores informaram que "Não ha previsão de indenização e/ou reparação de danos pois não ha risco previsivel para os pacientes".

Quanto aos criterios para suspender ou encerrar a pesquisa os pesquisadores informaram que "Nao ha previsao de criterios para a suspensao desta pesquisa e a mesma sera encerrada quando as informações desejadas forem obtidas".

O arquivo com os comentarios eticos ajustados, com as areas modificadas marcadas em amareio foi apresentado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A FR foi apresentada preenchida (160 participantes, sem patrocinador principal) e assinada pela pesquisadora responsavel (Dra Thayna Meio de Lima Morais) e pelo Diretor Associado da FOP-UN/CAMP (Dr. Flavio Henrique Baggio Agular). A FR foi datada de 15/10/2019.

A capa do projeto cita os dados solicitados pelo CEP-FOP.

Foi apresentada a declaração dos pesquisadores, adequadamente preenchida e assinada.

Foi apresentada a declaração da instituição, adequadamente preenchida e assinada.

Foi apresentada a autorização de acesso e uso as amostras dos arquivos do Biobanco B-023, assinada peio Prof Pablo Agustin Vargas.

Os pesquisadores solicitaram a dispensa da aplicação do TCLE, pois serão utilizados dados secundarios a partir do estudo de material ja coletado para fins diagnosticos apenas de pacientes que autorizaram, previamente, o uso do material para estudos futuros sem a necessidade de uma nova consulta para consentimento.

Pendencia 7 (atendida em 27/03/20). Foi apresentado o regulamento ajustado do biorrepositorio para a pesquisa. As 180 amostras serao estocadas na mesma sala onde estao os arquivos do Biobanco. O manuselo das amostras sera de responsabilidade da pesquisadora Thayna Meio. O material sera estocado por cerca de 18 meses e entao devolvido ao Biobanco, nao havendo previsao de descarte de amostras. As amostras ficarao sob responsabilidade da pesquisadora Thayna durante a execução da pesquisa. Nao havera participação de outras instituições na pesquisa.

O orçamento descrito na PB informa que a pesquisa tera custo de R\$ 14.157,50, para aquisição de reagentes, e que sera bancada pelos pesquisadores.

Endereço: Av.Limeira Bairro: Areião	901 Caixa Postal 5	2 CEP:	13.414-903	
Telefone: (19)2106-53	49 Fax:	(19)2106-5349	E-mail:	cep@fop.unicamp.br

Página 07 de 10





Continuação do Parecer: 3.942.950

A pesquisa foi classificada nas Grandes Áreas 2 e 4 (Ciencias Biologicas e Ciencias da Saude) e tem como título público "ESTUDO CLÍNICO-PATOLÓGICO E IMUNOISTOQUÍMICO COMPARATIVO DOS ACHADOS HISTOLÓGICOS ENCONTRADOS NAS GLÂNDULAS SALIVARES MENORES NA SÍNDROME DE SJÓGREN E NA SIALOADENITE CRÓNICA INESPECÍFICA".

A pesquisa nao foi classificada nas areas tematicas especiais. A instituição proponente da pesquisa e a Facuidade de Odontologia de Piracicaba – Unicamp e nao foi listada instituição coparticipante.

