

CAMILA NUNES CARVALHO SORGATO

**DETECÇÃO E CARGA VIRAL DE EBV E CMV EM PORTADORES DE ARTRITE
REUMATOIDE E SUA RELAÇÃO COM A SÍNDROME DE SJÖGREN
SECUNDÁRIA**

Recife – PE

2017

CAMILA NUNES CARVALHO SORGATO

**DETECÇÃO E CARGA VIRAL DE EBV E CMV EM PORTADORES DE ARTRITE
REUMATOIDE E SUA RELAÇÃO COM A SÍNDROME DE SJÖGREN
SECUNDÁRIA**

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de doutor em Odontologia, área de concentração em Clínica Odontológica Integrada.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Alcino Monteiro Gueiros

Recife –PE

2017

S713d Sorgato, Camila Nunes Carvalho.
 Detecção e carga viral de EBV e CMV em portadores de artrite reumatóide
 e sua relação com a síndrome de sjögren secundária / Camila Nunes
 Carvalho Sorgato. – Recife: o autor, 2017.
 87 f.; il.; 30 cm.

Orientador: Luiz Alcino Monteiro Gueiros.
 Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de
 Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em Odontologia.
 Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Artrite reumatóide. 2. Síndrome de sjögren. 3. Citomegalovírus. I.
 Gueiros, Luiz Alcino Monteiro (orientador). II. Título.

617.6 CDD (23.ed.)UFPE (CCS 2018 - 132)

CAMILA NUNES CARVALHO SORGATO

**DETECÇÃO E CARGA VIRAL DE EBV E CMV EM PORTADORES DE ARTRITE REUMATOIDE E
SUA RELAÇÃO COM A SÍNDROME DE SJÖGRAN SECUNDÁRIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Odontologia.

Aprovada em: 26.09.2017

BANCA EXAMINADORA:

Prof^o. Dr. Luiz Alcino Monteiro Gueiros (Orientador)

Prof^o. Dr. Luydson Richardson Silva Vasconcelos (1^o Examinador)

Prof^a. Dra. Tatiany Patrícia Romão Pompílio de Melo (2^o Examinador)

Prof^a. Dra. Ângela Luzia Branco Pinto Duarte (3^o Examinador)

Prof^o. Dr. Arnaldo de França Caldas Júnior (4^o Examinador)

Dedico este trabalho aos meus pais, Aderval e Dalila, ao meu irmão Aderval Filho e ao meu marido Lucas. O amor de vocês tornou este momento possível.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me amar incondicionalmente e nunca me desamparar. Por me cuidar com amor de Pai. Por não ter me deixado perder o equilíbrio... sei que inúmeras forças quiseram que eu caísse.

Aos meus pais, pela força transmitida por mãos que sempre me acolhem, e pelo amor que enriquece a minha vida.

Ao meu irmão, sempre provando que amor fraterno é de fato único.

Ao meu esposo, que sempre proporcionou sentido às minhas realizações. Meu grande amor... te amo.

Às famílias Nunes, Carvalho e Sorgato pelo constante incentivo.

À Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, na pessoa do reitor Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado.

Ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, na pessoa da coordenadora Profa. Dra. Alessandra Tavares Carvalho.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao meu orientador, prof. Dr. Luiz Alcino Gueiros, pelo grande apoio e comprometimento em todas as etapas deste estudo.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Odontologia, por todos os ensinamentos.

Aos amigos da pós-graduação em Odontologia por todos os ensinamentos, em especial ao amigo Eduardo Eudes, por todo companheirismo.

Ao Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas HC-UFPE, em especial à Dra. Ângela Duarte e sua equipe, pela colaboração.

Ao Dr. Luydson e Dra. Tatiany, grandes pesquisadores da Fundação Oswaldo Cruz. Muito obrigado pela colaboração nas etapas laboratoriais.

À minha grande amiga Marília Lins e Silva, agradeço a Deus por ter me presenteado com tão grande amizade! A caminhada na pós-graduação foi bem mais

leve com você para compartilhar todas as tensões e alegrias que envolveram essa luta. Minha mais sincera gratidão!

À minha amiga Mariana Perez, por toda a ajuda, carinho e momentos vivenciados. Sua amizade foi um presente do doutorado. Muito obrigada por tudo!

Aos meus velhos amigos, cada um de vocês deixou uma marca em minha vida. Agradeço a Deus por manter as sinceras amizades sempre perto de mim.

Aos pacientes e funcionários do ambulatório de Reumatologia do Hospital das Clínicas/UFPE e do ambulatório de Estomatologia/UFPE, em especial Rita Maria da Cruz, que tornaram possível a conclusão desta pesquisa. Muito obrigada!

A todos os meus queridos professores da graduação da Universidade Federal de Alagoas – UFAL, especialmente profa. Dra. Patrícia Batista Lopes do Nascimento e prof. Dr. Luiz Carlos Oliveira. Vocês sempre estiveram presentes aqui comigo.

Às constantes dificuldades encontradas, foram grandes adversárias, mas tornaram as vitórias muito mais saborosas.

*“Conheça todas as teorias,
domine todas as técnicas,
mas ao tocar uma alma humana
seja apenas outra alma humana.”*

Carl Jung

RESUMO

O papel das infecções virais na patogênese de doenças autoimunes tem sido há muito tempo sugerido, mas evidências adicionais ainda são necessárias. O objetivo deste estudo foi avaliar a associação entre EBV e CMV e a presença de AR e sua associação com SS. Foi avaliada uma amostra composta por 256 pacientes de ambos os sexos e maiores que 18 anos, distribuídos em três grupos: artrite reumatoide (AR, n=108), síndrome de Sjögren associada à artrite reumatoide (AR/SS, n=20) e controles saudáveis (C, n=128). Os pacientes foram avaliados quanto à atividade da AR e foram submetidos à sialometria em repouso, teste de Schirmer e biópsia de glândula salivar menor em caso de suspeita de SS. Amostras de sangue foram coletadas para detecção e quantificação das cargas virais de CMV e EBV e amostras de tecido glandular foram utilizadas para detecção destes vírus por hibridização in situ (EBV) e imunohistoquímica (CMV). O EBV foi mais frequente em pacientes com a AR e SS secundária que nos controles saudáveis ($p < 0,0001$), porém sem correlação com os marcadores clínicos ($p > 0,05$) e sem diferença entre os grupos AR e AR/SS ($p > 0,05$). A média do número de cópias do EBV/DNA foi mais elevada em indivíduos portadores de AR (149,42 cópias/ μ L) e SS (99,24 cópias/ μ L) que no grupo controle (61,51 cópias/ μ L, $p = 0,936$). Foi encontrada associação estatisticamente significativa entre o teste de Schirmer e a presença do EBV/DNA ($p = 0,03$). O CMV foi pouco frequente nos dois grupos. Os dois vírus não foram detectados nas biópsias de glândulas salivares menores. A presença do EBV/DNA no sangue periférico porém não sua carga viral está associada à AR, mas não a SS.

Palavras-chave: Artrite Reumatoide. Síndrome de Sjögren. Citomegalovírus.

ABSTRACT

The role of viral infections in the pathogenesis of autoimmune diseases has long been suggested, but available evidence is still available. The objective of this study was to evaluate an association between EBV and CMV and the presence of RA and its association with SS. A sample composed of 256 patients of both sexes and older than 18 years, divided into three groups: rheumatoid arthritis (RA, n=108), Sjögren's syndrome associated with rheumatoid arthritis (RA/SS, n = 20) and healthy controls (C, n = 128). Patients were submitted to resting sialometry, Schirmer's test and minor salivary gland biopsy in case of suspected SS. Blood samples were collected for detection and quantification of viral loads of CMV and EBV and glandular tissue samples for the detection of these viruses by *in situ* hybridization (EBV) and immunohistochemistry (CMV). EBV was more frequent in patients with RA and secondary SS than in healthy controls ($p < 0.0001$), but no correlation with clinical markers ($p > 0.05$) and no difference between RA and AR/SS ($p > 0.05$). An EBV/DNA copy number average was higher in RA (149.42 copies/ μ L) and SS (99.24 copies/ μ L) non-control (61.51 copies/ μ L, $p = 0.936$). A statistically significant association was found between the Schirmer test and an EBV/DNA presence ($p = 0.03$). CMV was uncommon in both groups. The two viruses were not detected in biopsies of minor salivary glands. The presence of EBV/DNA in peripheral blood but not its viral load is associated with RA but not with SS.

Key words: Rheumatoid arthritis. Sjögren's syndrome. Cytomegalovirus.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Localização espacial dos primers e sonda utilizada nas reações de PCR contra a sequência gênica do Herpes vírus humano 4 linhagem YCCEL1 disponível no *GeneBank*: AP015016.1. Barra verde indica o fragmento de 404pb amplificado por PCR.....38
- Figura 2 - A. Fragmento gênico amplificado por PCR a partir do genoma do vírus Epstein-Barr, separado por eletroforese em gel de agarose a 1% e purificado através de kit *GFX DNA and Gel Band Purification®* (GE Healthcare). O fragmento gênico possui $\cong$ 404pb (associação de primers P1F EBVclonagem/ P1R EBVclonagem) pares de bases (pb) respectivamente. B. Mapa do vetor pGEM®-T Easy utilizado para a clonagem.....40

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 -	Critérios de classificação da síndrome de Sjögren de acordo com o grupo de Consenso Americano e Europeu (Vitali <i>et al.</i> , 2002).....	18
Quadro 2 -	Critérios do Colégio Americano de Reumatologia para classificação da artrite reumatoide (Arnett <i>et al.</i> , 1988).....	21
Tabela 1 -	Oligonucleotídeos específicos desenhados a partir do genoma do herpes vírus humano 4 linhagem YCCEL1	38
Tabela 2 -	Avaliação da associação entre gênero, idade, marcadores clínicos de AR e SS e os grupos AR e AR/SS.....	42
Tabela 3 -	Presença do vírus EBV/DNA no sangue de acordo com os grupos.....	43
Tabela 4 -	Associação entre os marcadores clínicos de SS e AR e a presença do EBV/DNA no sangue.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS

AR	Artrite reumatoide
CMV	Citomegalovírus
DAS28	Escore de atividade da doença (Artrite reumatoide)
EBV	Vírus Epstein Barr
ES	Esclerose múltipla
FSR	Fluxo salivar em repouso
HCV	Vírus da hepatite C
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
MI	Mononucleose infecciosa
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RG	Receptor glicocorticoide
SS	Síndrome de Sjögren
SSp	Síndrome de Sjögren primária
SSs	Síndrome de Sjögren secundária
VHS	Velocidade de hemossedimentação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 SÍNDROME DE SJÖGREN.....	15
1.2 ARTRITE REUMATOIDE	20
1.3 EBV	22
1.4 CMV	24
1.5 EBV E CMV NA AR E SS.....	26
1.6 BIÓPSIA DE GLÂNDULA SALIVAR MENOR	29
2 OBJETIVOS.....	32
2.1 OBJETIVO GERAL	32
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
3 METODOLOGIA	33
3.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	33
3.1.1 Grupo AR (n=108).....	33
3.1.2 Grupo AR/SS (n=20)	33
3.1.3 Grupo Controle (n=128)	34
3.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	34
3.2.1 Grupos AR e AR/SS.....	34
3.2.2 Grupo Controle.....	34
3.3 AVALIAÇÃO DOS PACIENTES	34
3.4 AVALIAÇÃO DO FLUXO SALIVAR EM REPOUSO	35
3.5 TESTE DE SCHIRMER.....	35
3.6 BIÓPSIA DE GLÂNDULA SALIVAR MENOR	36
3.7 ATIVIDADE DE AR	36
3.8 PROCESSAMENTO DO SANGUE E ISOLAMENTO DO DNA	37
3.9 CLONAGEM DO VÍRUS EBV	37

3.10 CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DO FRAGMENTO GÊNICO DO VÍRUS EBV EM PGEMTEASY	38
3.11 AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS POR PCR, CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO	39
3.12 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE – PCR PARA DETECÇÃO VIRAL E QUANTIFICAÇÃO DAS CÓPIAS VIRAIS	40
3.13 DETECÇÃO TECIDUAL DE EBV E CMV	41
4 RESULTADOS.....	42
4.1 PACIENTES	42
4.2 MARCADORES CLÍNICOS DE AR.....	42
4.3 MARCADORES CLÍNICOS DE SS	43
4.4 DETECÇÃO DE EBV/DNA E CMV/DNA NO SANGUE E CÓPIAS VIRAIS ...	43
4.5 DETECÇÃO DE EBV E CMV NAS GLÂNDULAS SALIVARES	45
5 DISCUSSÃO	46
6 CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS.....	52
APÊNDICES	57
APÊNDICE A - Artigo	57
APÊNDICE B - Questionário da pesquisa	70
APÊNDICE C - Termo De Consentimento Livre E Esclarecido.....	75
ANEXOS	77
ANEXO A - Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa.....	77
ANEXO B - Normas da Revista (Oral Diseases).....	82

1 INTRODUÇÃO

1.1 SÍNDROME DE SJÖGREN

A síndrome de Sjögren (SS) é uma desordem inflamatória sistêmica crônica que afeta principalmente glândulas exócrinas, levando à xerostomia e xeroftalmia. Caracteriza-se pela infiltração de células mononucleares nas glândulas exócrinas e destruição acinar e ductal, com consequente hipofunção glandular (Tzioufas *et al.*, 2012; Brito-Zerón *et al.*, 2017).

A SS é categorizada em primária (SSp), quando ocorre isoladamente, ou como secundária (SSs), quando em associação com outra doença autoimune sistêmica, tal como lúpus eritematoso sistêmico (LES) ou artrite reumatoide (AR). A forma primária apresenta prevalência de 0,5 a 1%, enquanto que a prevalência das formas secundárias parece mudar de acordo com a doença associada, variando de 9 a 19% no LES a 4 a 31% na AR. (Ramos-Casals *et al.*, 2002). A forma secundária é frequentemente considerada como evolução sintomática da patologia de base e não como uma doença associada (Rozman *et al.*, 2004; Mavragani *et al.*, 2007).

Clinicamente os portadores de SS exibem sinais e sintomas oculares e orais, envolvimento cutâneo e de mucosas nasal e vaginal, além de fadiga, linfadenopatia, cirrose biliar primária, nefrite intersticial, fibrose pulmonar, vasculites e neuropatias periféricas. Os achados oculares e orais, no entanto, estão sempre presentes e são os mais relevantes para o diagnóstico (Ramos-Casals *et al.*, 2008). Estes se caracterizam por infiltração do parênquima glandular por células linfocíticas, predominantemente T CD4+ (60% a 70%), com características de célula de memória, células B, plasmócitos, mastócitos, macrófagos e células dendríticas. Essa desordem do sistema imunitário leva à ativação de linfócitos B policlonais e produção de autoanticorpos, especialmente anticorpos antinucleares (ANA), autoanticorpos para antígenos SS-A (Ro), SS-B (La) e fator reumatoide (Mignogna *et al.*, 2005; Daniels *et al.*, 2011). Com alguma frequência, observa-se envolvimento de outras superfícies, como pele, vagina, tubos braquiais e do trato gastrointestinal, além de manifestações extrarticulares como fadiga, fenômeno de Raynaud e artralgias (Bowman *et al.*, 2012).

O envolvimento das glândulas salivares maiores e menores na SS leva à diminuição da secreção salivar, resultando em secura bucal, maior ocorrência de

infecções orais e cáries dentais devido à perda da lubrificação, tamponamento e capacidade antimicrobiana da saliva. Infecções fúngicas como a candidíase também são comuns, principalmente as lesões do tipo pseudomembranosa e eritematosa, língua fissurada, atrofia da papila filiforme e queilite angular. O aumento da glândula parótida ou de outra glândula salivar maior também pode ocorrer e apresenta-se de forma assintomática e é auto-limitante. O aumento persistente deve ser acompanhado, no entanto, deve-se excluir uma superinfecção bacteriana e o desenvolvimento de linfoma (Mavragani *et al.*, 2010; Toida *et al.*, 2010; Deák *et al.*, 2013).

A infiltração linfocítica na glândula lacrimal pode resultar, além da diminuição da produção de lágrima, deficiência em sua composição, o que pode levar, consequentemente, ao dano na córnea e epitélio conjuntival, uma condição conhecida como ceratoconjuntivite *sicca* (CCS) (Tzioufas *et al.*, 2012). Como resultado da CCS, pacientes com SS podem apresentar sensação de corpo estranho, irritação, fotossensibilidade e secreções espessas no canto interno do olho, todas levando ao desconforto e possibilidade de deficiência visual com incapacidade funcional considerável. Além disso, complicações oculares incluindo ulceração ocular e cicatrizes, ceratite bacteriana e infecções palpebrais podem ocorrer (Mavragani *et al.*, 2010).

Reconhece-se que, em termos gerais, a patogênese da SS é multifatorial e vários passos são necessários para seu estabelecimento. A alteração do padrão da resposta imune com produção sistêmica de auto-anticorpos direcionados às partículas da ribonucleoproteína (SSA/Ro e SSB/La) pode ter como gatilho fatores genéticos e ambientais. Dentre os fatores ambientais destaca-se a infecção viral que, através da estimulação de células dendríticas ou glandulares, ativa o sistema de resposta imune inata (Rozman *et al.*, 2004; Kivity *et al.*, 2014; Ball *et al.*, 2015).

Por muitos anos, a patologia imune na SS, assim como em outras doenças autoimunes, foi largamente atribuída às células T devido a sua infiltração em um grande número de órgãos e glândulas afetadas. As células B, por outro lado, foram inicialmente classificadas como tendo um papel menor, as quais atuariam mais como braço efetor do processo autoimune através da produção excessiva de autoanticorpos anti-Ro/SSA e anti-La/SSB (Delaleu *et al.*, 2008; Hamza *et al.*, 2012). Aproximadamente três quartos dos pacientes com SS possuem autoanticorpos anti-

Ro e/ou anti-La no soro e muitos desses pacientes possuem também níveis elevados de imunoglobulinas (hipergamaglobulinemia) (Hernández-Molina *et al.*, 2011). Uma proporção considerável de pacientes com anticorpos anti-Ro/La possuem envolvimento orgânico sistêmico, incluindo neuropatia, rash cutâneo (púrpura e vasculite), doença pulmonar intersticial, acidose renal tubular e anormalidades hematológicas. Ainda, há um aumento de 44 vezes do risco de linfoma de células B em pacientes com SS (Bowman *et al.*, 2012).

O marco microscópico dessa doença é a infiltração linfocitária nas glândulas salivares e lacrimais. No começo do quadro, a infiltração consiste predominantemente de células T do tipo CD4+ e menos células do tipo B (CD20+) (aproximadamente 20% do total de infiltração populacional). Outros tipos celulares, como macrófagos e células dendríticas, bem como a presença de citocinas proinflamatórias (IL-6, TNF, IL-12, IL-18) têm suas presenças e frequências associadas à severidade das lesões autoimunes (Manoussakis *et al.*, 2010; Mavragani *et al.*, 2010; Youinou *et al.*, 2011).

