

RUI MEDEIROS JÚNIOR

**AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS GÊNICOS DA PENTRAXINA 3 EM  
INDIVÍDUOS COM ARTRITE REUMATÓIDE E SÍNDROME DE SJOGREN**

Recife

2017

RUI MEDEIROS JÚNIOR

**AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS GÊNICOS DA PENTRAXINA 3 EM  
INDIVÍDUOS COM ARTRITE REUMATÓIDE E SÍNDROME DE SJOGREN**

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: Clínica Integrada.

**Orientador:** Prof. Dr. Luiz Alcino Monteiro Gueiros

Recife

2017

Catálogo na fonte:  
Bibliotecário: Elaine Freitas, CRB4:1790

M488a Medeiros Júnior, Rui  
Avaliação de polimorfismos gênicos da pentraxina 3 em indivíduos com artrite reumatóide e síndrome de Sjogren/ Rui Medeiros Júnior. – Recife, 2017. 49 f.

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. Autoimunidade. 2. Polimorfismo genético. 3. Artrite reumatóide. 4. Síndrome de Sjogren. I. Gueiros, Luiz Alcino Monteiro (orientador). II. Título.

617.6 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2019 - 193)

RUI MEDEIROS JÚNIOR

**AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS GÊNICOS DA PENTRAXINA 3 EM  
INDIVÍDUOS COM ARTRITE REUMATÓIDE E SÍNDROME DE SJOGREN**

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: Clínica Integrada.

Aprovada em: 21/08/2017.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profº. Drº. Luiz Alcino Monteiro Gueiros (Orientador)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Profº. Dr. Angela Luzia Branco Pinto Duarte (Examinador Interno)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Profº. Dr. Gustavo Pina Godoy (Examinador Interno)  
**Universidade Federal de Pernambuco**

---

Profº. Dr. Jair Carneiro Leão (Examinador Interno)  
**Universidade Federal de Pernambuco**

---

Profº. Dr. Rodrigo Feliciano do Carmo (Examinador Externo)  
Universidade Federal do Vale do São Francisco

Dedico esta dissertação primeiramente aos meus queridos pais Rui Medeiros (in memoriam) e Sivlina Dantas Viana Medeiros, que mesmo um pouco distantes fisicamente, me incentivaram e apoiaram desde o momento inicial em que decidi cursar o doutorado. A força e os ensinamentos de fé e perseverança me ajudaram a vencer mais esta etapa da minha vida. Dedico aos meus irmãos, Sarah e Daniel, por fazerem parte da minha vida e sempre me ajudarem direta ou indiretamente. Também dedico a Natália (minha noiva) que sempre me encorajou nos momentos de dúvida e fraqueza.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, por ter me concedido dom da vida e ter me permitido chegar a estes 34 anos com saúde e disposição para enfrentar os desafios de cada dia;

À UFPE, em nome do Reitor Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado; pelo “ambiente” acadêmico privilegiado;

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGOdonto), em nome da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alessandra Albuquerque Tavares de Carvalho; pelo constante incentivo e apoio não só a mim, mas a todos os alunos que compõem o programa;

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), que contribuíram para a minha formação e transmitiram ensinamentos que tornaram possível a realização desta tese;

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo apoio financeiro necessário à concretização dessa trabalho;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Alcino Monteiro Gueiros, pela paciência e por acreditar no meu trabalho e compromisso, mesmo após longos e adversos períodos de intensas tribulações. Sem o apoio deste professor, orientador e amigo seria impossível a concretização desta etapa;

Ao Serviço de Reumatologia da UFPE, em nome da Prof<sup>a</sup>. Dra Ângela Luzia Branco Pinto Duarte, que teve papel fundamental para a realização deste estudo;

Ao Prof. Dr. Rodrigo Feliciano do Carmo, pesquisador do Instituto do Fígado de Pernambuco, pelo grande apoio neste projeto.