#### Recomendações:

As recomendações a seguir não são pendencias e podem ou não ser aplicaveis ao protocolo em teia. Não ha necessidade de resposta as mesmas. RECOMENDAÇÃO 1- É obrigação do pesquisador desenvolver o projeto de pesquisa em completa conformidade com a proposta apresentada ao CEP. Mudanças que venham a ser necessarias apos a aprovação pelo CEP devem ser comunicadas na forma de emendas ao protocolo por melo da PB. RECOMENDAÇÃO 2- Apos a aprovação do protocolo de pesquisa os pesquisadores devem atentar para a necessidade de envío de relatorios parciais de atividade (no minimo um a cada 12 meses) e do relatorio final de atividade (ao termino da pesquisa). Os pesquisadores devem informar e justificar ao CEP a eventual necessidade de interrupção ou interrupção total ou parcial da pesquisa. RECOMENDAÇÃO 3- Reforça-se a necessidade do registro de Biorrepositorios para as amostras biologicas coletadas e que nao sejam de uso imediato. A intenção deve ser registrada no projeto, no Regulamento do Biorrepositorio e no TCLE que sera assinado pelo participante. RECOMENDAÇÃO 4- Os pesquisadores devem atentar para a necessidade de aplicação de TCLE para coleta de amostras a serem estocadas em Biobancos e Biorrepositorios e para a necessidade de aplicação de novo TCLE quando da realização de novas pesquisas com o material estocado. RECOMENDAÇÃO 5- Pesquisas com dentes doados por profissionais de saude ainda sao toleradas em hipotese peio CEP-FOP, mas os pesquisadores devem estar cientes de que esta solução dista do ideal etico de consulta direta ao participante por meio de TCLE especifico da pesquisa ou da obtenção dos dentes a partir de um Biobanco de dentes e que estas ultimas situações deveriam ser escolhidas em substituição a primeira. RECOMENDAÇÃO 6- Os pesquisadores devem manter os arguivos de fichas, termos, dados e amostras sob sua guarda por pelo menos 5 anos apos o termino da pesquisa.RECOMENDAÇÃO 7- Destaca-se que o parecer consubstanciado e o documento oficial de aprovação do sistema CEP/CONEP e os certificados emitidos pela secretaria do CEP-FOP, a pedido, apos a aprovação final do protocolo, so tem valor simbolico e devem ser evitados. RECOMENDAÇÃO 8- intercorrencias

 Enderego:
 Av.Limeira 901 Caixa Postal 52

 Bairro:
 Areião
 CEP:
 13.414-903

 UF:
 SP
 Município:
 PIRACICABA

 Telefone:
 (19)2106-5349
 Fax:
 (19)2106-5349
 E-mail:
 cep/@fop.unicamp.br

Página 08 de 10





Continuação do Parecer: 3.942.950

eeventos adversosdevem ser relatados ao CEP-FOP por melo da PB. RECOMENDAÇÃO 9- Os pesquisadores devem encaminhar os resultados da pesquisa para publicação e divulgação, com devido credito a todos que tenham colaborado com a realização da pesquisa. RECOMENDAÇÃO 10- O parecer do CEP-FOP e fortemente baseado nos textos do protocolo encaminhado pelos pesquisadores e pode conter inclusive trechos transcritos literalmente do projeto ou de outras partes do protocolo. Trata-se, ainda assim, de uma interpretação do protocolo. Caso aigum trecho do parecer não corresponda ao que efetivamente foi proposto no protocolo, os pesquisadores devem se manifestar sobre esta discrepancia. A não manifestação dos pesquisadores sera interpretada como concordancia com a fidedignidade do texto do parecer no tocante a proposta do protocolo.

Conclusões ou Pendéncias e Lista de Inadequações: Nao ha mais pendencias por resolver (vide texto acima).

Considerações Finais a critério do CEP:

Parecer de aprovação de Protocolo emitido "ad referendum" conforme autorização do Colegiado na reunião de 19/02/2020. O parecer sera submetido para homologação na reunião de 08/04/2020.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Aldnino	Postagem	Autor	Situaçao
informações Basicas	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_P	30/03/2020		Acelto
do Projeto	ROJETO_1453253.pdf	14:02:32		
Outros	Cartaresposta2.pdf	30/03/2020	Thayna Melo de Lima	Acelto
		14:00:26	Morals	
Projeto Detalhado /	2Projeto.pdf	30/03/2020	Thayna Meio de Lima	Aceito
Biochura		13:59:54	Morals	
investigador				
Outros	cartaresposta.pdf	27/03/2020	Thayna Meio de Lima	Aceito
		21:23:32	Morals	
Outros	RegulaBlorrep.pdf	27/03/2020	Thayna Meio de Lima	Acelto
		15:05:58	Morais	
Outros	3Comentarios.pdf	27/03/2020	Thayna Meio de Lima	Aceito
		15:04:57	Morais	
Outros	55Autarq.pdf	20/01/2020	Thayna Meio de Lima	Aceito
		10:46:06	Morals	
Declaração de	52Declarainstituicao.pdf	22/10/2019	Thayna Meio de Lima	Acelto
instituição e	-	12:20:59	Morals	