As citocinas são mediadores importantes na inflamação e nas reações imunes e, nos últimos anos, o papel de citocinas específicas na SS tem sido extensivamente estudado. As células T helper CD4+ no infiltrado linfocitário de pacientes com SS produzem tanto as citocinas da resposta Th1 (IL-2 e IFN gama) quanto as da Th2 (IL-4, 5, 13). A resposta Th2 parece prevalecer em infiltração de baixo grau, enquanto a Th1 predomina em pacientes com a doença bem estabelecida e com infiltrado linfocítico avançado (Mavragani *et al.*, 2010).

A complexidade das características clínicas dos pacientes com SSp e SSs tornou difícil, ao longo dos anos, identificar um grupo homogêneo de pacientes com uma etiopatogênese comum ou prognóstico para, por fim, elaborar um critério classificatório para a doença. Essa é provavelmente a razão mais importante que explica porque muitos critérios classificatórios foram propostos para a SS (Baldini *et al.*, 2012).

Atualmente, o critério do Consenso Americano-Europeu de 2002 é o mais utilizado para pacientes com SSp e SSs. Neste critério, deve-se preencher pelo menos 4 dos 6 critérios para completar o diagnóstico de SSp, sendo um deles sorologia positiva para os autoanticorpos anti-Ro e anti-La ou biópsia de glândula salivar menor positiva (Vitali *et al.*, 2002). Esse diagnóstico também se baseia em características

objetivas e subjetivas de boca seca (xerostomia) e olho seco (xeroftalmia) (Reksten *et al.*, 2009) (Quadro 1). O diagnóstico de envolvimento ocular é conseguido através da mensuração da produção de lágrima e estabilidade do filme de lágrima (usando teste de Schirmer e teste da quebra de lágrima, respectivamente) e pela coloração da córnea usando o teste de Rosa de Bengala – é um teste mais específico para diagnosticar xeroftalmia que o teste de Schirmer, pois avalia o dano do epitélio (Manoussakis *et al.*, 2010). Para o diagnóstico de xerostomia, o paciente é avaliado através da quantidade produzida de saliva em repouso por 15 minutos. Pacientes com menos de 1,5ml por 15 minutos são considerados positivos para esse critério. Além do fluxo salivar em repouso, o envolvimento de glândula salivar pode ser avaliado através de sialografia da parótida e cintilografia (Vitali *et al.*, 2002).

Quadro 1 - Critérios de classificação da síndrome de Sjögren de acordo com o Grupo de Consenso Americano e Europeu (Vitali *et al.*, 2002).

1. Sintomas oculares: resposta positiva a uma das três perguntas:
Você tem desconforto olhos secos de modo diário e persistente nos últimos 3 meses?
Você tem sensação recorrente de areia nos olhos?
Você utiliza substitutos lacrimais mais de 3 vezes por dia?
2. Sintomas orais: resposta positiva a uma das três perguntas:
Você tem sensação de boca seca diariamente há mais de três meses?
Você teve aumento recorrente ou persistente de glândulas salivares na fase adulta?
Você sente necessidade de ingerir líquidos para auxiliar a deglutição de alimentos secos?
3. Sinais oculares: evidência objetiva de envolvimento ocular definida como resultado positivo a um dos dois testes abaixo:
Teste de Schirmer, realizado sem anestesia (<5mm em 5 minutos)
Escore de Rosa Bengala ou outro escore de ressecamento ocular (>4 de acordo com o sistema de van Bijsterveld)
4. Histopatologia: biópsia de glândula salivar menor obtida de mucosa clinicamente normal com presença de sialoadenite linfocítica focal, avaliada por um patologista, com escore de foco >1. Este é definido como o número de focos linfocíticos (mais de 50 linfócitos adjacentes a um ácino mucoso aparentemente normal) por área de 4mm² de tecido glandular.
5. Envolvimento de glândula salivar: evidência objetiva de envolvimento glandular definido como resultado positivo a um dos testes abaixo:
Fluxo salivar não estimulado (<1.5 ml em 15 minutos)
Sialografia da parótida mostrando presença de sialectasia difusa sem evidência de destruição dos ductos maiores.
Cintilografia das glândulas salivares mostrando captação retardada, concentração reduzida e/ou excreção retardada do marcador.
6. Auto-anticorpos: presença dos seguintes auto-anticorpos no soro:
Anticorpos para os antígenos Ro(SSA) ou La(SSB) ou ambos.

Observação: para o diagnóstico de SSs os pacientes devem apresentar artrite reumatoide e a presença dos itens 1 ou 2 associados a mais dois itens (entre os itens 3 e 5).

1.2 ARTRITE REUMATOIDE

A AR é uma doença sistêmica de natureza inflamatória crônica que afeta principalmente as articulações sinoviais, mas é muitas vezes acompanhada por diferentes manifestações extra articulares (Jonsson *et al.*, 2002; Balandraud *et al.*, 2003). Afeta 1% da população mundial, com uma incidência três vezes maior em mulheres quando comparada aos homens, possuindo a população brasileira prevalência semelhante à da população mundial, aproximando-se de 1% (Zalewska *et al.*, 2013). A AR tende a surgir a partir da quarta década de vida, apresentando um pico de incidência na quinta década (Louzada-Júnior *et al.*, 2007).

A principal característica dessa doença é uma poliartrite simétrica persistente que afeta as mãos, punhos e pés, apesar de todas as articulações diartrodiais poderem ser afetadas. A AR pode iniciar com apenas uma ou poucas articulações inchadas e dolorosas (artrite ou sinovite), geralmente acompanhada de rigidez para movimentá-las principalmente pela manhã e que pode durar horas até melhorar (Turesson *et al.*, 2003).

O quadro clínico mais visto é caracterizado por artrite simétrica, principalmente nas mãos, punhos e pés, que vai evoluindo para articulações maiores e mais centrais como cotovelos, ombros, tornozelos, joelhos e quadris. As mãos são acometidas em praticamente todos os pacientes. A evolução é progressiva sem o tratamento adequado, levando a desvios e deformidades decorrentes do afrouxamento ou da ruptura dos tendões e das erosões articulares. A AR pode levar a alterações em todas as estruturas das articulações, como ossos, cartilagens, cápsula articular, tendões, ligamentos e músculos que são os responsáveis pelo movimento articular (Carmona *et al.*, 2003).

A etiologia da artrite reumatoide ainda não está totalmente entendida, e envolve uma ação combinada de fatores genéticos e ambientais. A genética também participa na severidade da doença. Um evento-gatilho, possivelmente infecção ou autoimunidade, inicia a inflamação nas articulações. Complexas interações entre múltiplas células imunes e suas citocinas, proteinases e fatores de crescimento mediam a destruição articular e complicações sistêmicas (Khurana *et al.*, 2005; Makithia *et al.*, 2011).

A ativação das células T em um hospedeiro imunologicamente suscetível é o evento mais provável para o início do processo reumatoide. A ativação subsequente dessas células T leva a múltiplos efeitos, entre eles a ativação e proliferação das células endoteliais e da linhagem sinovial, recrutamento e ativação de células pró-inflamatórias adicionais da medula óssea e circulação, secreção de citocinas e proteases por macrófagos e células sinoviais semelhantes e fibroblastos, além da produção de autoanticorpos (García-Carrasco *et al.*, 2006; Waldburger *et al.*, 2008).

O critério do Colégio Americano de Reumatologia (Quadro 2) é útil para o diagnóstico, porém um diagnóstico definitivo com estes parâmetros nem sempre é possível em todos os casos. Um paciente é classificado como portador de AR se pelo menos 4 dos 7 critérios forem identificados. Os critérios de 1 a 4 devem estar presentes por no mínimo 6 semanas. Esse critério só deve ser utilizado em combinação com todas as informações disponíveis (Alinko *et al.*, 2010; Makithia *et al.*, 2011).

Quadro 2 - Critérios do Colégio Americano de Reumatologia para classificação da artrite reumatoide (Arnett *et al.*, 1988).

1. Rigidez matinal: rigidez articular durando pelo menos 1 hora;
2. Artrite de três ou mais áreas: pelo menos três áreas articulares com edema de partes moles ou derrame articular, observado pelo médico;
3. Artrite de articulações das mãos (punho, interfalangeanas proximais e metacarpofalangeanas);
4. Artrite simétrica;
5. Nódulos reumatóides;
6. Fator reumatóide sérico;
7. Alterações radiográficas: erosões ou osteopenia localizadas em radiografias de mãos e punhos.

→ Os critérios de 1 a 4 devem estar presentes por pelo menos seis semanas.

Apesar dos mecanismos das doenças autoimunes não terem sido totalmente elucidados, fatores genéticos e ambientais, como agentes infecciosos, são considerados responsáveis pelo desenvolvimento destas doenças (Toussiot *et al.*, 2007). De modo semelhante a SS, alguns vírus também podem estar associados ao desenvolvimento de AR, entre eles estão o vírus Epstein-Barr (EBV) e o citomegalovírus (CMV) (Toussiot *et al.*, 2007).

1.3 EBV

O EBV é um membro da família dos herpesvírus e estima-se que a sua incidência na população adulta esteja entre 90 a 95%, sendo o homem seu reservatório primário. Seus principais alvos são os linfócitos B e as células epiteliais nasofaríngeas, e seu ciclo é dividido em ciclo lítico e fase latente. Ao infectar o homem, o EBV pode causar a mononucleose infecciosa (MI) na sua fase lítica e infecções anteriores do EBV estão associadas ao linfoma de Burkitt, doença de Hodgkin, câncer estomacal e nasofaríngeo. Além disso, existe a hipótese de que a infecção por EBV pode levar a doenças autoimunes, entre elas a artrite reumatoide e a síndrome de Sjögren, uma vez que a carga viral permanece relativamente constante em células B circulatórias por toda a vida do hospedeiro (Miyashita *et al.*, 1995; Piecyk-Sidor *et al.*, 2005; Dittfeld *et al.*, 2016).

Existem dois sorotipos de vírus, o EBV-1 e o EBV-2, os quais se diferenciam em alguns alelos (<1%) (Hurt *et al.*, 2006). O EBV-1 é o mais comum e de distribuição mundial e o EBV-2 é mais encontrado na África equatorial, principalmente nas áreas endêmicas para malária e para o linfoma de Burkitt na Nova Guiné e em indivíduos infectados pelo HIV (Hurt *et al.*, 2006). A partícula viral infecciosa do EBV tem três componentes: (1) nucleóide, (2) capsídeo e (3) envelope. O núcleo é em forma de anel central e contém o DNA viral em formato linear e um nucleocapsídeo com 162 capsômeros. O genoma do EBV é uma molécula de DNA de fita dupla de aproximadamente 184.000 pares de bases (Gross *et al.*, 2009; Odumade *et al.*, 2011).

O EBV foi descrito como agente etiológico da mononucleose infecciosa (MI) a partir do isolamento de células oriundas de um linfoma de comportamento clínico e epidemiológico não usual, descrito por Denis Burkitt em crianças da África Central, no ano de 1964 (Epstein *et al.*, 1967). O novo vírus foi detectado à microscopia eletrônica, verificando-se grande diferença em relação aos herpes vírus humanos conhecidos, na medida em que era capaz de se replicar em células convencionais de cultura. Um jovem médico, Anthony Epstein, aventou a possibilidade de etiologia viral para o tumor. Todavia, somente em 1968 a associação entre infecção por EBV e MI foi claramente estabelecida (Henle *et al.*, 1968).

A transmissão ocorre por viral oral através do contato íntimo com a saliva de um hospedeiro infectado – a porta de entrada do vírus é a nasofaringe, ficando a MI,

por tal aspecto, conhecida como a *doença do beijo* (Rezk *et al.*, 2007; Gulley *et al.*, 2008). O vírus apresenta um pico de concentração na saliva logo após a infecção, porém costuma ser identificado nessas secreções até 18 meses após o início das manifestações clínicas da doença (Gulley *et al.*, 2008). A secreção é maior nos imunocomprometidos e nos pacientes que têm MI sintomática (Rezk *et al.*, 2007).

Após a transmissão, o EBV infecta o epitélio da orofaringe – mais precisamente o tecido linfoide do anel de Waldeyer e das glândulas salivares -, disseminando-se a partir dessas células. Ocorre, então, infecção dos linfócitos B nas criptas das tonsilas. O EBV infecta linfócitos B maduros de memória, induzindo a proliferação desses tipos celulares e, igualmente, linfócitos T e células NK. Após a infecção por EBV, tais células são capazes de se manter em latência, podendo permanecer nesse estado por toda a vida do indivíduo, na orofaringe e no sangue. Ocasionalmente, há replicação de forma assintomática. Após essa etapa, o agente etiológico se propaga pela corrente sanguínea, chegando a acometer 10% ou mais dos linfócitos circulantes (Hutt-Fletcher *et al.*, 2007).

O vírus estabelece dois tipos simultâneos de interação. Na primeira, relacionada à persistência da infecção em longo prazo e ao potencial oncogênico do vírus, há infecção lítica e immortalização dos linfócitos B. Na segunda, há infecção lisogênica dos linfócitos B, com produção de novos vírus e disseminação a outros indivíduos a partir da saliva (Hurt *et al.*, 2007), levando à persistência do DNA viral, estabelecendo-se assim um quadro de infecção latente. A infecção por EBV é predominantemente encontrada em células T CD8+ durante a síndrome hemofagocítica associada ao EBV e nos linfócitos T CD4+, ou células NK, durante a ativação da infecção crônica por EBV (Ohno *et al.*, 2003).

Em alguns enfermos, a relação *Homo sapiens sapiens*/EBV é perturbada, resultando em ativação da infecção crônica pelo agente viral (Gen *et al.*, 2009). Em geral, essa ativação é caracterizada pela permanência ou recorrência dos sintomas da MI com um padrão anormal de anticorpos anti-EBV, altos títulos de antígeno EBV-capsídeo (VCA) e baixos títulos de antígenos nuclear EBV. A forma com que essa reativação ocorre ainda não se encontra plenamente estabelecida, como quais fatores associados ao vírus e quais relacionados ao hospedeiro concorrem para tal desenvolvimento da infecção (Cohen *et al.*, 2009; Gen *et al.*, 2009).

A imunidade celular é mais importante do que a resposta humoral no controle do processo infeccioso desencadeado pelo EBV. Na fase inicial da infecção, as células T supressoras, as células NK e as células T citotóxicas inespecíficas são importantes no controle da proliferação dos linfócitos B infectados por EBV. Os níveis de marcadores de ativação de células T e de INF-gama séricos mostram-se elevados (Michelow *et al.*, 2012). Em uma fase subsequente da infecção, ocorre a produção de células T citotóxicas HLA-restritas, as quais reconhecem os antígenos nucleares do EBV (anti-EBNA) e as proteínas latentes de membrana (LMP), bem como destroem as células infectadas pelo EBV. Se a imunidade mediada por células T for comprometida, as células B infectadas por EBV poderão começar a proliferar (Michelow *et al.*, 2012).

1.4 CMV

O citomegalovírus (CMV), também conhecido como herpesvírus humano do tipo 5 (HHV-5), pertence à família *Herpesviridae*, sub-família *Betaherpesvirinae*, gênero *citomegalovírus*. Este vírus está presente em todas as regiões do mundo, com prevalência variando de acordo com as condições socioeconômicas locais (Taylor *et al.*, 2003; Crough *et al.*, 2009). Estima-se que a prevalência mundial da infecção por CMV varia entre 40%-100% nas diversas populações, sendo diretamente proporcional à idade e inversamente proporcional ao status socioeconômico da população (Taylor *et al.*, 2003).

Em 1932, foram descritos 25 casos de uma infecção congênita caracterizada por petéquias, hepatoesplenomegalia e calcificação intracerebral onde estavam presentes células grandes com um halo claro e com inclusões intranucleares (Farber *et al.*, 1932). Em 1950, Wyatt e colaboradores denominaram de “Doença de Inclusão Citomegálica Generalizada” para os casos onde as células fossem detectadas e houvesse lesão tecidual. O agente etiológico só viria a ser determinado em 1957, quando Thomas H. Weller isolou o vírus em um neonato. Weller sugeriu a denominação de Citomegalovírus, em função da alteração celular (citomegalia) induzida pela infecção viral, utilizada até hoje (Weller *et al.*, 1957).

O genoma do CMV é constituído por DNA fita dupla linear, contendo aproximadamente 240.000pb, que se organizam em 165 genes. O proteoma do CMV é complexo e inclui proteínas regulatórias, estruturais, facilitadores da evasão da resposta imune e proteínas modulares da transcrição. O vírion é dividido estruturalmente em três regiões: capsídeo, tegumento e envelope (Brit *et al.*, 2004; Crough *et al.*, 2009).

A coexistência do CMV com o hospedeiro é facilitada por estratégias desenvolvidas pelo vírus para limitar a ação do sistema imunológico, tais como: estabelecimento de um estado de latência da infecção e restrição do número de genes virais expressos a fim de minimizar a exposição ao sistema imunológico; replicação em sítios específicos, que apresentam uma vigilância imunológica menos intensa (ex. glândulas salivares, onde as células não expressam MHC-1 suficientes para mediar a eliminação do vírus através das células TCD8+ (Vasto *et al.*, 2007).

A replicação do CMV pode ocorrer subsequente a algumas situações, como a reativação do vírus latente, a infecção primária ou até a infecção recorrente por uma cepa distinta do vírus (Kano *et al.*, 2000). Uma importante característica do CMV é o estabelecimento do estado de latência viral (Sinclair *et al.*, 2006). Após a infecção primária, o CMV tem a capacidade de cancelar a replicação do seu DNA por tempo indeterminado, ficando no estado de latência até que estímulos específicos façam com que haja nova replicação viral, com produção de vírions infecciosos. O mecanismo pelo qual a replicação do CMV é reativada, após o estado de latência, ainda não é bem conhecido, embora se acredite no envolvimento do TNF-alfa. Geralmente, a reativação ocorre quando o indivíduo entra em estado de imunossupressão (Sinclair *et al.*, 2004; Pescovitz *et al.*, 2007).

Vários tipos de células podem abrigar o CMV após a infecção, como leucócitos, células precursoras mieloides, células endoteliais, fibroblastos e hepatócitos (Naucier *et al.*, 2006). A imunidade contra o CMV é multifacetada, centralizada nas células T CD8 e CD4, mas com importante participação das células NK e dos anticorpos (Khan *et al.*, 2007; Vasto *et al.*, 2007). A replicação do DNA viral ocorre entre 12-24 horas após a infecção primária. O processo de replicação dura por volta de 24h e consiste na produção de proteínas regulatórias, DNA polimerase viral e por fim proteínas estruturais e montagem dos novos vírions. O período de incubação do CMV é de 4-12

semanas e, durante este período, o vírus já pode ser detectado. A produção de resposta imune contra o vírus inicia-se através da imunidade inata, seguida pelas células T citotóxicas e a produção dos anticorpos, primeiro IgM anti-CMV e depois IgG anti-CMV (Novak *et al.*, 2008).

A infecção pelo CMV pode ser adquirida através de contaminação com diversos líquidos biológicos, tais como: saliva, sêmen, secreção vaginal, urina, leite materno, também por via transplacentária, por transfusão sanguínea ou transplante de órgãos (Martin *et al.*, 2011). A infecção por CMV causa diferentes consequências a depender das características do indivíduo infectado. Em pacientes imunocompetentes, a infecção primária, na grande maioria das vezes, é assintomática. Entretanto, em alguns casos é possível observar sintomas clínicos, a exemplo da síndrome semelhante à mononucleose, que consistente em febre aguda com acentuada linfocitose e atipia linfocitária em 10% das células. Outros sinais clínicos observados em associação com esta síndrome incluem: febre, tosse, epigastralgia, cefaleia, indisposição e, mais raramente, esplenomegalia, adenopatia, exantema inespecífico, anemia e distúrbios gastrintestinais e nervosas (Kano *et al.*, 2000; Rafailidis *et al.*, 2008).