Ao Prof. Dr. Luydson Richardson Silva Vasconcelos, pesquisador do Centro de pesquisa Aggeu Magalhães – Recife, pelo ensinamento e acompanhamento de toda a parte laboratorial do estudo;

Agradeço à colega Marília Lins, pelo grande apoio prático e científico;

À todos os funcionários do PPGOdonto da UFPE;

À Oziclere Sena de Araújo (secretária do PPGOdonto), pelo apoio e prontidão relacionada aos assuntos burocráticos e logísticos;

Aos colegas e funcionários que trabalharam comigo no ambulatório de Estomatologia da UFPE, especialmente a Ritinha, Tânia, Guilherme, Eduardo, Thiago, Thayanara e Marina, pelas horas compartilhadas durante a realização da pesquisa e dos atendimentos aos pacientes;

Aos pacientes dos ambulatórios dos serviços de Estomatologia e Reumatologia da UFPE, que tornaram possível o desenvolvimento da pesquisa.

## RESUMO

A pentraxina 3 (PTX3) é uma proteína com importante papel nos processos imunes e inflamatório podendo atuar na fagocitose de microrganismos, modulação da expressão de citocinas e ativação do sistema complemento. Desta forma, o presente estudo objetivou avaliar dois polimorfismos da PTX3 (rs1840680 e rs2305619) em pacientes com artrite reumatóide (AR) e síndrome de Sjogren (SS). Tratou-se de um estudo transversal em que 266 pacientes foram alocados em 3 grupos distintos: portadores de AR (N=117), portadores de AR e SS (N=25) e grupo controle (N=124). Xerostomia, xeroftalmia, fluxo salivar em repouso, teste de Shirmer I, capacidade funcional (Health Assessment Questionnaire – HAQ) e atividade da artrite reumatóide (Disease Activity Score 28 – DAS 28), além da avaliação das frequências genóticas e alélicas foram analisados. Pacientes do grupo AR/SS apresentaram maior valor para o inventário de xerostomia ( $p < 0.0001$ ), menor taxa de fluxo salivar em repouso ( $p < 0.0001$ ), menor valor do teste de Shirmer I ( $p < 0.0001$ ), bem como maior número de articulações edemaciadas ( $p = 0.041$ ). As frequências genóticas do rs1840680 revelaram diferença estatisticamente significativa entre artrite reumatóide, independentemente da associação com a síndrome de Sjogren, e o grupo controle ( $p = 0,008$ ); bem como quando da comparação entre AR e AR/SS ( $p = 0.04$ ). Uma diferença na frequência alélica foi observada entre os grupos AR e AR/SS para rs1840680 ( $p = 0.025$ ), mostrando que o alelo G pode aumentar a susceptibilidade para SS. A associação genotípica do polimorfismo rs1840680 com as características clínicas revelou uma maior frequência do genótipo GA para xerostomia ( $p = 0.045$ ), xeroftalmia ( $p = 0.006$ ), indivíduos com AR (AR e AR/SS:  $p = 0,008$ ) bem como uma frequência mais elevada de GG atrelada à síndrome de Sjogren ( $p = 0.032$ ). Em relação ao polimorfismo rs2305619, notou-se diferença estatística associada a uma maior frequência do genótipo GA ligada a xeroftalmia ( $p = 0.025$ ). Conclui-se, portanto, que este estudo revelou associação positiva entre dois polimorfismos (rs1840680 e rs23056219) da PTX3 e doenças autoimunes como artrite reumatóide e síndrome de Sjogren.

Palavras-chave: Autoimunidade. Polimorfismo genético. Artrite reumatóide. Síndrome de Sjogren.