Endereço: Av.Limeira 901 Caixa Postal 52				
Bairro: A	reião	CEP:	13.414-903	
UF: SP	Município:	PIRACICABA		
Telefone:	(19)2106-5349	Fax: (19)2106-5349	E-mail:	cep@fop.unicamp.br

Pikolna 09 de 10



Continuação do Parecer: 3.942.950

infraestrutura	52Declarainstituicao.pdf	22/10/2019	Thayna Melo de Lima	Aceito
	-	12:20:59	Morais	
Declaração de	51 DeclaraPesquisadores.pdf	22/10/2019	Thayna Meio de Lima	Acelto
Pesquisadores		12:19:54	Morals	
Folha de Rosto	1folhaderosto.pdf	22/10/2019	Thayna Melo de Lima	Aceito
	-	11:59:17	Morals	

Situação do Parecer: Aprovado Necessita Apreciação da CONEP: Nao

PIRACICABA, 30 de Março de 2020

Assinado por: jacks jorge junior (Coordenador(a))

 Endereço:
 Av.Limeira 901 Caixa Postal 52

 Bairro:
 Areião
 CEP:
 13.414-903

 UF:
 SP
 Município:
 PIRACICABA

 Telefone:
 (19)2106-5349
 Fax:
 (19)2106-5349
 E-mail:
 cep@fop.unicamp.br

Página 10 de 10

Plataforma Brazil

#### ANEXO 2 – Comprovante de submissão do artigo

02/03	/2022 08:31	ScholarOne Manuscripts
	Oral Diseases	
	# Homa	
	/ Author	
	O Review	

# Submission Confirmation

Print

Thank you for your submission

Submitted to Oral Diseases

Manuscript ID

ODI-03-22-OA-10822

Title

Comparative study of the lymphohistiocytic inflitrate in Sjögren's syndrome and chronic sialadenitis

#### Authors

Melo de Lima Morais, Thaynâ Rodrigues-Fernandes, Caria Isabelly Araŭjo, Anna Luiza dos Santos, Teresa Cristina de Almeida, Osiel Paes Pires, Fâbio

Date Submitted 02-Mar-2022

Author Dashboard

Tese	e Thayná	
RELATÓ	RIO DE ORIGINALIDADE	
9 ÍNDICE SEMELH	% 8% 7% 2% DOCUMENT	OS DOS
FONTES	5 PRIMÁRIAS	
1	repositorio.unicamp.br Fonte da Internet	4%
2	www.ncbi.nlm.nih.gov Fonte da Internet	1%
3	Mario Bautista-Vargas, Alvaro J. Vivas, Gabriel J. Tobón. "Minor salivary gland biopsy: Its role in the classification and prognosis of Sjögren's syndrome", Autoimmunity Reviews, 2020 Publicação	1%
4	tutoia-vm.dca.fee.unicamp.br	1%
5	Submitted to University of Iowa	1%
6	P.C. Fox. "Current Concepts of Autoimmune Exocrinopathy: Immunologic Mechanisms in the Salivary Pathology of Sjogren's Syndrome", Critical Reviews in Oral Biology & Medicine, 01/01/1996 Publicação	1%

7	Www.dovepress.com
	Fonte da Internet

8 www.amhsr.org

Excluir citações Excluir bibliografia Desligado Em Excluir correspondências < 1%

1% 1%