1.5 EBV E CMV NA AR E SS

Em 1971, Evan demonstrou um aumento dos anticorpos contra EBV em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES). Esta foi a razão para suspeitar que o EBV poderia participar do desenvolvimento de doenças autoimunes (Evan *et al.*, 1971). Além disso, atualmente há evidências de que a infecção por EBV pode causar doenças autoimunes, por exemplo LES (Evan *et al.*, 1971; James *et al.*, 1997), esclerose múltipla (Fernández-Menéndez *et al.*, 2016), artrite reumatoide (Ball *et al.*, 2015), síndrome de Sjögren (Fox *et al.*, 1986; Kivity *et al.*, 2014;) e hepatite autoimune (Vento *et al.*, 1995). O EBV foi inicialmente envolvido na patogênese da AR por Alspaugh e Tan em 1978, que relataram que os soros de pacientes com AR eram reativos contra um antígeno nuclear em linfócitos transformados com EBV. Apesar do EBV não ser o único agente responsável para o desenvolvimento destas doenças, este vírus pode ser considerado um fator contributivo (Dittfeld *et al.*, 2016).

O vírus Epstein-Barr é considerado um dos possíveis fatores etiológicos das doenças autoimunes por ser um patógeno comum e permanecer no corpo durante

toda a vida do hospedeiro, o que explicaria o curso crônico das doenças autoimunes e suas constantes dos sintomas. Além disso, o vírus modifica a resposta imune do hospedeiro (Miyashita *et al.*, 1995). A possibilidade de existência de um gatilho viral para o desenvolvimento de doenças autoimunes em indivíduos geneticamente predispostos tem sido levantada há muitas décadas (Alspaugh *et al.*, 1978; Inman *et al.*, 1991; Dostal *et al.*, 1997; Bonneville *et al.*, 1998; Cooke *et al.*, 1998; Albert *et al.*, 1999; Griffiths *et al.*, 2000; Carty *et al.*, 2003; Masuko-Hongo *et al.*, 2003). Um vírus poderia agir como adjuvante no desenvolvimento da autoimunidade, especialmente em doenças como lúpus eritematoso sistêmico (LES), hepatites autoimunes, esclerose múltipla (EM), artrite reumatoide (AR) e síndrome de Sjögren (SS), atuando como estimulador de respostas imunes não específicas (Fairweather *et al.*, 2005).

Alguns mecanismos de ativação de autoimunidade são descritos por serem desencadeados pelo EBV nas doenças autoimunes, entre eles o mimetismo molecular, onde o vírus pode incorporar um epítipo que é estruturalmente similar a um auto-antígeno, o que pode causar confusão no sistema imune e como consequência induzir uma resposta autoimune. Outro mecanismo é a ativação policlonal, quando uma infecção de células B resulta na proliferação destas, aumento da produção de anticorpos e geração de complexos imunes circulantes que podem causar danos teciduais (Barzilai *et al.*, 2007). Outros vírus também podem estar envolvidos na patogênese de doenças autoimunes, incluindo o HTLV-1, herpesvírus humano e o citomegalovírus (CMV) (Inman *et al.*, 1991; Dostal *et al.*, 1997; Cooke *et al.*, 1998; Griffiths *et al.*, 2000; Carty *et al.*, 2003;). No entanto, as evidências relacionando estes vírus à patogênese de doenças autoimunes são inconclusivas, uma vez que os estudos descritos até o momento são *in vitro*, estudos com animais, relato de casos, estudos com amostras limitadas ou sem grupos controles (Dittfeld *et al.*, 2016).

Alguns mecanismos da autoimunidade têm sido propostos para estarem envolvidos na patogênese da AR. São incluídos os altos níveis de anticorpos anti-EBV, presença do genoma viral na membrana sinovial e reação cruzada entre o EBV e as auto-proteínas humanas (mimetismo molecular) (Toussiot *et al.*, 2007). Para a síndrome de Sjögren, são considerados a presença do EBV/DNA na saliva e tecido salivar e um alto nível de anticorpos anti-EBV (Fox *et al.*, 1992). Chiu *et al.* (2013) mostraram que as amostras de fluido sinovial de pacientes com inflamação não

resolvida da artrite reumatoide apresentaram expressão positiva do EBV (EBER1). Os autores sugeriram que a inflamação causada pela artrite reumatoide é fortemente relacionada à presença de EBV e que o vírus pode ser responsável pela produção da interleucina 6 pelo fibroblasto sinovial (Chiu *et al.*, 2013). Outro estudo demonstrou que pacientes com artrite reumatoide tem cargas virais mais altas nos linfócitos do sangue periférico que os controles saudáveis. Os autores relataram que o anticorpo anti-EBV pode ser considerado um dos autoanticorpos relevantes para o desenvolvimento da artrite reumatoide (Balandraud *et al.*, 2003). Outro estudo sugere que partículas virais do EBV podem agir como potentes superantígenos desencadeadores da inflamação presente na AR (Mahabadi *et al.*, 2016).

Para a SS, estudo anterior reportou que os vírus podem originar resposta inflamatória nas glândulas salivares, pois em modelos experimentais com animais com síndrome de Sjögren, foram verificadas ativações dos genes de interferon do tipo I e II, originados potencialmente de infecção viral, o que pode conduzir ao acúmulo das células inflamatórias no parênquima das glândulas salivares (Delaleu *et al.*, 2008). Pacientes com SS apresentam títulos elevados de uma variedade de antígenos do vírus Epstein-Barr (EBV), incluindo BHRF1 (o homólogo viral de Bcl-2) e BMRF1 (proteína EBV DNA-binding) (Mignogna *et al.*, 2005). Um argumento principal para a associação entre a SS e EBV é a presença de DNA do vírus na saliva e/ou biópsias das glândulas salivares, apresentando com mais frequência em pacientes com SS do que em controles saudáveis. No entanto, há resultados contraditórios na literatura, os quais podem ser explicadas pela heterogeneidade da população de doentes e também por razões técnicas (Fox *et al.*, 1998).

Entre os possíveis mecanismos desenvolvidos pelo EBV na SS estão o mimetismo molecular, ativação de linfócito policlonal e aumento da imunogenicidade de órgãos com autoantígenos secundários. Alguns autores relatam que o mimetismo molecular é o mecanismo viral mais importante para induzir autoimunidade pelo EBV na SS (Bach *et al.*, 2005; Coppieters *et al.*, 2012). O vírus afeta o tecido exócrino primariamente através de células dendríticas plasmocitoides. Após, as células dendríticas são estimuladas, o que resulta na ativação do sistema imune inato e produção de interferon tipo 1 (IFN-1) pelas células epiteliais (Takeda *et al.*, 2003). A indução do IFN-1 ativa uma variedade de funções, entre elas um fator protetor contra infecções virais e bacterianas, imunomodulação e antiproliferação. Pacientes com SS

apresentam uma alta expressão de IFN-1 nas glândulas salivares labiais, no plasma e nas células do sangue periférico (Zheng *et al.*, 2009; Yao *et al.*, 2012).

Estudos sugerem que o CMV parece ter um papel semelhante ao do EBV no desenvolvimento de doenças autoimunes, entre elas a AR e SS (Álvarez-Lafuente, *et al.*, 2005; Vanheusden *et al.*, 2015). O citomegalovírus (CMV) é um membro da família dos β -herpesvírus que, assim como o EBV, é encontrado em mais de 70% da população mundial e estabelece uma infecção latente por toda a vida do hospedeiro. O CMV compromete uma grande porção do seu genoma para escapar do reconhecimento e ativação do sistema imune (Hanley *et al.*, 2014; Vanheusden *et al.*, 2015). Além disso, devido à persistência do CMV, células T de memória CMV-específicas podem se acumular e, assim, a vigilância imune pode se tornar menos eficaz ao longo do tempo, comprometendo a imunidade normal (La Rosa *et al.*, 2012; Hanley *et al.*, 2014). Após o estabelecimento da infecção primária pelo CMV, partículas virais são processadas pelas células apresentadoras de antígenos, que estimulam a resposta imune adaptativa. O desenvolvimento desta resposta é necessário para controlar a infecção primária pelo CMV, e após isso o CMV inicia o seu estado latente (Zheng *et al.*, 2009).

Em uma coorte com 82 pacientes com SS, Barzilai e colaboradores (2007) encontraram títulos elevados de anticorpos IgM-CMV. Os autores concluíram que esses resultados foram encontrados em pacientes com outras doenças autoimunes e, portanto, a resposta imune para o CMV parece estar relacionada à doenças autoimunes, não estando claras as conexões com a SS (Barzilai *et al.*, 2007).

1.6 BIÓPSIA DE GLÂNDULA SALIVAR MENOR

Na mucosa que recobre todas as regiões da cavidade oral ou na submucosa, com exceção da gengiva e porção anterior do palato duro, existem numerosas e pequenas glândulas salivares. A maioria delas apresenta suas unidades secretoras terminais entremeadas no tecido conjuntivo das mucosas de revestimento da boca, principalmente na submucosa ou entre as fibras musculares da língua, conforme sua localização. A maioria das glândulas salivares menores é constituída por ácinos com células mucosas e serosas, tendo por isso uma função glandular do tipo mista. Das glândulas salivares menores saem curtos ductos que se abrem na cavidade oral.

Essas glândulas recebem sua denominação segundo a região onde se apresentam: glândulas labiais, bucais, palatinas, glossopalatinas e linguais (Dalavanga *et al.*, 1986).

A principal característica patológica da SS é o infiltrado linfocítico focal, que consistem em agregados de linfócitos, começando ao redor dos ductos e espalhando-se, envolvendo o lóbulo inteiro das glândulas salivares. Há uma destruição das células epiteliais pelo infiltrado linfocitário, levando a uma substituição do tecido glandular por células mononucleares. Embora alguns lóbulos sejam completamente destruídos, a arquitetura pode estar preservada, com outros lóbulos intactos e aparentemente normais. Além do infiltrado linfoplasmocitário, outras características histopatológicas podem ser encontradas nos cortes histológicos de glândulas salivares menores dos pacientes com SS, como ectasia e proliferação ductal, substituição dos ácinos por fibrose, proliferação vascular e progressiva substituição do parênquima por tecido adiposo. Células como histiócitos, mastócitos e monócitos também podem estar presentes nas glândulas de alguns pacientes (Dalavanga *et al.*, 1986).

Segundo Greenspan *et al* (1976), a biópsia de glândula salivar menor labial deve ser realizada da seguinte forma: sob anestesia local, realiza-se uma pequena incisão de 1,5 a 2,0 cm na mucosa labial inferior lateralmente 1 cm à linha média, de onde são retiradas de 4 a 7 glândulas salivares menores para avaliação histopatológica. Após a remoção do espécime cirúrgico, o mesmo deve ser fixado em solução a 4% de formol neutro tamponado e encaminhado para processamento. Após a obtenção dos blocos parafinados, cortes de cinco micrômetros são realizados para montagem da lâmina e coloração em H&E, os quais são avaliados posteriormente por um patologista oral.

A análise histopatológica das glândulas salivares menores submucosas do lábio inferior é uma importante ferramenta de diagnóstico da SS, uma vez que está incluída nos critérios do Consenso Americano e Europeu para o diagnóstico de síndrome de Sjögren (Quadro 1, Vitali *et al.*, 2002). Este item é considerado positivo quando houver presente um ou mais focos contendo 50 ou mais células mononucleares em uma área de 4mm² (focus score ≥ 1) (Greenspan *et al.*, 1976; Waterhouse *et al.*, 1986). A maioria dos linfócitos do infiltrado linfoplasmocitário é representado por células T, mas 10% a 20% dos linfócitos infiltrantes são células B. As células B são encontradas na maioria das vezes nas margens dos focos de

infiltrados, mas também estão presentes como pequenos conglomerados ao longo de todo o parênquima (Lane *et al.*, 1983; Speight *et al.*, 1990).

Skopouli *et al* (1991) mostraram que a proporção entre linfócitos T e B nos infiltrados das glândulas salivares labiais em pacientes com SS era de 2,5 para 1. As células B estavam geralmente distribuídas ao redor dos ductos e as células T ao redor das células B. Foi também demonstrado que as células de memória predominam na lesão, o que talvez explique a intensa ativação de células B observada nos infiltrados focais. A maioria dos linfócitos do infiltrado é representada por células T CD4+, que constituem 60% a 70% dos linfócitos infiltrantes, enquanto que as células T CD8+ representam apenas 10% a 20% da população linfocitária (Skopouli *et al.*, 1991).

Não se sabe por que as glândulas salivares e lacrimais são os órgãos alvos na SS e qual o fator desencadeante desse processo inflamatório; entretanto, os estudos realizados até o momento têm indicado que as células epiteliais estão implicadas na patogênese da SS e deixam clara a participação das glândulas salivares no recrutamento e no progresso da doença.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a associação entre a presença do EBV e CMV no sangue periférico e em glândulas salivares e a AR e SS.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a presença de EBV/DNA e CMV/DNA em pacientes portadores de artrite reumatoide, comparando-a com indivíduos saudáveis;
- Associar a presença de EBV/DNA e CMV/DNA com os marcadores clínicos e laboratoriais de AR e SS;
- Avaliar a associação entre a presença do EBV e CMV nas glândulas salivares e sua relação com os marcadores clínicos de AR e SS.

3 METODOLOGIA

Foi realizado um estudo do tipo caso-controle composto por 256 pacientes de ambos os sexos com idade maior que 18 anos e distribuídos em 3 grupos: grupo AR – Artrite Reumatoide (n=108), grupo AR/SS – Síndrome de Sjögren secundária à Artrite Reumatoide (n=20) e grupo C – controles saudáveis (n=128). Todos os pacientes dos grupos AR e SS foram provenientes do Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE) e a amostra obtida foi por conveniência. O grupo controle foi proveniente do serviço de Estomatologia – UFPE e composto por indivíduos saudáveis sem evidência ou histórico de doença autoimune nem relato de xerostomia ou xeroftalmia. Todos os envolvidos na pesquisa consentiram previamente a sua inclusão no estudo por meio de assinatura do TCLE, após aprovação do mesmo no CEP-UFPE sob CCAE 46113215.3.0000.5208.

O diagnóstico de artrite reumatoide foi baseado no critério determinado pelo Colégio Americano de Reumatologia (Arnet *et al.*, 1988) e o diagnóstico da síndrome de Sjögren secundária foi estabelecido através do critério do Consenso Americano e Europeu (Vitali *et al.*, 2002).

3.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

3.1.1 Grupo AR (n=108)

- Pacientes de ambos os gêneros com idade acima de 18 anos, portadores de artrite reumatoide de acordo com os critérios de classificação do Colégio Americano de Reumatologia (Arnett *et al.*, 1988);
- Consentir a sua participação na pesquisa através da assinatura do TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido).

3.1.2 Grupo AR/SS (n=20)

- Pacientes de ambos os gêneros, com idade acima de 18 anos, portadores de AR e com diagnóstico de SSs, de acordo com os critérios de classificação do Consenso Americano e Europeu (Vitali *et al.*, 2002);
- Consentir sua participação na pesquisa por meio da assinatura do TCLE.

3.1.3 Grupo Controle (n=128)

- Pacientes acima de 18 anos de ambos os gêneros;
- Consentir a sua participação na pesquisa através da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

3.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

3.2.1 Grupos AR e AR/SS

- Pacientes submetidos a radioterapia prévia em região de cabeça e pescoço;
- Soropositivos para o vírus HCV;
- Soropositivos para o vírus HIV;
- Portadores de Linfoma;
- Portadores de sarcoidose;
- Portadores de doença do enxerto contra o hospedeiro;
- Pacientes em uso recente de medicamentos com propriedades anticolinérgicas.

3.2.2 Grupo Controle

- Apresentar sinais de AR, além de não ser portador de qualquer outra desordem imunologicamente mediada ou autoimune;
- Soropositivos para o vírus HIV;
- Portadores de diabetes;
- Pacientes com queixa de xerostomia e xeroftalmia.

3.3 AVALIAÇÃO DOS PACIENTES

O questionário da pesquisa foi realizado para obtenção de dados sócio-demográficos e relativos à história clínica da doença. Neste questionário, os pacientes responderam às perguntas para avaliação de xerostomia e xeroftalmia.

Para avaliação da xerostomia, o paciente respondeu positivamente a uma das seguintes perguntas que compõem o critério do Consenso Americano e Europeu (Vitali *et al.*, 2002): *Você tem sensação de boca seca diariamente há mais de três meses? Você teve aumento recorrente ou persistente de glândulas salivares na fase adulta? Você sente necessidade de ingerir líquidos para auxiliar a deglutição de alimentos secos?*

Do mesmo modo, para avaliação da xeroftalmia, o paciente respondeu positivamente a uma das três perguntas seguintes: *Você tem olhos secos de modo diário e persistente nos últimos 3 meses? Você tem sensação recorrente de areia nos olhos? Você utiliza substitutos lacrimais mais de 3 vezes por dia?*

3.4 AVALIAÇÃO DO FLUXO SALIVAR EM REPOUSO

Após preenchimento dos dados, seguiu-se a coleta de saliva para avaliação do fluxo salivar em repouso (FSR) através da obtenção da saliva total não-estimulada. A coleta ocorreu da seguinte forma segundo método desenvolvido por Navazesh, Christensen e Brightman (1992): o exame foi realizado no período da tarde, entre 14:00 e 17:00h, e o paciente foi orientado a não ingerir alimentos, beber ou fumar por um período mínimo de 90 minutos antes da coleta. Após estarem sentados confortavelmente, os pacientes foram orientados a levar a cabeça levemente para frente, deglutir e então deixar a saliva escorrer da boca em um recipiente plástico milimetrado durante o período de 15 minutos. A taxa de FSR é determinada pelo valor total dividido por 15, sendo expressa em mililitros por minuto. Valores abaixo de 1,5mL (ou 0,1mL/min) foram considerados positivos.

3.5 TESTE DE SCHIRMER

Após a obtenção do fluxo salivar em repouso, o paciente foi submetido ao Teste de Schirmer I, sem uso de anestésico tópico, para avaliação do lacrimejamento basal e reflexo. Os pacientes foram orientados a não utilizar substitutos lacrimais por um período de pelo menos 60 minutos antes do teste. O teste consistiu na colocação de uma tira de papel filtro Whatman no. 41 de 5 mm de largura por 35 mm de comprimento (Teste de Schirmer, Ophthalmos®, São Paulo, Brasil) na junção do 1/3 médio e lateral das pálpebras inferiores. Após 5 minutos, as tiras de papel filtro são retiradas. A

quantificação da produção lacrimal é feita pela medida da extensão do papel filtro que ficou úmida (Bijsterveld, 1969). Valores menores do que 5 mm após 5 min em um dos olhos foram considerados positivos.