## ABSTRACT

Pentraxin 3 (PTX3) is a protein with important role in immune and inflammatory processes acting on microorganisms fagocytosis, modulation of cytokine expression and activation of complement system. Thus, this study aimed to evaluate two PTX3's polymorphisms (rs1840680 and rs2305619) in patients with rheumatoid arthritis (RA) and Sjogren's syndrome (SS). It was a cross-sectional study and 266 patients were allocated in 3 distinct groups: RA patients (N=117), RA and SS patients (N=25) and control group (N=124). Xerostomia, xerophthalmia, resting salivary flow, Shirmer I test, functional capacity (Health Assessment Questionnaire – HAQ) and RA activity (Disease Activity Score 28 – DAS 28), besides genotypic and allelic frequencies evaluation were analyzed. Subjects in the RA/SS group had higher values for xerostomia inventory ( $p < 0.0001$ ), lower resting salivary flow rate ( $P < 0.0001$ ), lower values of the Shirmer I test ( $p < 0.0001$ ), and higher number of swollen joints ( $p = 0.041$ ). Genotypic frequencies of rs1840680 showed significant association between rheumatoid arthritis, regardless of association with Sjogren's syndrome, compared to control group ( $p = 0.008$ ); as well as comparing RA and RA/SS ( $p = 0.04$ ). A significant allele frequency difference was observed between RA and RA/SS groups for rs1840680 ( $p = 0.025$ ), showing that G allele may increase the SS susceptibility. The genotypic association of rs1840680 polymorphism with clinical characteristics revealed a higher frequency of the GA genotype for xerostomia ( $p = 0.045$ ), xerophthalmia ( $p = 0.006$ ), patients with RA (RA and RA/SS:  $p = 0.008$  as well as higher GG levels frequency linked to Sjogren's syndrome ( $p = 0.032$ ). About rs2305619 polymorphism was observed a statistical difference associated with higher GA frequency to xerophthalmia ( $p = 0.015$ ). In conclusion, this study revealed a positive association between PTX3 polymorphisms (rs1840680 and rs23056219) and autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis and Sjogren's syndrome.

Keywords: Autoimmunity. Genetic polymorphism. Rheumatoid arthritis. Sjogren's syndrome.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>13</b>
<b>2.1</b>	<b>Considerações éticas</b>	<b>13</b>
<b>2.2</b>	<b>Delineamento e polulação do estudo</b>	<b>13</b>
<b>2.3</b>	<b>Critérios de inclusão e exclusão</b>	<b>13</b>
2.3.1	Portadores de AR e SS	13
2.3.2	Grupo controle	14
<b>2.4</b>	<b>Coleta de dados e instrumentos da pesquisa</b>	<b>14</b>
2.4.1	Xerostomia	14
2.4.2	Xeroftalmia	14
2.4.3	Fluxo salivar	15
2.4.4	Capacidade funcional	15
2.4.5	Estado geral e fadiga em indivíduos com AR e AR/SS	16
2.4.6	Atividade da doença	16
2.4.7	Coleta de sangue	16
2.4.8	Extração de DNA e genotipagem	16
2.4.9	Análise estatística	17
<b>3</b>	<b>RESULTADOS – ARTIGO CIENTÍFICO</b>	<b>18</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>34</b>
	<b>APÊNDICE A — Termo de Consentimento Livre Esclarecido</b>	<b>39</b>
	<b>APÊNDICE B — Questionário da pesquisa</b>	<b>42</b>
	<b>ANEXO A — Health Assessment Questionnaire</b>	<b>45</b>
	<b>ANEXO B — Disease Activity Score 28</b>	<b>46</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A artrite reumatóide (AR) é uma desordem sistêmica crônica inflamatória de caráter autoimune, progressiva, de etiologia incerta, caracterizada classicamente por poliartrite periférica e simétrica associada à rigidez matinal e fadiga.<sup>1,2</sup> A doença acomete 1 a 3% da população adulta, em uma faixa etária entre 35 e 45 anos de idade, estando o gênero feminino predominantemente envolvido.<sup>3,4</sup>

Embora uma maior prevalência seja observada em indivíduos adultos, as manifestações clínicas podem iniciar-se em qualquer idade e de forma variável, desde sinais e sintomas brandos e de menor duração, até uma poliartrite progressiva e destrutiva.<sup>5</sup> Assim, a AR pode apresentar um envolvimento articular caracterizado por edema, dor, rubor, alterações morfológicas deletérias de articulações sinoviais (metacarpo e metatarsosfalangianas, tornozelos, punhos, dentre outras); bem como acometimento extra-articular, acarretando em vasculite, nódulos reumatóides, anormalidades renais, cardíacas, musculares, hepáticas, hipossalivação, xerostomia, dentre outras manifestações, podendo também levar a um maior risco de desenvolvimento da Síndrome de Sjogren (SS) associada.<sup>2,6</sup>