3.6 BIÓPSIA DE GLÂNDULA SALIVAR MENOR

Para os pacientes que relataram xerostomia e/ou xeroftalmia com fluxo salivar menor que 0,1 ml/min ou teste de Schirmer menor que 5mm/5min, foi realizada biópsia de glândulas salivares menores, sob anestesia local. Este procedimento consistiu de uma pequena incisão de 1,5 a 2,0 cm na mucosa labial inferior lateralmente 1 cm à linha média, onde foram retiradas de 4 a 7 glândulas salivares menores para avaliação histopatológica. Após a remoção do espécime cirúrgico, o mesmo foi fixado em solução a 4% de formol neutro tamponado e encaminhado para processamento. Após a obtenção dos blocos parafinados, cortes de cinco micrômetros foram realizados para montagem da lâmina e coloração em H&E, os quais foram avaliados posteriormente por um patologista oral do Laboratório de Patologia Oral - UFPE. Os casos foram considerados positivos quando observados um ou mais focos de 50 ou mais linfócitos em 4mm² (Greenspan *et al.*, 1976).

Na análise histopatológica, foram considerados os seguintes critérios estabelecidos por Pereira *et al* (2014): número de lóbulos de glândula salivar, porcentagem de tecido adiposo nas glândulas salivares (menos de 10%, entre 10 e 50% ou maior que 50%), presença ou ausência de dilatação e atrofia ductal, presença ou ausência de esclerose, presença, número e distribuição de focos linfocitários (1 foco foi composto por pelo menos 50 linfócitos agrupados, podendo apresentar distribuição periductal, difusa e sem padrão), relação ácino/ducto normal ou diminuída.

3.7 ATIVIDADE DE AR

Para avaliação da atividade de AR foi utilizado o Disease Activity Score 28 (DAS28), que utiliza o número de articulações dolorosas e edemaciadas, avaliação da atividade da doença realizada pelo reumatologista e pelo paciente, além da velocidade de hemossedimentação. A atividade da doença foi classificada de acordo com Fransen *et al.*, 2004.

3.8 PROCESSAMENTO DO SANGUE E ISOLAMENTO DO DNA

As amostras de sangue dos pacientes foram coletadas por um pesquisador treinado em flebotomia para realização do teste de velocidade de hemossedimentação (VSH) – 1^a hora. Foi utilizado o método de Westergren, recomendado pelo International Committee for Standardization in Hematology (Bedell *et al.*, 1985). Esta técnica consiste da colocação de sangue venoso anticoagulado com citrato de sódio a 3,8% (relação 4:1) em um tubo graduado, com 200mm de comprimento e 2,5mm de diâmetro interno. O tubo é preenchido até a marca zero e deixado na posição vertical por uma hora. A VHS, expressa em mm/h, é a distância do menisco até o topo da coluna de eritrócitos (Bedell *et al.*, 1985).

O DNA foi extraído a partir de sangue total usando o kit de extração Wizard Genomic DNA Purification (Promega Bio Sciences, LLC. San Luis Obispo, CA, USA) de acordo com as recomendações do fabricante, feito a partir de 300µl do sangue total, sendo o produto final quantificado no NanoDrop-2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA).

3.9 CLONAGEM DO VÍRUS EBV

A sequência gênica correspondente ao genoma do vírus Epstein-Barr (EBV) de 177.320pb (*Human herpesvirus 4 DNA, complete genome, strain: YCCEL1*) disponível no *GeneBank: AP015016.1* (www.ncbi.nlm.nih.gov), foi utilizada como molde para o desenho de dois novos oligonucleotídeos específicos que flanqueiam uma região de 404pb que contempla um trecho de anelamento de primers e probe *TaqMan* desenhados previamente e expostos na Tabela 1 e Figura 1. A reação de PCR foi conduzida em um volume final de 25 µl contendo 0,4 mM de cada dNTP, 1,6 µM de cada primer (Associação P1F EBV clonagem / P1R EBV clonagem), 2,5 U de Platinum Taq DNA Polimerase® (Invitrogen), tampão contendo 20 mM Tris-HCl pH 8.4 / 50 mM de KCl, 2 mM de MgCl₂ e 100 ng do DNA molde extraído de soro de banco de sangue HCC-UPE positivo para EBV. A reação foi realizada em um termociclador BIOMETRA® programado para uma etapa de desnaturação a 94 °C por 3 min, seguido de 35 ciclos a 94 °C por 50 seg, 52 °C por 50 seg e 72 °C por 120 seg, e uma etapa final de 72 °C por 10 min. O produto amplificado foi analisado por eletroforese

em gel de agarose 1% em tampão TBE 0,05X (Tris 8.9 mM; ácido bórico 8.9 mM; EDTA 2 mM), corado com brometo de etídeo e visualizado em um transiluminador de luz ultravioleta. O fragmento gênico de 404pb amplificado foi excisado de gel de agarose a 1% e purificado com o kit GFX DNA and Gel Band Purification® (GE Healthcare), antes da etapa de clonagem.

Tabela 1 - Oligonucleotídeos específicos desenhados a partir do genoma do Herpes vírus humano 4 linhagem YCCEL1.

Oligonucleotídeo	Sequência (5' – 3')
PF EBVTaqMan	5'- CCCAACACTCCACCACACC -3'
PR EBVTaqMan	5'- TCTTAGGAGCTGTCCGAGGG -3'
Sonda EBV TaqMan	5'- ACACTACACACACCCACC -3'
P1F EBVclonagem	5'- CAAATGTAAGAGGGGGTCTTC-3'
P1R EBVclonagem	5'- CTCCTCTTCTTGCTGGACG-3'

P- Primer, F- Forward, R- Reverse

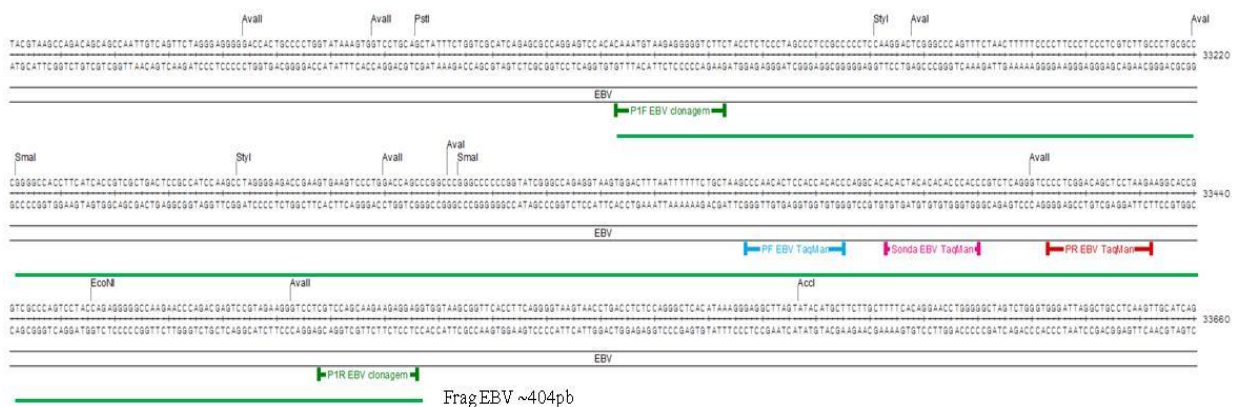


Figura 1 - Localização espacial dos primers e sonda utilizada nas reações de PCR contra a sequência gênica do Herpes vírus humano 4 linhagem YCCEL1 disponível no *GeneBank*: AP015016.1. Barra verde indica o fragmento de 404pb amplificado por PCR.

3.10 CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DO FRAGMENTO GÊNICO DO VÍRUS EBV EM PGEMTEASY

O produto de PCR do gene do EBV excisado e purificado foi submetido a uma etapa de tratamento *A-tailed*, cuja reação foi realizada em um volume final de 10ul

contendo 5U de Platinum Taq DNA Polimerase® (Invitrogen), tampão contendo 20 mM Tris-HCl pH 8.4/ 50 mM de KCl, 2 mM de MgCl₂ e 0,2mM do desoxinucleotídeo dATP e foi incubada a 70°C em termobloco programado para 30min. O vetor plasmidial de clonagem utilizado foi o pGEM-T Easy® (Promega). A combinação vetor plasmidial/fragmento de PCR foi calculada seguindo as instruções do fabricante e esta foi tratada com T4 DNA ligase® (Promega) a 3U/ul. Após a etapa de ligação, a construção plasmidial foi utilizada na transformação de bactérias quimiocompetentes (*Escherichia coli* cepa Top10). As colônias foram selecionadas em placas de cultura com ampicilina/IPTG/X-Gal seguindo as instruções do manual técnico do Kit pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems e estas foram inoculadas em 5ml de meio de cultivo Luria-Bertani por 16h a 37°C para a realização de extrações de DNA plasmidial. As mini-preparações plasmidiais foram realizadas através do Kit QIAprep®Spin Miniprep - Plasmid DNA Purification (Qiagen). As preparações de DNA plasmidial foram sequenciadas em sequenciador automático ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) no Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do CPqAM, com o intuito de avaliar a identidade e integridade das sequências clonadas. As construções plasmidiais obtidas neste trabalho foram utilizadas como padrão positivo para qRT-PCR no diagnóstico de EBV.

3.11 AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS POR PCR, CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO

A associação de primers utilizada (P1F EBV clonagem / P1R EBV clonagem) permitiu a amplificação de um fragmento gênico de 404pb do vírus EBV. Após etapa de purificação e clonagem, três clones da construção plasmidial foram selecionados para sequenciamento. Os eletroferogramas das reações de sequenciamento que foram analisados através de softwares do DNASTAR contra a sequência genômica do Epstein-Barr (*Human herpes vírus 4 strain YCCEL1 complete genome, AP015016.1*) disponível no GeneBank confirmaram a identidade e integridade do DNA clonado.

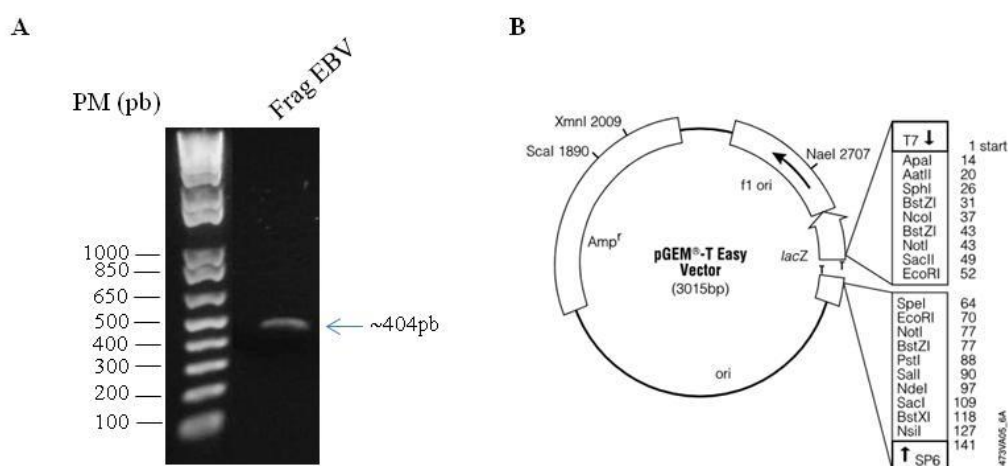


Figura 2 - A. Fragmento gênico amplificado por PCR a partir do genoma do vírus Epstein-Barr, separado por eletroforese em gel de agarose a 1% e purificado através de kit *GFX DNA and Gel Band Purification®* (GE Healthcare). O fragmento gênico possui ≈ 404 pb (associação de primers P1F EBVclonagem/ P1R EBVclonagem) pares de bases (pb) respectivamente. **B.** Mapa do vetor pGEM®-T Easy utilizado para a clonagem. **PM.** Peso molecular em pb.

3.12 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE – PCR PARA DETECÇÃO VIRAL E QUANTIFICAÇÃO DAS CÓPIAS VIRAIS

As reações da PCR em tempo real (Reação em cadeia da polimerase) para detecção de CMV e EBV foram preparadas utilizando o conjunto de reagentes TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA). Para detecção do vírus EBV, foi utilizado o seguinte protocolo de reação: 6 μ L de água, 0,45 μ L de primer, 0,625 μ L de sonda, 12,5 μ L de Master Mix e 5 μ L de DNA, sendo 25 μ L o volume final. Utilizou-se como protocolo de ciclagem um total de 40 ciclos: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, e ciclagem de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C. Para detecção do vírus CMV, foi utilizado o seguinte protocolo de reação: 6 μ L de água, 0,45 μ L de primer, 0,625 μ L de sonda, 12,5 μ L de Master Mix e 5 μ L de DNA, sendo 25 μ L o volume final. Utilizou-se como protocolo de ciclagem um total de 40 ciclos: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, e ciclagem de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 58°C. Todas as reações foram realizadas no termociclador Rotor gene Q (Qiagen, Alemanha).

Para obtenção da carga viral do EBV, foi necessário estabelecer uma curva padrão, onde foram utilizados 5 pontos em diluição seriada de DNA plasmidial partindo de 10^8 ng/ul (10^8 , 10^6 , 10^4 , 10^2 e 1). O cálculo para a obtenção da carga viral de CMV foi realizado através de três amostras incluídas na reação com cargas virais conhecidas (625, 17.500 e 212.500 cópias/ μ L). Os valores de carga viral obtidos são expressos em cópias/ μ L.

3.13 DETECÇÃO TECIDUAL DE EBV E CMV

Para o diagnóstico da presença do EBV nos tecidos parafinados foram avaliados os transcritos EBER1 e EBER2 (Epstein-Barr virus Probe ISH Kit, Novocastra Laboratories, Reino Unido) por meio de hibridização *in situ* com sondas de RNA, de acordo com o protocolo descrito por Chang *et al.*, 1992. A detecção do CMV nos tecidos parafinados foi realizada por imunohistoquímica (Novocastra CMV Probe, Novocastra Laboratories, Reino Unido), de acordo com as instruções do fabricante.

4 RESULTADOS

4.1 PACIENTES

Foram incluídos no estudo 256 pacientes, sendo 29 homens e 227 mulheres, com idades variando de 22 a 81 anos e média de 52,47 anos. Os grupos foram compostos por: grupo AR – 108 pacientes, sendo 99 mulheres (91,6%), grupo AR/SS – 20 pacientes, todas mulheres (100%), prevalência de 15,6% para a SSs, e grupo C – 128 pacientes, sendo 108 mulheres (84,3%) ($p=0,053$). A idade do grupo AR teve média de 52 anos (DP= 10,12), variando de 22 a 80 anos; o grupo AR/SS apresentou média de 53,65 anos (DP= 11,14), variando de 37 a 73 anos, e o grupo C uma idade média de 52,68 anos (DP= 12,02) variando de 24 a 81 anos ($p=0,827$, Tabela 2).

Tabela 2 - Avaliação da associação entre gênero, idade, os marcadores clínicos de AR e SS e os grupos AR e AR/SS.

Características clínicas	Grupo		Valor de p
	AR	AR/SS	
	Média ± DP (Mediana)	Média ± DP (Mediana)	
Gênero (feminino/masculino)	99/9	20/0	$p^{(1)} = 0,053$
Idade (anos)	52 ± 10,12 (54,50)	53,65 ± 11,14 (53,00)	$p^{(1)} = 0,869$
VHS	35,51 ± 25,36 (30,00)	37,65 ± 23,47 (32,00)	$p^{(1)} = 0,559$
Articulações dolorosas	7,27 ± 9,04 (4,00)	6,45 ± 8,50 (3,00)	$p^{(1)} = 0,784$
Articulações edemaciadas	2,13 ± 4,00 (2,00)	3,95 ± 4,29 (3,00)	$p^{(1)} = 0,582$
DAS 28	4,40 ± 1,57 (4,44)	4,66 ± 1,48 (4,75)	$p^{(1)} = 0,443$
Teste de Schirmer (mm/5 min)	9,4 ± 9,29 (6,50)	2,2 ± 1,82 (1,00)	$p^{(1)} < 0,001^*$
Fluxo salivar em repouso (ml/min)	0,459 ± 0,324 (0,40)	0,068 ± 0,09 (0,05)	$p^{(1)} < 0,001^*$

(1): Teste de Mann-Whitney; DP: Desvio padrão; * Estatisticamente significativo.

4.2 MARCADORES CLÍNICOS DE AR

Os marcadores de atividade de AR (VHS, número de articulações edemaciadas e doloridas e DAS28) não mostraram diferença entre os grupos AR e AR/SS (Tabela 2). A média de articulações edemaciadas, VHS e DAS28 mostraram-se discretamente

maiores no grupo AR/SS (3,95, 37,65 e 4,66, respectivamente) que no grupo AR (2,13, 35,51 e 4,40, respectivamente) ($p=0,688$) (Tabela 2).

4.3 MARCADORES CLÍNICOS DE SS

Quando os critérios classificatórios foram avaliados, o grupo AR/SS agrupou maior parte dos pacientes com queixa de xerostomia e xeroftalmia ($n=19$, 95%; $n=16$, 80%, $p<0,001$ e $p<0,007$, respectivamente), teste de Schirmer positivo ($n=20$, 100%, $p<0,001$), fluxo salivar em repouso reduzido ($n=17$, 85%, média 0,068ml/min, $p<0,001$) e biópsia com infiltrado inflamatório glandular compatível com SS ($n=12$, 60%, $p<0,001$). Os pacientes do grupo AR apresentaram xerostomia e xeroftalmia em frequência semelhante aos controles saudáveis. Do mesmo modo, as taxas de fluxo salivar em repouso e teste de Schirmer não diferiram entre estes grupos (Tabela 2).

4.4 DETECÇÃO DE EBV/DNA E CMV/DNA NO SANGUE E CÓPIAS VIRAIS

Com relação à detecção de EBV/DNA no sangue dos pacientes, foi observada uma maior prevalência deste vírus no sangue dos pacientes com AR exclusiva (grupo AR) e pacientes com AR e SS (grupo AR/SS) (41 pacientes, 32%) que no grupo controle (12 pacientes, 9,3%) ($p<0,0001$, OR=4,56, IC95%=2,26-9,18). Pacientes portadores de AR/SS apresentaram uma maior frequência de EBV/DNA no sangue (10 casos, 50%) quando comparados ao grupo AR (31 casos, 28,7%), mas esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,061$) (Tabela 3).

Tabela 3 - Presença do vírus EBV/DNA no sangue de acordo com os grupos.

EBV	Grupos						Valor de p1	Valor de p2
	AR		AR/SS		C			
	N	%	N	%	N	%		
Positivo	31	28,7	10	50	12	9,3	p ⁽¹⁾ = 0,061	p ⁽²⁾ <0,0001*
Negativo	77	71,3	10	50	116	90,7		OR=4,56
								IC95% = 2,26-9,18
Total	108	100,0	20	100,0	228	100,0		

(1): Teste qui-quadrado; valor de p1= AR X AR/SS; valor de p2= AR+AR/SS X C. * Estatisticamente significativo.

Com relação à detecção de CMV/DNA, observou-se positividade em apenas um paciente do grupo AR (1 paciente, 0,92%) e um paciente do grupo C (1 paciente, 0,78%).

A média do número de cópias de EBV/DNA foi mais elevada entre indivíduos portadores de AR (149,42 cópias/ μ L, mediana 20,0 e DP 425,3) e grupo AR/SS (99,24 cópias/ μ L, mediana 20,0, DP 25,6) que nos indivíduos do grupo controle (61,51 cópias/ μ L, mediana 39,7, DP 71,1, $p=0,232$). Igualmente não se observou diferença entre a carga viral dos grupos AR e AR/SS ($p=0,936$). Para o CMV/DNA, o indivíduo do grupo AR apresentou 23.027 cópias/ μ L enquanto o indivíduos do grupo controle apresentou 12.273 cópias/ μ L.

A associação entre a presença do EBV/DNA e parâmetros clínicos da AR e SS foi testada, porém não houve associação com as variáveis clínicas ($p>0,05$) (tabela 4).

Tabela 4 - Associação entre os marcadores clínicos de SS e AR e a presença do EBV/DNA no sangue.

Variável	Grupos				Valor de p
	EBV +		EBV-		
	N	%	N	%	
• FSR					
Positivo	9	21,9	14	16,6	p ⁽¹⁾ = 0,421
Negativo	32	78,1	73	83,4	
• Teste Schirmer					
Positivo	20	48,7	33	37,9	p ⁽²⁾ = 0,215
Negativo	21	51,3	54	62,1	
• DAS28					
<2,6	5	12,1	12	13,7	p ⁽²⁾ = 0,804
≥ 2,6	36	87,9	75	86,3	
• Xerostomia					
Positivo	23	56,1	37	42,5	p ⁽²⁾ = 0,151
Negativo	18	43,9	50	57,5	
• Xeroftalmia					

Positivo	21	51,3	36	41,3	$p^{(1)} = 0,296$
Negativo	20	48,7	51	58,7	
• Biópsia					
Positivo	5	38,4	3	18,7	$p^{(2)} = 0,238$
Negativo	8	61,6	13	81,3	
• Articulações dolorosas					
Positivo	9	21,9	21	24,1	$p^{(1)} = 0,306$
Negativo	32	78,1	66	75,9	
• Articulações edemaciadas					
Positivo	15	36,5	42	48,2	$p^{(1)} = 0,214$
Negativo	26	63,5	45	51,8	
Total	41		87		

(1): Teste qui-quadrado. (2) Teste Exato de Fischer.

Quando foi avaliada a correlação entre os marcadores clínicos dos grupos caso e controle e a presença do EBV/DNA foi encontrada associação estatisticamente significativa na variável teste de Schirmer ($p=0,03$, $OR=1,95$, $IC95\%=1,05-3,64$) (dados não mostrados).

Foi testada a correlação entre a presença do EBV/DNA e os parâmetros clínicos da AR e SS, porém não foi estatisticamente significativa ($p>0,05$) (dados não mostrados).

4.5 DETECÇÃO DE EBV E CMV NAS GLÂNDULAS SALIVARES

Foram avaliadas glândulas de 55 pacientes através de hibridização *in situ* para EBV e imunohistoquímica para CMV. Não houve detecção de nenhum dos dois vírus.

5 DISCUSSÃO

A presença dos vírus EBV e CMV tem sido sugerida como um possível fator associado ao desenvolvimento da AR, porém sua associação com a presença de SS em pacientes com AR ainda não foi estudada. Diante disto, o presente estudo avaliou a correlação entre a presença dos vírus EBV e CMV e suas cargas virais no sangue de pacientes com AR e SSs e os marcadores clínicos destas duas doenças. O vírus EBV foi observado com maior frequência em pacientes com a AR e SS do que nos controles saudáveis. Contudo, a presença deste vírus não foi associada com marcadores clínicos. CMV/DNA foi raramente observado nestes grupos.

A amostra avaliada neste estudo caracteriza bem a apresentação clínica de AR e SS. Sabe-se que a SS apresenta uma forte predileção pelo gênero feminino (Delaleu *et al.*, 2008; Hamza *et al.*, 2012; Ice *et al.*, 2012; Tzioufas *et al.*, 2012, Luchesi *et al.*, 2014), semelhante ao observado neste estudo. As pacientes com SS apresentaram média de idade ligeiramente mais elevada, sem significância estatística (Luchesi *et al.*, 2014). A SS foi diagnosticada em 15,6% dos pacientes (20/128) com AR, semelhante a resultados prévios realizados na mesma população por Carvalho *et al.* (2015), com prevalência de 23,6% (31/131) e Lins e Silva *et al.* (2016), com 23,5% (45/191). Dependendo do critério utilizado e a região geográfica, esta prevalência pode variar consideravelmente. Em estudo comparativo entre gregos e ingleses, a SSs em pacientes com AR foi encontrada em 43% e 17%, respectivamente, demonstrando a variação geográfica (Drosos *et al.*, 1992). Outro aspecto importante que pode contribuir para esta variação de prevalência é o fato de que os pacientes do presente estudo estavam sob terapia imunossupressora. Sabe-se que imunossupressores reduzem a atividade da doença e suas manifestações extra-articulares em AR, e podendo influenciar o desenvolvimento da SS (Haga *et al.*, 2012).

Com relação aos sintomas *sicca* neste estudo foi observado que pacientes com AR/SS apresentaram xerostomia e xeroftalmia mais frequentemente do que os pacientes do grupo AR e do grupo controle. Conforme previamente relatado por nosso grupo (de Souza *et al.*, 2014), a atividade de AR não se mostrou diferente nos pacientes do grupo AR/SS, sugerindo-se que a síndrome é uma doença distinta e associada a AR. No presente estudo não foi possível demonstrar associação entre o DAS28 e os sintomas *sicca*/presença de SSs. Do mesmo modo, a presença de SS

não mostrou associação com o número de articulações dolorosas e edemaciadas, semelhante ao observado por Haga *et al* (2012). Contudo, outros autores sugerem que sintomas *sicca* estão associados com uma alta atividade de doença em pacientes com AR e foi demonstrado que existe uma correlação entre produção reduzida de saliva e a atividade da doença (Uhlig *et al.*, 1999; Young *et al.*, 2007). Sugere-se que o número limitado de pacientes com SSs e o fato de que todos os pacientes estavam em terapia imunossupressora podem ter contribuído para este resultado.

A possibilidade de existência de um gatilho viral para o desenvolvimento de doenças autoimunes em indivíduos geneticamente predispostos tem sido levantada há muitas décadas (Alspaugh *et al.*, 1978; Inman *et al.*, 1991; Dostal *et al.*, 1997; Bonneville *et al.*, 1998; Cooke *et al.*, 1998; Albert *et al.*, 1999; Griffiths *et al.*, 2000; Carty *et al.*, 2003; Masuko-Hongo *et al.*, 2003). Um vírus poderia agir como adjuvante no desenvolvimento da autoimunidade, especialmente em doenças como lúpus eritematoso sistêmico (LES), hepatites autoimunes, esclerose múltipla (EM), artrite reumatoide (AR) e síndrome de Sjögren (SS), atuando como estimulador de respostas imunes não específicas (Fairweather *et al.*, 2005). O EBV foi inicialmente envolvido na patogênese da AR por Alspaugh e Tan em 1978, que relataram que os soros de pacientes com AR eram reativos contra um antígeno nuclear em linfócitos transformados com EBV. Apesar do EBV não ser o único agente responsável para o desenvolvimento destas doenças, este vírus pode ser considerado um fator contributivo (Dittfeld *et al.*, 2016). Alguns mecanismos de ativação de autoimunidade são descritos por serem desencadeados pelo EBV, entre eles o mimetismo molecular, onde o vírus pode incorporar um epítipo que é estruturalmente similar a um auto-antígeno, o que pode causar confusão no sistema imune e como consequência induzir uma resposta autoimune. Outro mecanismo é a ativação policlonal, quando uma infecção de células B resulta na proliferação destas, aumento da produção de anticorpos e geração de complexos imunes circulantes que podem causar danos teciduais (Barzilai *et al.*, 2007). Outros vírus também podem estar envolvidos na patogênese de doenças autoimunes, incluindo o HTLV-1, herpesvírus humano e o citomegalovírus (CMV) (Inman *et al.*, 1991; Dostal *et al.*, 1997; Cooke *et al.*, 1998; Griffiths *et al.*, 2000; Carty *et al.*, 2003). No entanto, as evidências relacionando estes vírus à patogênese de doenças autoimunes são inconclusivas, uma vez que os

estudos descritos até o momento são *in vitro*, estudos com animais, relato de casos, estudos com amostras limitadas ou sem grupos controles (Dittfeld *et al.*, 2016).

Estudos anteriores demonstram que a carga viral de pacientes com EBV permanece relativamente constante (Miyashita, 1995; Ballandraud *et al.*, 2003), sendo 10 vezes mais alta em indivíduos com AR e que em controles saudáveis (Ballandraud *et al.*, 2003). No entanto, durante a fase de latência, a reativação do EBV é possível e pode ser causada por imunossupressão (com níveis correlacionados com a dose cumulativa das drogas imunossupressoras), presença de certas citocinas (fator de necrose tumoral alfa, IL-6 e IL-1 β) ou hormônios esteroides (Saito *et al.*, 1989). Neste contexto, o EBV pode participar do desenvolvimento da SS por diferentes mecanismos: reativação de células B, persistência e evasão imune em células epiteliais, indução de apoptose e consequentemente desmascaramento de antígenos crípticos, que podem ativar as células B e T através de mimetismo molecular (Lucchesi *et al.*, 2014). No presente estudo, foi encontrada uma maior prevalência do EBV/DNA e cargas virais mais altas no sangue dos indivíduos com AR que nos indivíduos saudáveis. Não houve, porém, diferença com relação à presença de EBV/DNA entre os grupos AR e AR/SS, sugerindo que a presença do vírus pode caracterizar uma maior chance para o desenvolvimento da AR mas não para a SS. É possível que uma carga viral mais alta de EBV/DNA observada nos pacientes com AR possa indicar um déficit geral no controle da infecção viral, e que isto pode ser atribuído a genes associados a AR. Esse aumento da carga viral também pode ter ocorrido devido à terapia imunossupressora que os pacientes estavam sendo submetidos. Está estabelecido na literatura que, durante o uso de medicamentos imunossupressores, tanto a proliferação das células B onde residem os vírus pode ocorrer como também pode haver o aumento da replicação lítica do vírus em células B (Crawford, 2001).

Em estudo realizado por Mourgues *et al* (2015) em pacientes com AR em tratamento com metotrexate, tocilizumabe e glicocorticoides, observou-se que o vírus EBV foi encontrado em 36,36% dos pacientes, com margem de carga viral entre 1777,2 a 3518,3 cópias/mL e somente um paciente apresentou o vírus CMV, com carga viral de 2337 cópias/mL. Em outro estudo realizado por Álvarez-Lafuente *et al* (2005) com 133 pacientes com AR, foi observado que 56% dos pacientes com AR apresentavam EBV nas amostras de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) (entre 0 e 592,3 cópias/ μ g), contra 33% dos controles saudáveis (entre 0 e

40,4 cópias/ μ g). Para amostras do soro, com relação ao CMV foi encontrado em 2% dos pacientes com AR e nenhuma amostra positiva foi encontrada nos controles saudáveis. Assim como no presente estudo, não foi encontrada correlação entre a presença dos vírus e a atividade da doença ou seus marcadores clínicos. Os pesquisadores concluíram que, como a maioria dos pacientes em tratamento para AR faziam uso de glicocorticoide, a imunovigilância para os vírus pode ter sido alterada pelo medicamento (Mourgues *et al.*, 2016). Essa alteração da imunovigilância é atribuída aos linfócitos positivos para o vírus EBV, que podem expressar o receptor glicocorticoide (RG) e esse glicocorticoide é capaz de reativar os vírus latentes *in vitro* (Glaser *et al.*, 1995). O mesmo já foi observado para o vírus CMV (Inoue-Toyoda *et al.*, 2015). No presente estudo, a maioria dos pacientes também faziam uso de glicocorticoide, o que pode ter contribuído para uma maior prevalência e carga viral neste grupo.

Interessantemente, observamos uma correlação positiva entre a presença do vírus EBV e a redução da secreção lacrimal dos indivíduos doentes e saudáveis. A associação entre a inflamação da glândula lacrimal e a infecção pelo EBV foi feita pela primeira vez na década de 50 (Tanner, 1954) e outros estudos mais recentes têm mostrado resultados semelhantes (Rhem *et al.*, 2000; Marchese-Ragona *et al.*, 2002). Marchese-Ragona *et al* (2002) sugere que presença de EBV/DNA no sangue pode favorecer à inflamação da glândula lacrimal com consequente diminuição da produção lacrimal reflexa, que pode sugerir que independente da presença de uma doença autoimune as glândulas lacrimais podem apresentar-se inflamadas e com consequente redução funcional.

Assim como o EBV, o CMV tem sido considerado um possível agente etiológico para AR e SS. Em torno de 70 a 90% da população mundial possui o CMV, dado que contribui para o aumento das suspeitas envolvendo a influência deste vírus no desenvolvimento de doenças autoimunes. A informação mais interessante sobre o papel do CMV no desenvolvimento de SS vem de estudos com ratos. Fleck *et al* (1998) observaram que uma injeção intraperitoneal de CMV em ratos levou ao desenvolvimento de sialoadenite aguda e de anticorpos anti-Ro e anti-La, os típicos anticorpos associados a SS (Skarstein *et al.*, 1995). Contudo, no presente estudo não foi encontrada correlação entre a presença do CMV e a presença de AR e SS.

A presença do EBV e CMV nas glândulas salivares menores dos pacientes biopsiados não foi observada neste estudo. Estudos anteriores mostraram os mesmos resultados, tanto para EBV (Syrjänen *et al.*, 1990; Merne *et al.*, 1996) quanto para CMV (Maitland *et al.*, 1995). As glândulas salivares menores são um possível sítio de latência destes vírus, porém os presentes achados não confirmam a associação entre os dois vírus e a SS (Maitland *et al.*, 1995).

Apesar dos resultados deste estudo serem semelhantes aos que foram publicados anteriormente, algumas limitações devem ser discutidas. O efeito da presença do EBV e CMV no sangue periférico e a síndrome de Sjögren parece ser pequeno ou inexistente, de modo que o tamanho da amostra de pacientes com AR e SS pode não ter sido grande o suficiente para estabelecer uma possível associação. Outra questão importante é que não é possível comparar resultados de pesquisas desenvolvidas com diferentes metodologias, técnicas laboratoriais e unidades de medida. Pesquisas anteriores envolvendo estes vírus avaliaram sorologia, porém clinicamente a técnica mais relevante para detecção viral é por PCR em tempo real em sangue periférico, a qual foi utilizada no presente estudo. Por fim, apesar de estudos anteriores detectarem os vírus nas amostras glandulares através da técnica de PCR, no presente estudo esta técnica não foi realizada.

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, o EBV mostrou associação com uma maior chance de apresentar AR, porém não SS. A carga viral, contudo, não apresentou associação com AR e SS. Nesse contexto, faz-se ainda necessário entender se a exacerbação dos sintomas clínicos em pacientes infectados correlaciona-se com o aumento da carga viral, o que poderá ser eventualmente respondido com estudos longitudinais.

REFERÊNCIAS

ALBERT, L.J; INMAN, R.D. Molecular mimicry and autoimmunity. **N Engl J Med**, n. 341, p. 2068-2074, 1988.

ÁLVAREZ-LAFUENTE. A; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ. B.; DE MIGUEL, S. Potential relationship between herpes viruses and rheumatoid arthritis: analysis with quantitative real time polymerase chain reaction. **Ann Rheum Dis** n. 64, p. 1357–1359, 2005.

ALSPAUGH, M.A; JENSEN, F.C; RABIN, H. Lymphocytes transformed by Epstein-Barr virus. Induction of nuclear antigen reactive with antibody in rheumatoid arthritis. **J Exp Med**, n. 147, p.1018-1027, 1978.

ARNETT, F.C; EDWORTHY, S.M; BLOCH, D.A. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for classification of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, n. 31, p. 315-324, 1988.

BALANDRAUD, N; MEYNARD, J.B; AUGER, I. Epstein-Barr virus load in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. Accurate quantification using real-time polymerase chain reaction. **Art Rheum**, n. 48, p. 1223–1228, 2003.

BARZILAI, A; SHERER, Y; RAM, M. Epstein-Barr virus and cytomegalovirus in autoimmune diseases. **Ann N Y Acad Sci**, n. 1108, p. 567-577, 2007

BEDELL, S.E; BUSH, B.T. Erythrocyte sedimentation rate: from folklore to facts. **Am J Med**, n. 78, p. 1001-1007, 1985.

BIJSTERVELD, O.P.V. Diagnostic tests in the sicca syndrome. **Arch Ophthalmol**, n. 82, p. 10-14, 1969.

BONNEVILLE, M.; SCOTET, E.; PEYRAT, M.A. Epstein-Barr virus and rheumatoid arthritis. **Rev Rhum Engl Ed**, n. 65, p. 365-368, 1998.

BRITO-ZERÓN, P.; BALDINI, C.; BOOTSMA, H. Sjögren syndrome. **Nat Rev**, n. 2, p. 1-20, 2017.

CARTU, S.M.; SNOWDEN, N. Should infection still be considered as the most likely triggering factor for rheumatoid arthritis? **J Rheumatol**, n. 30, p. 425-429, 2003.

CARVALHO, C.N. DO CARMO, R.F. IL-17A and IL-17F polymorphisms in rheumatoid arthritis and Sjögren's Syndrome. **Clin Oral Invest**, n. 3, p. 495-502, 2015.

CHANG, K.L.; CHEN, Y.Y. Description of an in situ hybridization methodology for detection of Epstein-Barr virus RNA in paraffin-embedded tissues, with a survey of normal and neoplastic tissues. **Diagn Mol Pathol**, n. 1, p. 246-255, 1992

COOK, S.P.; RIGBY, S.P. Viral studies in rheumatic disease. **Ann Med Interne**, n. 149, p. 30-33, 1998

CRAWFORD, D.H. Biology and disease associations of Epstein-Barr virus. **Phil Trans R Soc Lond B**, n. 356, p. 461-473, 2001.

DANIEL, T.E. COX, D. Associations between salivary gland histopathologic diagnoses and phenotypic features of Sjögren's Syndrome among 1,726 registry participants. **Arthritis Rheum** n. 63, p. 2021-2030, 2011.

DELALEU, N. N. New concepts in the pathogenesis of Sjögren's syndrome. **Rheum Dis Clin N Am**, n. 34, p. 833-845, 2008.

FAIRWEATHER, D. Viruses as adjuvants for autoimmunity: evidence from Cocksackievirus-induced myocarditis. **Rev Med Virol**, n. 15, p. 17-27, 2005.

FLECK, M.A.; KERN, E.R., ZHOU, T. Murine cytomegalovirus induces a Sjögren's syndrome-like disease in C57Bl/6-lpr/lpr mice. **Arthritis Rheum**, n. 12, p. 2175-2184, 1998.

FRANSEN, J.; CREEMERS, M.C.W. Remission in rheumatoid arthritis: agreement of the disease activity score (DAS28) with the ARA preliminary remission criteria. **Rheumat**, n. 43, p. 1252-1255, 2008.

GALOSSO, A. GUARISCO, R.; BELLIS, L. Extrahepatic manifestations of chronic HCV infection. **J Gastrointestin Liver Dis**, n. 1, p. 65-73, 2007.