De forma semelhante, a SS apresenta-se como uma doença sistêmica inflamatória crônica, também de natureza autoimune, que acomete progressivamente glândulas exócrinas, podendo culminar com quadros importantes de xerostomia e/ou xeroftalmia, afetando diretamente a qualidade de vida dos indivíduos.<sup>7,8</sup> Mundialmente, acomete 0,3 a 0,6% da população sendo as mulheres 10 a 20 vezes mais afetadas que os homens<sup>9</sup> principalmente entre a quarta e quinta década de vida. A doença pode ser classificada em primária (SSp) ou secundária (SSs) quando há associação com outras doenças do sistema conjuntivo, incluindo AR, lúpus eritematoso sistêmico (LES) e esclerose sistêmica (ES); sendo a AR a mais prevalente (4 a 31%).<sup>10,11,12</sup> Clinicamente, os portadores da SS normalmente exibem sinais e sintomas orais e oculares significativos, envolvimento cutâneo e de mucosas oral, nasal e/ou genital, podendo apresentar fadiga, linfadenopatia, cirrose biliar primária, nefrite intersticial, fibrose pulmonar, vasculites e neuropatias periféricas<sup>7</sup>; sendo os achados orofaciais extremamente relevantes para o diagnóstico e evolução da doença.

De uma maneira geral as doenças autoimunes podem ser moduladas por auto-anticorpos circulantes, imunocomplexos, linfócitos T auto-reativos, dentre outros fatores. Por isso, atualmente, alguns grupos de genes, linhagens de células T como Th1, Th2 e Th17, citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-6, IL-17), bem como moléculas envolvidas na resposta imune, como a da pentraxina 3 – PTX3, têm sido alvo de importantes pesquisas.<sup>13,14,15</sup>

As pentraxinas (PTXs) formam uma superfamília de proteínas conservadas filogeneticamente desde os aracnídeos até os mamíferos que desempenham importante função relacionada ao sistema imune, principalmente na resposta inata<sup>16,17</sup>, processos inflamatórios, infecciosos, bem como na fertilidade feminina e, de acordo com a estrutura primária, podem ser classificadas em PTXs de cadeia curta (proteína C reativa – PCR e proteína amilóide sérica – PAS) ou longa (PTX3, PTX4, PTX neuronais 1 e 2).<sup>18,19</sup> A PTX3, primeira pentraxina de cadeia longa identificada na década de 1990<sup>15</sup>, é uma glicoproteína composta por 381 aminoácidos incluindo um segmento de 17 aminoácidos correspondentes ao peptídeo sinal<sup>16,17</sup> e, diferentemente das PTXs de cadeia curta que são originadas no tecido hepático principalmente em resposta à interleucina-6, é produzida e liberada por uma gama de tipos celulares após ativação; em particular por macrófagos, fibroblastos, células dendríticas e endoteliais em resposta a sinais inflamatórios, tais como IL-1 e TNF- $\alpha$ .<sup>20</sup>

A PTX3 pode ainda ser expressa por monócitos circulantes no sangue periférico após estimulação por componentes microbianos (fungos, bactérias e vírus) como lipopolissacarídeos (LPS); sofrendo também influência de glicocorticóides, prostaglandinas e vitamina D3.<sup>15,18</sup> Desta forma, a PTX3 parece funcionar como importante biomarcador ligado ao diagnóstico e prognóstico de doença cardiovascular, pulmonar, patologias renais, articulares, autoimunes, bem como neoplasias e infecções.<sup>19,20</sup> Apesar dessa proteína de cadeia longa apresentar forte ligação com a imunidade inata, geralmente havendo uma resposta amplificada do padrão inflamatório reacional, ela também aparenta modular, através da via clássica do sistema complemento, a imunidade adquirida resultando, por exemplo, no aumento dos níveis de C3 e C4 para auxiliar na remoção de imunocomplexos do sangue.<sup>21</sup>

O gene da PTX3, identificado inicialmente em células endoteliais humanas provenientes de cordão umbilical tratadas com IL1 $\beta$ , está localizado no cromossomo 3 entre os mamíferos, organizado em três éxons separados por dois íntrons. Os dois primeiros éxons codificam o peptídeo sinal e a porção amino-terminal (N-terminal), enquanto o terceiro codifica o domínio C-terminal<sup>22</sup> e alguns de seus polimorfismos (rs1840680, rs2305619, rs3816527, rs3845978) têm demonstrado associação com desordens infecciosas, neoplásicas e autoimunes.<sup>22,23</sup> Raros são os estudos publicados que relacionam a PTX3 com doenças autoimunes e, quase todos revelam associação direta entre os níveis séricos da proteína com uma maior susceptibilidade para o desenvolvimento dessas doenças. Outros trabalhos fazem também referência à PTX3 como biomarcadores inflamatórios tentando associá-la à co-morbidades como aterosclerose, obesidade e neoplasias, entretanto alguns resultados mostram-se inconclusivos, inconsistentes e duvidosos.<sup>17,24,25,26,27,28</sup>