GLASER, R.; KUTZ, L.A. Kutz LA. Hormonal modulation of Epstein-Barr virus replication. **Neuroend**, n. 62, p. 356-361, 2005.

GREESPAN, J.S.; DANIELS, T.E.; TALAL, N. The histopathology of Sjögren's syndrome in labial salivary gland biopsies. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, n. 37, p. 217–229, 1974.

GRIFFITHS, D.J. Rheumatoid arthritis: a viral aetiology? **Hosp Med**, n. 61, p. 378-379, 2000.

IGOE, A.; SCOFIELD, R.H. Autoimmunity and Infection in Sjögren's Syndrome. **Curr Opin Rheumatol**, n. 4, p. 480–487, 2013.

INMAN, R.D. Infectious etiology of rheumatoid arthritis. **Rheum Dis Clin North Am**, n. 17, p. 859-870, 1991.

INOUE-TOYODA, M.; KATO, K.; NAGATA, K. Glucocorticoids facilitate the transcription from the human cytomegalovirus major immediate early promoter in glucocorticoid receptor- and nuclear factor- κ B-like protein-dependent manner. **Biochem Biophys Res Commun**, n. 458, p. 180–185, 2015.

JONSON, R.; MOEN, K.; VESTRHEIM, R. Current issues in Sjögren's syndrome. **Oral Dis**, n. 8, p. 130–140, 2002.

MARCHESE-RAGONA, R.; MARIONI, G.; STAFFIERI, A. Acute infectious mononucleosis presenting with dacryoadenitis and tonsillitis. **Acta Ophthalmol Scand** n. 3, p. 345-346, 2002.

MASUKO-HONGO, K.; KATO, T.; NISHIOKA, K. Virus-associated arthritis. **Best Pract Res Clin Rheumatol**, n. 17, p. 309-318, 2003.

MAVRAGANI, C.P.; MOUTSOPOULOS, H.M. Conventional therapy of Sjögren's syndrome. **Crit Rev Allerg Immunol**, n. 32, p. 284–291, 2007.

MERNE, M.E.T.; SYRJANEN, S.M. Detection of Epstein-Barr virus in salivary gland specimens from Sjögren's syndrome patients. **Laryng**, n. 106, p. 1534-1539, 1996.

MIGNOGNA, M.D.; FEDELE, S.; LO RUSSO, L. Sjögren's syndrome: the diagnostic potential of early oral manifestations preceding hyposalivation/xerostomia. **J Oral Pathol Med**, n. 34, p.1-6, 2005.

MIYASHITA, E.M.; YANG, B.; LAM, K.M. A novel form of Epstein-Barr virus latency in normal B cells in vivo. **Cell**, n. 80, p. 593-601, 1995.

MOURGUES, C.; HENQUELL, C. TATAR, Z. Monitoring of Epstein-Barr virus (EBV)/cytomegalovirus (CMV)/varicella-zoster virus (VZV) load in patients receiving tocilizumab for rheumatoid arthritis. **J Bon Sp**, n. 4, p. 412-415, 2016.

NAAZESH, M.; CHRISTENSEN, C.; BRIGHTMAN, V. Clinical criteria for the diagnosis of salivary gland hypofunction. **J Dent Res**, n. 71, p. 1363-1369, 1992.

RUSTHEN, S.; YOUNG, A.; HERLOFSON, B.B. Oral disorders, saliva secretion, and oral health-related quality of life in patients with primary Sjögren's syndrome. **Eur J Oral Sci**, n. 4, p. 1–7, 2017.

SAAL, J.G.; KRIMMEL, M.; STEIDLE, M.M. Synovial Epstein-Barr virus infection increases the risk of rheumatoid arthritis in individuals with the shared HLA-DR4 epitope. **Arthritis Rheum**, n.7, p. 1485-1496, 1996.

SAITO, I. SERVENIUS, B.; COMPTON, T.J. Detection of epstein-barr virus dna by polymerase chain reaction in blood and tissue biopsies from patients with Sjögren's syndrome. *J Exp Med*, n. 169, p. 2191-2198, 1989.

SKARSTEIN, K.; WAHREN, M.; ZAURA, E. Characterization of T cell receptor repertoire and anti-Ro/SSA autoantibodies in relation to sialadenitis of NOD mice. **Autoimm**, n. 1, p. 9-16, 1995.

STEFANSKI, A.L.; TOMIAK, C.; PLEYER, U. The Diagnosis and Treatment of Sjögren's Syndrome. **Dtsch Arztebl**, n. 14, p. 354–361, 2017.

SYRJÄNEN, S.; KÄRJÄ, V.; CHANG, F.J. Epstein-Barr virus involvement in salivary gland lesions associated with Sjögren's syndrome. **J Otorhinolaryngol Relat Spec**, n. 4, p. 254-259, 1990.

VITALI, C.; BOMBARDIERI, S.; JONSSON, R. Classification criteria for Sjögren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. **Ann Rheum Dis**, n. 61, p. 554-558, 2002.

YOUNG, A.; KODURI, G. Extra-articular manifestations and complications of rheumatoid arthritis. **Best Pract Res Clin Rheumatol**, n. 21, p. 909–927, 2007.

APÊNDICES

APÊNDICE A - ARTIGO

ASPECTOS MICROSCÓPICOS DE GLÂNDULAS SALIVARES MENORES EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE E SUSPEITA DE SÍNDROME DE SJÖGREN

RUNNING TITLE: MICROSCOPIC ASPECTS OF MINOR SALIVARY GLANDS IN
PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS AND SUSPECTED SJÖGREN'S
SYNDROME

Camila Nunes Carvalho Sorgato¹ e Luiz Alcino Monteiro Gueiros²

- 1- Doutoranda. Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Universidade Federal de Pernambuco;
- 2- Professor Adjunto – Estomatologia. Departamento de Clínica e Odontologia Preventiva, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE.

Autor correspondente:

Prof. Luiz Alcino Monteiro Gueiros

Av. Professor Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária

Recife-PE Brasil CEP: 50670-901

+55 81 21268816

luiz.mgueiros@ufpe.br

RESUMO

Introdução: A síndrome de Sjögren (SS) caracteriza-se pela presença de infiltrado inflamatório linfocítico focal nas glândulas salivares, resultando em redução de sua função secretória e consequente ressecamento oral. A biópsia de glândulas salivares menores representa um importante etapa para o diagnóstico da SS, sendo considerada um método seguro e de alta especificidade. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi avaliar as características morfológicas de glândulas salivares menores de pacientes portadores de artrite reumatoide (AR) e suspeita de SS, correlacionando-as aos aspectos clínicos. **Materiais e métodos:** Foi realizado um estudo de acurácia composto por 55 indivíduos portadores de AR e suspeita de síndrome de Sjögren. Após a realização da biópsia de glândula salivar menor e definição do diagnóstico, os pacientes foram distribuídos em 2 grupos: grupo AR – Artrite Reumatoide (n=33) e grupo AR/SS – síndrome de Sjögren secundária à Artrite Reumatoide (n=22). Além da biópsia, os pacientes foram submetidos ao teste de fluxo salivar em repouso e teste de Schirmer. **Resultados:** Indivíduos com SS apresentaram idade mais elevadas ($p=0,012$). O grupo AR/SS apresentou menor média do teste de Schirmer e uma maior frequência de biópsia com aspecto microscópico positivo para SS. Os marcadores de atividade da AR foram influenciados pela presença de SS ($p>0,05$). A dilatação e atrofia ductais são aspectos comuns em pacientes com SS. Quando os aspectos microscópicos foram comparados aos critérios clínicos, observou-se associação entre a presença de dilatação ductal e fluxo salivar em repouso ($p=0,033$) e biópsia positiva ($p=0,044$). Para as medidas de acurácia, foram obtidos os seguintes resultados: sensibilidade (45%), especificidade (87%), valor preditivo positivo (71%) e valor preditivo negativo (70%). **Conclusão:** A biópsia de glândulas salivares menores apresenta elevada especificidade, mas baixa sensibilidade. Os aspectos morfológicos isoladamente não parecem influenciar a apresentação clínica da AR e SS.

Palavras-chave: Síndrome de Sjögren, glândulas salivares menores, biópsia, foco linfocitário.

ABSTRACT

Introduction: Sjögren's syndrome (SS) is characterized by the presence of focal lymphocytic inflammatory infiltrate in the salivary glands, resulting in reduction of secretory function and consequent oral dryness. The biopsy of minor salivary glands represents an important step for the diagnosis of SS, being considered a safe and high specificity method. **Objective:** The objective of this study was to evaluate the morphological characteristics of minor salivary glands of patients with rheumatoid arthritis (RA) and suspicion of SS, correlating them with clinical aspects. **Materials and methods:** We conducted an epidemiological and observational study of 55 individuals with RA and suspected Sjögren's syndrome. After the minor salivary gland biopsy and definition of the diagnosis, the patients were divided into 2 groups: RA group - Rheumatoid arthritis (n=33) and AR/SS group - Sjögren syndrome secondary to rheumatoid arthritis (n=22). In addition to the biopsy, the patients were submitted to salivary flow at rest and Schirmer's test. **Results:** Individuals with SS presented higher age ($p=0.012$). The AR/SS group had a lower Schirmer test mean and a higher frequency of positive microscopic SS biopsy. The markers of RA activity were influenced by the presence of SS ($p>0.05$). Ductal dilation and atrophy are common features in patients with SS. When the microscopic aspects were compared to the clinical criteria, there was an association between the presence of ductal dilatation and resting salivary flow ($p=0.033$) and positive biopsy ($p=0.044$). For the measures of accuracy, the following results were obtained: sensitivity (45%), specificity (87%), positive predictive value (71%) and negative predictive value (70%). **Conclusion:** The biopsy of the minor salivary glands presents high specificity, but low sensitivity. Morphological aspects alone do not seem to influence the clinical presentation of RA and SS.

Key Words: Sjögren's Syndrome, Minor Salivary Glands, Biopsy, Anatomy and Histology

INTRODUÇÃO

A SS caracteriza-se pela infiltração linfocítica nas glândulas exócrinas, principalmente as glândulas salivares e lacrimais, resultando em redução de suas funções secretórias e consequente ressecamento oral e ocular (Mavragani *et al.*, 2010; Ice *et al.*, 2012; Tzioufas *et al.*, 2012). Classicamente, SS é classificada como primária (SSp), quando ocorre isoladamente ou secundária (SSs), quando se apresenta em associação com outra doença autoimune sistêmica, principalmente lúpus eritematoso sistêmico (LES) e artrite reumatoide (AR) (Bowman *et al.*, 2012). A forma primária apresenta prevalência de 0,5 a 1%, enquanto que a prevalência da forma secundária parece mudar de acordo com a doença associada, variando de 9 a 19% no LES a 4 a 31% na AR (Ramos-Casals *et al.*, 2002). Apesar de relativamente comum, a SS é frequentemente subdiagnosticada e portanto subtratada, sendo a importância da associação com outras doenças autoimunes ainda pouco compreendida (Reksten *et al.*, 2009; Manoussakis *et al.*, 2010).

O diagnóstico da SS é complexo e depende de sintomas subjetivos e de características histopatológicas e sorológicas obtidas através da investigação de uma equipe multidisciplinar, que inclui reumatologistas, oftalmologistas e dentistas. A biópsia de glândula salivar menor representa um importante aspecto nos três critérios de classificação mais recentes (Vitali *et al.*, 2002; Shibaski *et al.*, 2012; Shiboski *et al.*, 2017), sendo considerada um método seguro e de alta especificidade (Pereira *et al.*, 2014). Através desta análise é possível avaliar o dano glandular e a atividade da doença diretamente no tecido afetado (Pereira *et al.*, 2014).

Assim, a presença de um padrão específico de infiltrado inflamatório periductal, ou sialoadenite linfocítica focal, e sua avaliação através de escore de foco representa um marco significativo na doença. Em 1974, Greenspan *et al* definiram o escore de foco como a média do número de focos (representado por uma coleção de 50 ou mais linfócitos) por área de 4mm², e valores maiores que 1 são considerados como critério positivo para SS. Contudo, por vezes o infiltrado inflamatório linfocitário leva à destruição acinar e ductal e perda do parênquima glandular, resultando nos sinais e sintomas clássicos de seca bucal e ocular (Hulkkonnen *et al.*, 2001; Bombardieri *et al.*, 2004) mesmo sem preencher o critério microscópico.

A presença do foco linfocítico, juntamente com a presença de autoanticorpos, são considerados aspectos-chave para o diagnóstico dessa doença (Stewart *et al.*, 2008; Daniels *et al.*, 2011; Tavoni *et al.*, 2012). Outros achados microscópicos, como dilatação ductal, atrofia acinar, esclerose do tecido conjuntivo, presença de tecido glandular adiposo e relação ácino/ducto diminuída são frequentemente observados em glândulas salivares de pacientes com SS. Apesar disso, a biópsia não é considerada rotina em alguns centros de referência, especialmente devido à necessidade de avaliação cuidadosa dos espécimes e à natureza invasiva do procedimento (Pereira *et al.*, 2014).

Apesar da biópsia de glândula salivar ser comumente aceita na prática clínica, uma metanálise recente apontou que poucos estudos embasam a utilidade no diagnóstico da SS, sugerindo a necessidade de estudos que correlacionem os dados microscópicos com a apresentação clínica do paciente (Risselada *et al.*, 2014). Além disso, a dificuldade do diagnóstico é refletida na grande quantidade de critérios de classificação que foram criados nos últimos 25 anos (Baldini *et al.*, 2012). A indicação da biópsia de glândula salivar menor não foi bem estabelecida ainda na prática clínica e poucos estudos avaliaram a sensibilidade e especificidade da biópsia em pacientes com SSp e SSs (Guellec *et al.*, 2013). Dessa forma, este estudo teve por objetivo avaliar as características morfológicas das glândulas salivares menores de pacientes portadores de artrite reumatoide submetidos à biópsia labial para diagnóstico de SSs, correlacionando-as aos aspectos clínicos e avaliar a acurácia da biópsia baseando-se em casos suspeitos de SSs.

METODOLOGIA

Trata-se de um estudo de acurácia por 55 indivíduos portadores de AR exclusiva e com suspeita de síndrome de Sjögren secundária. Após a realização da biópsia e estabelecimento do diagnóstico, os pacientes foram distribuídos em 2 grupos: grupo AR – Artrite Reumatoide (n=33) e grupo AR/SS – síndrome de Sjögren secundária à Artrite Reumatoide (n=22). A amostra foi obtida por conveniência no período entre junho/2013 e maio/2014. Todos os pacientes foram provenientes do Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE) e atendidos no Serviço de Estomatologia da UFPE.

Foram incluídos no estudo os pacientes acima de 18 anos, portadores de AR exclusiva (Arnet *et al.*, 1988) e SSs segundo o critério do Consenso Americano e Europeu (Vitali *et al.*, 2002). Todos os pacientes com AR foram submetidos à biópsia uma vez que antes do procedimento apresentavam suspeita de serem portadores da SSs. Foram considerados suspeitos os indivíduos que tenham apresentado pelo menos um critério positivo, sendo um subjetivo (evidência de *síndrome sicca* – xeroftalmia ou xerostomia) ou um objetivo (fluxo salivar em repouso reduzido ou teste de Schirmer positivo).

Foram excluídos do estudo pacientes com história de radioterapia na região de cabeça e pescoço, infecção por HIV, sarcoidose, amiloidose, doença do enxerto contra hospedeiro, infecção por HCV e em uso de drogas anticolinérgicas, além de pacientes que apresentassem outras doenças reumatológicas associadas. Todos os voluntários consentiram a sua inclusão no estudo por meio de assinatura do TCLE, após aprovação do projeto de pesquisa no CEP-UFPE sob CCAE 10221112.3.0000.5208.

Avaliação dos pacientes

O questionário da pesquisa foi realizado para obtenção de dados sócio-demográficos e relativos à história clínica da doença. Neste questionário, os pacientes responderam às perguntas para avaliação de xerostomia e xeroftalmia.

Para avaliação da xerostomia e xeroftalmia, o paciente respondeu às perguntas que compõem o critério de Consenso Americano e Europeu (Vitali *et al.*, 2002).

Fluxo Salivar em Repouso (FSR)

Após preenchimento dos dados, seguiu-se a coleta de saliva para avaliação do fluxo salivar em repouso (FSR) através da obtenção da saliva total não-estimulada. A coleta ocorreu da seguinte forma segundo método desenvolvido por Navazesh, Christensen e Brightman (1992): o exame foi realizado no período da tarde, entre 14:00 e 17:00h, e o paciente foi orientado a não ingerir alimentos, beber ou fumar por um período mínimo de 90 minutos antes da coleta. Após estarem sentados confortavelmente, os pacientes foram orientados a levar a cabeça levemente para frente, deglutir e então deixar a saliva escorrer da boca em um recipiente plástico

milimetrado durante o período de 15 minutos. A taxa de FSR é determinada pelo valor total dividido por 15, sendo expressa em mililitros por minuto. Valores abaixo de 1,5mL (ou 0,1mL/min) foram considerados positivos.

Teste de Schirmer

Após a obtenção do fluxo salivar em repouso, o paciente foi submetido ao Teste de Schirmer I, sem uso de anestésico tópico, para avaliação do lacrimejamento basal e reflexo. Os pacientes foram orientados a não utilizar substitutos lacrimais por um período de pelo menos 60 minutos antes do teste. O teste consistiu na colocação de uma tira de papel filtro Whatman no. 41 de 5 mm de largura por 35 mm de comprimento (Teste de Schirmer, Ophthalmos®, São Paulo, Brasil) na junção do 1/3 médio e lateral das pálpebras inferiores. Após 5 minutos, as tiras de papel filtro são retiradas. A quantificação da produção lacrimal é feita pela medida da extensão do papel filtro que ficou úmida (Bijsterveld, 1969). Valores menores do que 5 mm após 5 min em um dos olhos foram considerados positivos.

Biópsia de glândula salivar menor

Os pacientes incluídos no estudo apresentaram SSs ou AR exclusiva. Todos os pacientes com AR exclusiva apresentavam, antes da biópsia, suspeita de SSs e por isso foram submetidos ao procedimento para confirmação ou não desta doença. Este procedimento consistiu de uma pequena incisão de 1,5 a 2,0 cm na mucosa labial inferior lateralmente 1 cm à linha média, onde foram retiradas de 4 a 7 glândulas salivares menores para avaliação histopatológica. Após a remoção do espécime cirúrgico, o mesmo foi fixado em solução a 4% de formol neutro tamponado e encaminhado para processamento. Após a obtenção dos blocos parafinados, cortes de cinco micrômetros foram realizados para montagem da lâmina e coloração em H&E, os quais foram avaliados posteriormente por um patologista oral. Os casos foram considerados positivos quando observados um ou mais focos de 50 ou mais linfócitos em 4mm².

Na análise histopatológica, foram considerados os seguintes critérios estabelecidos por Pereira *et al* (2014): número de lóbulos de glândula salivar, porcentagem de tecido adiposo nas glândulas salivares (menos de 10%, entre 10 e

50% ou maior que 50%), presença ou ausência de dilatação e atrofia ductais, presença ou ausência de esclerose, presença, número e distribuição de focos linfocitários (1 foco foi composto por pelo menos 50 linfócitos agrupados, podendo apresentar distribuição periductal, difusa e sem padrão), relação ácino/ducto normal ou diminuída.

Medidas de Acurácia

Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) da biópsia de glândula salivar menor foram calculados com o diagnóstico conforme os critérios do Consenso Americano e Europeu (Vitali *et al.*, 2002) servindo como padrão de referência.

RESULTADOS

Pacientes e Características Clínicas

Foram incluídos no estudo 55 pacientes, todos do sexo feminino, com idade média de $52,9 \pm 1,7$ anos, variando de 19 a 77. O diagnóstico de SSs foi descartado através da biópsia em 29 pacientes (29/55, 52,7%). Vinte e dois pacientes (40%) apresentaram diagnóstico de SSs e destes, quatro pacientes (4/22, 18,1%) somente puderem ter seu diagnóstico estabelecido através da realização da biópsia (Figura 1). A idade do grupo AR/SS foi maior que o grupo AR ($58,0 \pm 10,4$ x $49,5 \pm 12,9$ anos; $p=0,012$). O grupo AR/SS apresentou menor média para o teste de Schirmer e uma maior frequência de biópsia com aspecto microscópico positivo para SS (Tabela 1).

Marcadores clínicos

Os marcadores de atividade da AR (DAS28, articulações dolorosas e edemaciadas) não mostraram diferenças entre os pacientes com e sem SSs ($p>0,05$, tabela 2). A média da VHS mostrou-se discretamente maior no grupo SS (39,9mm/1hora) que no grupo AR (37,6mm/1hora).

Crítérios Histológicos

A tabela 3 apresenta os dados microscópicos. Na amostra analisada, observa-se que a dilatação e atrofia ductais são aspectos comuns em pacientes com SS. A presença de tecido adiposo é escassa nas glândulas salivares menores, bem como a presença de esclerose. A maior parte dos espécimes apresentaram quadro de sialoadenite linfocítica focal com focos em distribuição periductal e relação ácino/ducto diminuída.

Quando os aspectos microscópicos foram comparados aos critérios clínicos, observou-se associação entre a presença de dilatação ductal e FSR ($p=0,033$) e biópsia ($p=0,044$) (Tabela 4). Para os demais cruzamentos não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes ($p>0,05$).

Na tabela 5 estão descritos os valores de sensibilidade (45%), especificidade (87%), valor preditivo positivo (71%) e valor preditivo negativo (70%) da biópsia de glândula salivar menor.

DISCUSSÃO

Pacientes com SS secundária representam um subgrupo distinto de pacientes com AR que representam um *cluster* de maior atividade de doença e sintomas *sicca*. Neste contexto, a avaliação das biópsias de glândulas salivares menores tem se mostrado um importante aspecto ao diagnóstico da SS, sendo então necessária uma melhor compreensão da relevância clínica dos achados microscópicos. O presente estudo avaliou as características microscópicas de glândulas salivares menores de pacientes com artrite reumatoide (AR) e suspeita de síndrome de Sjögren secundária (SSs), correlacionando-as com os aspectos clínicos das duas doenças. A dilatação ductal mostrou-se um importante aspecto microscópico, estando associado à redução do fluxo salivar em repouso e a presença de focos linfocitários nas glândulas salivares menores. Contudo, os aspectos morfológicos isoladamente não parecem influenciar a apresentação clínica da AR e SS.

A SS é uma doença crônica e inflamatória caracterizada pela xerostomia, xeroftalmia e por alterações funcionais, tanto nas glândulas lacrimais quanto nas salivares. A doença caracteriza-se pela infiltração linfocítica nas glândulas exócrinas,

principalmente as glândulas salivares e lacrimais, resultando em redução de suas funções secretórias e consequente ressecamento oral e ocular (Mavragani *et al.*, 2010; Ice *et al.*, 2012; Tzioufas *et al.*, 2012). Em decorrência, os sintomas *sicca* se apresentam como um achado frequente e chave no quadro clínico da doença.

A biópsia de glândula salivar menor constitui uma importante ferramenta de elevada especificidade no processo de diagnóstico da SS que possibilita avaliar a atividade autoimune da doença em um órgão-alvo (Daniels *et al.*, 2011). Apesar disso, este procedimento ainda não é rotina na maioria dos serviços, uma vez que necessita de intervenção cirúrgica associada a sequelas relativamente frequentes, bem como de uma cuidadosa avaliação histopatológica (Pereira *et al.*, 2014). Em estudo retrospectivo de Giovelli e colaboradores (2015) com uma amostra de 216 pacientes com suspeita de síndrome de Sjögren, a biópsia de glândula salivar menor apresentou especificidade de 97,43%, próximo ao valor encontrado no presente estudo. No entanto, sensibilidade e valores preditivos positivo e negativo foram diferentes (86,5%, 95% e 92,6%, respectivamente). Deve-se considerar que no estudo de Giovelli *et al.* (2015) apenas 8,8% dos pacientes apresentaram diagnóstico de síndrome de Sjögren secundária e o curso clínico da forma primária da doença parece ser diferente da forma secundária, o que pode ter contribuído para este resultado. Em uma revisão sistemática realizada por Guellec e colaboradores (2013), sensibilidade e especificidade da biópsia de glândula salivar menor variaram de 63,5% a 93,7% e de 61,2% a 100%, respectivamente. Sugere-se que especificidade e valor preditivo positivo são altos, dependendo do perfil dos pacientes avaliados.

O presente estudo apresentou uma amostra composta exclusivamente por mulheres adultas, o que reforça a possibilidade de que alterações hormonais e genéticas podem, ao menos parcialmente, modular o desenvolvimento da doença (Shiboski *et al.*, 2012). Outros autores confirmam essa predileção, ao estabelecerem que a SS acomete predominantemente mulheres de meia idade na proporção mulher:homem de 9:1 (Delaleu *et al.*, 2008; Hamza *et al.*, 2012; Ice *et al.*, 2012; Tzioufas *et al.*, 2012). Com relação à idade, conforme estudo realizado em uma população eslovena, os pacientes com a forma primária da doença apresentaram média de idade de 52,2 anos (Tomsic *et al.*, 1999). No presente estudo, os indivíduos do grupo AR/SS apresentaram média de idade de 58 anos, quase dez anos a mais que os pacientes do grupo AR, sugerindo que a SS parece ser manifestar mais tarde

quando em associação a uma doença autoimune.

Entre as características clínicas dos pacientes portadores de AR e SS estão a presença de articulações dolorosas e edemaciadas, o que caracteriza a poliartrite simétrica, teste de velocidade de hemossedimentação aumentado em função da atividade crônica da doença e alta prevalência de sintomas de secura ocular e oral (Aliko *et al.*, 2010; Turesson *et al.*, 2003). No presente estudo, os marcadores de atividade da AR (DAS28, VHS, articulações dolorosas e edemaciadas) não apresentaram diferenças entre os grupos com e sem SSs, demonstrando que a SS parece não interferir na atividade da doença de base.

O critério de classificação para SS considera a presença de infiltrado inflamatório periductal nas glândulas salivares como um marco da doença. Apesar da biópsia não estabelecer diagnóstico se considerada isoladamente, a SICCA Alliance reforça sua grande importância clínica para confirmação deste diagnóstico e alta especificidade (Daniels *et al.*, 2011). Em nosso estudo, o diagnóstico de SSs foi descartado através da realização da biópsia em mais da metade dos pacientes. Diante deste dado, reforça-se a necessidade de sua realização em todos os serviços que recebem estes pacientes. Deve-se destacar que quatro pacientes apresentaram a biópsia positiva, porém não foram diagnosticados com SS porque não tinham queixa de xerostomia nem xerofltamia necessárias para o estabelecimento do diagnóstico segundo o critério de Vitali *et al* (2012). Caso o critério mais atual tivesse sido utilizado, os quatro pacientes seriam classificados como portadores SS, uma vez que o diagnóstico é obtido somente através de critérios objetivos (biópsia de glândula salivar menor, anti-SSA, escore ocular, teste de Schirmer e fluxo salivar em repouso) (Shiboski *et al.*, 2017).

Menos da metade dos pacientes com diagnóstico de SSs apresentaram biópsia compatível com a síndrome, bem como não foram encontradas diferenças entre os aspectos morfológicos em pacientes com AR e SS. Deve-se considerar, no entanto, que todos os indivíduos incluídos no estudo estavam sob terapia imunossupressora. Acredita-se que alguns parâmetros histológicos podem ser alterados pelo efeito sistêmico desta terapia, conforme relatado por Zandebelt *et al* (2001) e Pereira *et al* (2014). Entretanto, Kapsogeorgou e colaboradores (2013) avaliaram 28 pacientes com síndrome de Sjögren por meio de duas biópsias sequenciais, a primeira realizada para obtenção do diagnóstico de SS e a segunda biópsia após o início do tratamento

com imunossupressor. Os autores observaram que a variação das características histológicas não foi significativa após o início do uso de imunossupressores.

Tradicionalmente, a sialodenite linfocítica focal é a única característica histológica reconhecida para o diagnóstico de SS (Wise *et al.*, 1993; Gerli *et al.*, 1997; Daniels *et al.*, 2011; Guellec *et al.*, 2013). Em contraste, a avaliação de outras características histológicas na SS é escassa. Apesar de Greenspan e colaboradores terem validado a utilidade de documentar o número de focos linfocitários por 4mm² do tecido glandular salivar para classificação, pouco tem sido relatado sobre a importância de outros aspectos morfológicos da glândula, como a fibrose e a atrofia glandular (Bookmann *et al.*, 2011).

Conforme relatado por Daniels *et al.* (2011), a presença de achados histológicos adicionais representa características de significância desconhecida, as quais são *per se* padrões independentes, tais como sialodenite crônica inespecífica (focos escore <1, atrofia acinar, fibrose, dilatação ductal) ou sialodenite crônica esclerosante. No presente estudo, observaram-se como características morfológicas comuns a dilatação e a atrofia ductais. Atrofia de moderada a severa e fibrose já foram descritas como sendo comuns em biópsias de pacientes com SS e estas características podem estar relacionadas com a evolução da doença (Bookmann *et al.*, 2011). Em um estudo realizado com 38 pacientes sob suspeita de SS, os autores somente encontraram atrofia acinar em 10,5% da amostra. Ressalta-se que, no presente estudo, foram também incluídos pacientes com suspeita de SS, porém, após a realização da biópsia, o diagnóstico foi estabelecido ou não. É importante enfatizar que estas características histológicas apresentam um componente subjetivo durante a avaliação, limitando a utilização destes parâmetros para o diagnóstico da SS.

A dilatação ductal apresentou associação com o fluxo salivar reduzido e com a biópsia positiva. De acordo com o critério histológico, para que uma biópsia seja considerada compatível com a síndrome de Sjögren, a glândula deve apresentar um ou mais focos linfocitários em 4mm² (Greenspan *et al.*, 1976). Com a presença do infiltrado inflamatório, há destruição das células epiteliais, com consequente comprometimento do parênquima da glândula e dilatação ductal (Dalavanga *et al.*, 1986). Da mesma forma, o fluxo salivar em repouso reduzido também faz parte dos critérios objetivos para o diagnóstico da SS (Vitali *et al.*, 2002).

Apesar dos resultados do presente estudo estarem de acordo com outros dados publicados previamente, alguns aspectos devem ser considerados. Primeiramente, o tamanho da amostra para avaliar características morfológicas e clínicas pode não ter sido grande o suficiente para encontrar outras associações. Outra questão é o desenho transversal deste tipo de estudo, que não possibilita avaliar a progressão temporal das características histológicas. Este estudo não é caracterizado totalmente como de acurácia, uma vez que os pacientes foram diagnosticados com base no critério de Consenso Americano e Europeu (Vitali *et al.*, 2002) e a biópsia faz parte deste critério. Além disso, os critérios mais recentes de 2012 (Shiboski *et al.*, 2012) e 2017 (Shiboski *et al.*, 2017) também consideram a sorologia além da biópsia e, pelo fato dos pacientes não terem realizado a sorologia, a biópsia positiva já classificaria todos os pacientes com SSs. Por fim, deve-se considerar que a avaliação histológica está sujeita a vários tipos de erros de interpretação, uma vez que alguns critérios podem ser subjetivos.

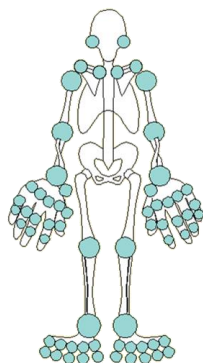
CONCLUSÃO

Em conclusão, a biópsia de glândulas salivares menores apresenta elevada especificidade, mas baixa sensibilidade. A dilatação e atrofia ductais são características comuns em pacientes com SS, não havendo diferenças entre os grupos AR e SS quando os aspectos microscópicos foram analisados. A dilatação ductal apresentou associação com a redução do fluxo salivar em repouso e infiltrado inflamatório linfocítico focal.

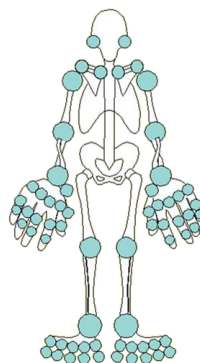
APÊNDICE B - Questionário da pesquisa

Número da pesquisa:		Prontuário:	
Nome:		Data:	
Data nascimento:	Idade (anos):		
Endereço:			
CEP:	Telefone:		
Profissão:		Sexo: 1. Fem 2. Masc	
Cor: 1.Branca 2.Parda 3.Negra 4. Amarela 5. Indígena			
Tabagismo: 1. sim 2. não			
Duração do tabagismo:		Carga tabágica:	
Renda Familiar:		= salários mínimos	
Data de início dos sintomas:			
Tempo dos sintomas: meses		Tempo de diagnóstico: meses	
Fator Reumatóide: 1. Positivo 2. Negativo			
Manifestações extra-articulares: 1.Sim 2. Não			
Nódulos subcutâneos 1. Sim 2. Não		Olho seco 1. Sim 2. Não	
Uveíte 1. Sim 2. Não		Vasculites 1. Sim 2. Não	
Anemia 1. Sim 2. Não		Fibrose Pulmonar: 1. Sim 2. Não	
Outras: 1.Sim 2.Não Qual?			
EVA paciente: Levando em consideração todas as formas como a artrite afeta sua vida, indique como você está se sentindo neste momento: Muito bem Muito mal			
Score: mm			
Fadiga: Com relação ao cansaço, indique como você tem se sentindo nesta última semana: Muito bem Muito mal			

Score: mm

Contagem articular

Dolorosas



Edemaciadas

Exames	Resultado	Data
VHS (1h)		
PCR		
Fator reumatóide (método)		
FAN		
Anti-CCP		
Anti-Ro		
Anti-La		

Tratamento			
AINH Droga:	Dose:	Início:	Tempo:
Prednisona	dose	Data de início	Tempo:
Cloroquina	dose	Data de início	Tempo:
Hidroxicloroquina	dose	Data de início	Tempo:
Metotrexate	dose	Data de início	Tempo:
Leflunomida	dose	Data de início	Tempo:
Sulfassalazina	dose	Data de início	Tempo:
Anti-TNF início:	Dose:	Dose:	Tempo:

Vitamina D	dose:	Data de início:	Tempo:
Carbonato de cálcio	dose:	Data de início:	Tempo:
Bifosfonato	dose:	Data de início:	Tempo:
Outros:			
Comorbidades			
HAS	1. Sim	2. Não	
Diabetes mellitus	1. Sim	2. Não	
Osteopenia	1. Sim	2. Não	
Osteoporose	1. Sim	2. Não	
Hipotireoidismo	1. Sim	2. Não	
Dislipidemia	1. Sim	2. Não	
Cardiopatía	1. Sim	2. Não	
Depressão	1. Sim	2. Não	
Lúpus	1. Sim	2. Não	
Síndrome de Sjogren	1. Sim	2. Não	
Osteoartrose	1. Sim	2. Não	
Outras:			
Medicamentos em uso:			
DADOS DA DOENÇA DE BASE (AR)			
1 Rigidez matinal pelo menos 1 hora	1. Sim	2. Não	
2 Artrite de 3 ou mais áreas	1. Sim	2. Não	
3 Artrite de articulações das mãos	1. Sim	2. Não	
4 Artrite simétrica	1. Sim	2. Não	
5 Nódulos subcutâneos	1. Sim	2. Não	
6 Fator reumatóide positivo	1. Sim	2. Não	
7 Alterações radiológicas típicas	1. Sim	2. Não	

VASm:	VASp:	HAQ:
DAS 28:	CDAI:	
Exame Oral	Lesão: 1. Sim 2 –Não	Cárie:
Candidose: 1. Sim 2 –Não	Língua despapilada: 1. Sim 2 –Não	
Questionário de xerostomia		
1. Sinto minha boca seca		
☐ Nunca ☐ Quase nunca ☐ ocasionalmente ☐ quase sempre ☐ sempre		
2. Tenho dificuldade em comer alimentos secos		
☐ Nunca ☐ Quase nunca ☐ ocasionalmente ☐ quase sempre ☐ sempre		
3. Acordo a noite para beber água		
☐ Nunca ☐ Quase nunca ☐ ocasionalmente ☐ quase sempre ☐ sempre		
4. Minha boca fica seca durante a alimentação		
☐ Nunca ☐ Quase nunca ☐ ocasionalmente ☐ quase sempre ☐ sempre		
5. Eu molho a boca para facilitar a deglutição		
☐ Nunca ☐ Quase nunca ☐ ocasionalmente ☐ quase sempre ☐ sempre		
6. Eu como balas e chicletes doces para aliviar a secura da boca		
☐ Nunca ☐ Quase nunca ☐ ocasionalmente ☐ quase sempre ☐ sempre		
7. Tenho dificuldade em deglutir algumas comidas		
☐ Nunca ☐ Quase nunca ☐ ocasionalmente ☐ quase sempre ☐ sempre		
8. A pele do meu rosto é ressecada		
☐ Nunca ☐ Quase nunca ☐ ocasionalmente ☐ quase sempre ☐ sempre		
9. Sinto meus olhos secos		
☐ Nunca ☐ Quase nunca ☐ ocasionalmente ☐ quase sempre ☐ sempre		
10. Sinto meus lábios secos		
☐ Nunca ☐ Quase nunca ☐ ocasionalmente ☐ quase sempre ☐ sempre		
11. A parte interna do meu nariz é ressecada		
☐ Nunca ☐ Quase nunca ☐ ocasionalmente ☐ quase sempre ☐ sempre		
Sintomas oculares		
Sensação de corpo estranho:	sim ☐ não ☐	
Ardência ou queimação:	sim ☐ não ☐	
Sensação de olho seco:	sim ☐ não ☐	

APÊNDICE C - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Termo De Consentimento Livre e Esclarecido – Grupos de Estudo

O Sr. (a) está sendo convidado (a) a participar da pesquisa intitulada “Detecção e carga viral de EBV e CMV em portadores de artrite reumatoide e sua relação com o desenvolvimento de síndrome de Sjögren secundária” que será realizado por Camila Nunes Carvalho, doutoranda do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UFPE, o qual também recolherá o seu consentimento, realizará um questionário e colherá os dados necessários para a realização da pesquisa. Este trabalho está sob a coordenação do professor Prof. Dr. Luiz Alcino Monteiro Gueiros.

Justificativa e objetivos: Através desse estudo e de estudos futuros decorrentes deste, poderemos compreender melhor os mecanismos patológicos associados ao desenvolvimento da Síndrome de Sjögren secundária (SSs) a Artrite Reumatóide. Este estudo visa avaliar a presença de dois vírus, o EBV e o CMV, em pacientes com SS secundária a AR.

Informações: **Procedimentos:** Será realizado um **questionário** para obtenção dos relativos ao seu nome, endereço e história clínica da doença. O Sr. (a) passará por um **exame clínico** da boca para determinar o fluxo salivar em repouso por meio de um exame simples e não invasivo. Caso haja diminuição significativa da quantidade de saliva ou queixa de boca seca procederemos uma remoção de glândulas salivares menores do lábio inferior por meio de uma pequena cirurgia (**biópsia**) com o objetivo diagnóstico. O Sr. (a) passará por anestesia local, incisão com lâmina de bisturi, remoção de 5 a 6 glândulas salivares menores e sutura da região. O Sr.(a) receberá informações e orientações pós-operatórias e receberá uma prescrição de analgésicos em caso de desconforto relativos ao procedimento cirúrgico. Será coletada uma **amostra de saliva**, na qual, o Sr.(a) deverá expelir toda a saliva por um período de 5 minutos em um recipiente plástico. Uma **amostra de sangue** será coletada com um tubo de coleta com agulha estéril. Esta pesquisa não é um ensaio clínico, portanto, não há grupo placebo. Não há métodos alternativos existentes para obtenção da informação desejada nesta pesquisa. **Desconfortos, riscos previsíveis e benefícios esperados:** O paciente submetido à pesquisa poderá correr o risco de desconforto leve durante o exame clínico, reações adversas relacionados ao procedimento de biópsia, tais como: alergia ao anestésico, complicações hemorrágicas, complicações pós-operatórias, riscos de hematomas e desconfortos durante a coleta de sangue, e além da possibilidade de sofrer constrangimentos durante a anamnese ou durante o procedimento de coleta dos dados sócio-demográficos, porém o pesquisador tentará minimizá-los. Os participantes receberão tratamento médico e odontológico especializado para a doença e as condições de saúde serão avaliadas e o Sr. (a) será orientado (a) de acordo com a necessidade de tratamento individual e encaminhado para as devidas clínicas especializadas. Os dados obtidos através dessa pesquisa serão arquivados em computador pessoal do pesquisador responsável e estarão disponíveis por um prazo de até 5 anos.

Forma de acompanhamento e assistência: Os pesquisadores estarão à disposição para quaisquer esclarecimentos adicionais pessoalmente, por fone ou e-mail (contato abaixo).

Garantias: Garantia de esclarecimentos: Os pesquisadores esclarecerão os voluntários quanto a todos os aspectos da pesquisa, antes, durante e após a mesma. Liberdade de recusa à participação ou de retirar o seu consentimento: O Sr. (a) pode escolher não participar de nossa pesquisa, ou desistir da participação, se achar necessário, em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer penalização e sem prejuízo, inclusive do seu atendimento clínico. **Sigilo:** Seus dados pessoais serão mantidos em sigilo. **Ressarcimento e indenização:** Não há

gastos previstos pela participação na pesquisa e, portanto, não há previsão de ressarcimento, com exceção dos indivíduos que serão convocados, que serão ressarcidos pelos gastos referentes ao seu deslocamento. Não há riscos previsíveis pela participação na pesquisa e, portanto, não há previsão de indenização. Você receberá uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Para contato com os pesquisadores: Camila Nunes Carvalho e Prof. Luiz Alcino Gueiros, Rua Engenheiro Vasconcelos Bittencourt, 149, apt. 205, Várzea, Recife-PE, Fone: 81 9950-3786. E-mail: nunes.carvalho.camila@hotmail.com / Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife-PE, Fones: 81 2126-8817. Email: lagueiros@ufpe.br.

Em caso de dúvidas quanto aos seus direitos como voluntário de pesquisa entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do CCS-UFPE (Avenida das Engenharias, s/n, 1º andar, Cidade Universitária, Recife. Fone: 81- 2126-8588).

Eu, _____, RG/CPF/_____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo “Caracterização do polimorfismo genético da resposta Th17 e IL-23 na Síndrome de Sjögren secundária a artrite reumatoide”, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido(a) pelo(a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento.

Recife, ____ de _____ de _____.

Assinatura do Paciente

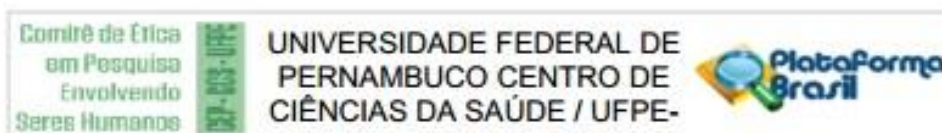
Assinatura do Pesquisador

Assinatura da Testemunha

Assinatura da Testemunha

ANEXOS

ANEXO A - Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: SOROPOSITIVIDADE PARA EBV E CMV EM PORTADORES DE ARTRITE REUMATOIDE E SUA RELAÇÃO COM O DESENVOLVIMENTO DE SÍNDROME DE SJÖGREN SECUNDÁRIA

Pesquisador: Camila Nunes Carvalho

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 46113215.3.0000.5208

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.144.885

Data da Relatoria: 26/08/2015

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um Projeto de pesquisa da Doutoranda Camila Nunes Carvalho apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia UFPE, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Odontologia, com área de concentração em Clínica Integrada, sob a orientação do Prof. Dr. Luiz Alcino Monteiro Gueiros. O estudo visa avaliar se existe associação entre a presença da Síndrome de Sjögren(SS) secundária a AR e a soropositividade ao EBV e CMV, através da identificação desses vírus na saliva e glândulas salivares destes pacientes.

O desenho do estudo é de natureza epidemiológica e observacional, composto por 320 indivíduos de ambos os sexos com idade maior que 18 anos e distribuídos em 2 grupos. O grupo AR será composto por 160 pacientes portadores de artrite reumatóide. Destes, 40 pacientes diagnosticados com Síndrome de

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br

Comitê de Ética
em Pesquisa
Envolvendo
Serres Humanos



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



Continuação do Protocolo: 1.144.885

Sjögren(SS) secundária a AR. O grupo C (Contrôle) será constituído por 160 indivíduos saudáveis pareados por sexo e idade com os pacientes. Os pacientes do grupo AR serão recrutados do Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da UFPE (HC-UFPE) e os do grupo controle no Serviço de Estomatologia da UFPE. A coleta de dados está programada para o período de Agosto de 2015 a Março de 2016.

Os pacientes serão submetidos a um exame clínico e aplicação de um questionário estruturado para obtenção dos dados sócio-demográficos, dados médicos e história da doença atual. Será realizada biópsia de glândulas salivares menores nos pacientes que relatem xerostomia e/ou apresentem fluxo salivar em repouso menor que 0,1 ml/min no momento do exame.

Amostras de sangue serão coletadas para a realização do teste sorológico para detecção de anti-EBV e anti-CMV.

Os seguintes procedimentos serão realizados: Análises histopatológicas das amostras obtidas através de biópsias, Teste de Schirmer – quantificação da produção de lágrima, Dosagem dos anticorpos anti-EBV e anti-CMV no soro, Detecção do DNA do EBV e CMV por PCR

Detecção da presença do EBV e CMV nos tecidos parafinados.

Avaliação da Expressão Gênica nas amostras de glândulas salivares onde tenham sido encontrados EBV e CMV

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral

Avaliar a associação entre a soropositividade para os vírus EBV e CMV e o diagnóstico de SS secundária a AR.

Objetivos específicos

Avaliar a soroprevalência de EBV e CMV em pacientes portadores de artrite reumatoide com e sem SS,

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



Continuação do Parecer: 1.144.885

comparando-a com indivíduos saudáveis;

Correlacionar a soropositividade para EBV e CMV com a sua presença na saliva e soro

Correlacionar a soropositividade para EBV e CMV com os marcadores

clínicos e laboratoriais de AR e SS;

Avaliar a correlação entre a presença do EBV e CMV nas glândulas salivares e soropositividade ao vírus e sua presença na saliva/soro;

Avaliar a correlação entre a presença do EBV e CMV nas glândulas salivares e os marcadores clínicos de AR e SS.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos

O voluntário participante da pesquisa poderá apresentar desconforto leve durante o exame clínico, reações adversas relacionados ao procedimento de biópsia, tais como: alergia ao anestésico, complicações hemorrágicas, complicações pós-operatórias, hematomas e desconfortos durante a coleta de sangue, além da possibilidade de sofrer constrangimentos durante a anamnese.

Benefícios

Os benefícios serão indiretos visto que os voluntários receberão tratamento médico e odontológico especializado para Síndrome de Sjogren secundária a artrite reumatóide, com avaliação das condições de saúde e, de acordo com a necessidade de tratamento individual, serão encaminhados para clínicas especializadas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um projeto cujos resultados poderão contribuir para aprimorar o conhecimento sobre a Síndrome de Sjögren secundária a AR correlacionando com a presença de infecção pelo EBV e CMV

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

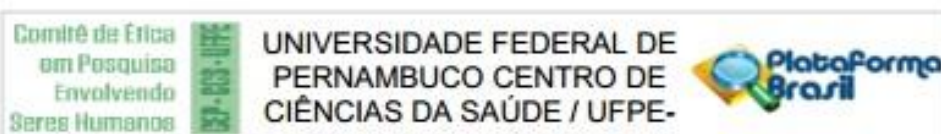
TCLE Redigido de forma clara, contempla as informações sobre os procedimentos da pesquisa.

Folha de Rosto – Adequadamente preenchida

Cartas de anuência dos Serviços de Reumatologia do HC, do Programa de Pós-Graduação em

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-800
UF: PE Município: RECIFE
Telefone: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 1.144.885

Odontologia, Clínica de Estomatologia e Laboratório de Biologia Molecular anexadas.

Curriculum vitae dos pesquisadores anexados

Cronograma – Coleta de dados estimada para o período de Agosto de 2015 a Março 2016.

Orçamento de R\$ 10.000,00 para aquisição de reagentes e materiais para extração de DNA por PCR, realização de testes Elisa, coleta de saliva e amostras de sangue. Não faz referência quanto ao responsável pelos custos.

Recomendações:

Revisar a digitação do Projeto. As frequentes junções de palavras contribui para dificultar a compreensão

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A carta resposta anexada pela pesquisadora atende aos requisitos da pendência gerada quanto ao financiamento da pesquisa.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

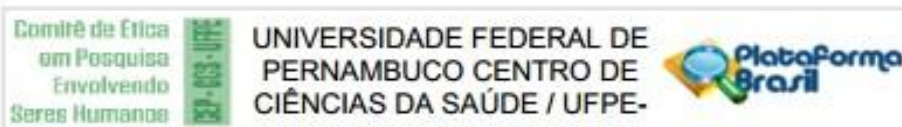
As exigências foram atendidas e o protocolo está APROVADO, sendo liberado para o início da coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio do Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP/CCS/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética relatórios parciais das atividades

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 1.144.885

desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

O CEP/CCS/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

RECIFE, 10 de Julho de 2015

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
 (Coordenador)

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br

ANEXO B - Normas da Revista (Oral Diseases)

1. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

Articles exceeding 7 published pages are subject to a charge of GBP70 per additional page. One published page amounts approximately to 5,500 characters (excluding figures and tables).

1.2. Format

Language: Authors should write their manuscripts in British English using an easily readable style. Authors whose native language is not English should have a native English speaker read and correct their manuscript. Spelling and phraseology should conform to standard British usage and should be consistent throughout the paper. A list of independent suppliers of editing services can be found at http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

Presentation: Authors should pay special attention to the presentation of their findings so that they may be communicated clearly. The background and hypotheses underlying the study as well as its main conclusions should be clearly explained. Titles and abstracts especially should be written in language that will be readily intelligible to any scientist.

Technical jargon: should be avoided as much as possible and clearly explained where its use is unavoidable.

Abbreviations: Oral Diseases adheres to the conventions outlined in Units, Symbols and Abbreviations: A Guide for Medical and Scientific Editors and Authors. Non-standard abbreviations must be used three or more times and written out completely in the text when first used.

1.3. Structure: All papers submitted to *Oral Diseases* should include:

- Title Page
- Structured Abstract (reviews need not include a structured abstract)
- Main text
- References
- (Figures)
- (Figure Legends)
- (Tables)

Title Page: should be part of the manuscript uploaded for review and include:

- A title of no more than 100 characters including spaces
- A running title of no more than 50 characters
- 3-6 keywords
- Complete names and institutions for each author
- Corresponding author's name, address, email address and fax number
- Date of submission (and revision/resubmission)

Abstract: is limited to 200 words in length and should contain no abbreviations. The abstract should be included in the manuscript document uploaded for review as well as separately

where specified in the submission process. The abstract should convey the essential purpose and message of the paper in an abbreviated form set out under:

- Objective(s),
- Subject(s) (or Materials) and Methods,
- Results,
- Conclusions(s).

The Main Text of Original Research Articles should be organised as follows

Introduction: should be focused, outlining the historical or logical origins of the study and not summarize the results; exhaustive literature reviews are inappropriate. It should close with the explicit statement of the specific aims of the investigation.

Materials and Methods must contain sufficient detail such that, in combination with the references cited, all clinical trials and experiments reported can be fully reproduced. As a condition of publication, authors are required to make materials and methods used freely available to academic researchers for their own use. This includes antibodies and the constructs used to make transgenic animals, although not the animals themselves. Other supporting data sets must be made available on the publication date from the authors directly.

(i) Clinical trials: As noted above, these should be reported using the CONSORT guidelines available at www.consort-statement.org. A CONSORT checklist should also be included in the submission material. Clinical trials can be registered in any of the following free, public clinical trials registries: www.clinicaltrials.gov, <http://clinicaltrials.ifpma.org/clinicaltrials/>, <http://isrctn.org/>. As stated in an editorial published in *Oral Diseases* (12:217-218), 2006), all manuscripts reporting results from a clinical trial must indicate that the trial was fully registered at a readily accessible website. The clinical trial registration number and name of the trial register will be published with the paper.

(ii) Experimental subjects: As noted above, experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association Declaration of Helsinki (version 2002) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. Editors reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been used. When experimental animals are used the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort. Experiments should be carried out in accordance with the Guidelines laid down by the National Institute of Health (NIH) in the USA regarding the care and use of animals for experimental procedures or with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in accordance with local laws and regulations.

(iii) Suppliers: Suppliers of materials should be named and their location (town, state/county, country) included.

Results: should present the observations with minimal reference to earlier literature or to possible interpretations.

Discussion: may usually start with a brief summary of the major findings, but repetition of parts of the abstract or of the results sections should be avoided. The section should end with a brief conclusion and a comment on the potential clinical relevance of the findings. Statements and interpretation of the data should be appropriately supported by original references.

Acknowledgements: Should be used to provide information on sources of funding for the research, any potential conflict of interest and to acknowledge contributors to the study that do not qualify as authors. All sources of institutional, private and corporate financial support for the work within the manuscript must be fully acknowledged, and any potential grant holders should be listed. Acknowledgements should be brief and should not include thanks to anonymous referees and editors. Where people are acknowledged, a covering letter demonstrating their consent must be provided.

1.4. References

The journal policy is to encourage references to original papers, not to literature reviews. References in the text should quote the last name(s) of the author(s) and the year of publication (Brown and Smith, 2005). Three or more authors should always be referred to as, for example, Jones et al., 2005.

We recommend the use of a tool such as Reference Manager for reference management and formatting. Reference Manager reference styles can be searched for here: www.refman.com/support/rmstyles.asp

A list of the references must be given at the end of the paper and should follow the recommendations in Units, Symbols and Abbreviations: A Guide for Medical and Scientific Editors and Authors, (1975), p.36. London: The Royal Society of Medicine.

a) The arrangement of the references should be alphabetical by first author's surname.

b) The order of the items in each reference should be:

(i) for journal references:

last name(s) of all the author(s) and their initials, year, title of paper, title of journal, volume number, first and last page numbers.

(ii) for book references:

Name(s) of author(s), year, chapter title, title of book, edition, volume, town of publication, publisher, page number(s).

c) Authors' names should be arranged thus:

Smith AB and Jones DE

d) The year of publication should be surrounded by parentheses: (2005).

e) The title of the paper should be included without quotation marks.

f) The journal title should be abbreviated, should be italicised, and followed by the volume number in bold type and page numbers separated by a dash.

Examples:

Gupta PC, Murti PR, Bhonsle RB, Mehta FS, Pindborg JJ (1995). Effect of cessation of tobacco use on the incidence of oral mucosal lesions in a 10-year study of 12212 users. *Oral Diseases* **1**: 54-58.

Baum BJ, Voutetakis A, Wang J (2004). Salivary glands: novel target sites for gene therapeutics. *Trends Mol Med.* **10**: 585-590.

Shear M and Speight PM (2007). *Cysts of the Oral and Maxillofacial Regions*. Wiley-Blackwell: Oxford.

Scully C (2004). The oral cavity and lips. In: Burns DA, Breathnach SM, Cox N, Griffiths C, eds., *Rooks Textbook of Dermatology*. 7th Edition. Blackwell Science: Oxford, pp.66.1.-66.121.

1.5. Tables, Figures and Figure Legends

Figures: All figures and artwork must be provided in electronic format. Please save vector graphics (e.g. line artwork) in Encapsulated Postscript Format (EPS) and bitmap files (e.g. half-tones) or clinical or in vitro pictures in Tagged Image Format (TIFF).

Detailed information on our digital illustration standards can be found at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>.

Check your electronic artwork before submitting it: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/eachecklist.asp>.

Unnecessary figures and parts (panels) of figures should be avoided: data presented in small tables or histograms, for instance, can generally be stated briefly in the text instead. Figures should not contain more than one panel unless the parts are logically connected.

Figures divided into parts should be labelled with a lower-case, boldface, roman letter, a, b, and so on, in the same type size as used elsewhere in the figure. Lettering in figures should be in lower-case type, with the first letter capitalized. Units should have a single space between the number and unit, and follow SI nomenclature common to a particular field. Unusual units and abbreviations should be spelled out in full or defined in the legend. Scale bars should be used rather than magnification factors, with the length of the bar defined in the legend rather than on the bar itself. In general visual cues (on the figures themselves) are preferred to verbal explanations in the legend (e.g. broken line, open red triangles etc).

2. AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of a paper for publication, the manuscript will be forwarded to the Production Editor who is responsible for the production of the journal.

Proof Corrections

The corresponding author will receive an e-mail alert containing a link to a website. A working e-mail address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site.

Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following website: www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html. This will enable the file to be opened, read on screen, and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be posted if no e-mail address is available; in your absence, please arrange for a colleague to access your e-mail to retrieve the proofs.

Proofs must be returned to the Production Editor within **three days** of receipt.

As changes to proofs are costly, we ask that you only correct typesetting errors. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetting errors, will be charged separately. Other than in exceptional circumstances, all illustrations are retained by the publisher. Please note that the author is responsible for all statements made in their work, including changes made by the copy editor.

Early View (Publication Prior to Print)

Oral Diseases is covered by Wiley-Blackwell's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

Author Services

Online production tracking is available for your article once it is accepted by registering with Wiley-Blackwell's Author Services.