Assim, em virtude da atual relação entre a PTX3 e condições autoimunes, associado ao fato de já haver estudo correlacionando alguns de seus polimorfismos (rs1840680 e rs2305619) com outras patologias<sup>29</sup> na população brasileira, bem como da inexistência de trabalhos que discorram a cerca de genes polimorfos em pacientes com AR e/ou SS, a presente pesquisa objetivou avaliar dois polimorfismos (rs1840680 e rs2305619) da PTX3 nestes grupos de pacientes correlacionando as características clínicas e genotípicas.

## **2 METODOLOGIA**

### **2.1 Considerações éticas**

Este estudo foi submetido para avaliação junto ao Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Federal de Pernambuco (CEP-UFPE) e aprovado sob CCAE 43281015.5.0000.5208. Todos os pacientes concordaram em participar da pesquisa através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE - APÊNDICE 1).

### **2.2 Delineamento e população do estudo**

Tratou-se de um estudo transversal com amostra consecutiva e de conveniência, obtida no período de março a novembro de 2014, composta por 266 indivíduos. Dentre os participantes, 117 apresentaram diagnóstico de artrite reumatóide (AR: N=117), 25 exibiam AR e síndrome de Sjogren (AR/SS: N=25) e 124 foram aqueles que se declararam saudáveis compondo o grupo controle (C: N=124). Todos os indivíduos dos grupos caso foram provenientes do Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE) e todos os do grupo controle foram oriundos do Serviço de Estomatologia da UFPE.

O diagnóstico de AR foi baseado nos critérios determinados pelo Colégio Americano de Reumatologia<sup>30</sup> e o diagnóstico da SS estabelecido através dos critérios do Colégio Americano-Europeu de Consenso.<sup>31</sup> Todos os pacientes diagnosticados com AR que apresentaram sintomas orais e/ou oculares foram submetidos à investigação para SS.

### **2.3 Critérios de inclusão e exclusão**

#### **2.3.1 Portadores de AR e SS**

Considerou-se como elegíveis para o estudo todos os indivíduos adultos, de ambos os gêneros, a partir de 18 anos completos, com diagnóstico de AR e/ou AR associada à SS. Foram excluídos os 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.

### 2.3.2 Grupo controle

Foram incluídos os indivíduos que se declararam saudáveis, acima de 18 anos completos e de ambos os gêneros. Foram excluídos aqueles que cursavam com qualquer manifestação oral inflamatória/infecciosa, tabagistas, diabéticos e em uso de drogas anticolinérgicas.

## 2.4 Coleta de dados e instrumentos da pesquisa

Inicialmente, para todos os participantes, foi aplicado um questionário estruturado para obtenção dos dados sócio-demográficos, médicos e história da doença atual. Posteriormente, seguiu-se a avaliação da xerostomia, xeroftalmia, fluxo salivar (realizadas sempre pelo mesmo pesquisador – APÊNDICE 2), coleta sanguínea, extração de DNA e genotipagem.

### 2.4.1 Xerostomia

A xerostomia foi avaliada utilizando-se o inventário de xerostomia (Thomsom, et al.)<sup>32</sup> validado em português (da Mata, et al.).<sup>33</sup> O instrumento é composto por onze itens avaliados através da escala de Likert, variando de 1 a 5 cada item. A soma total das respostas (nunca = 1, quase nunca = 2, ocasionalmente = 3, quase sempre = 4, sempre = 5) dos pacientes pôde variar de 11 a 55. Os valores mais altos correspondem a uma percepção mais pronunciada da xerostomia.

### 2.4.2 Xeroftalmia

Além do questionário referente aos sintomas oculares, para a investigação da xeroftalmia foi aplicado o teste de Shirmer I (APENDICE 2) objetivando avaliar o grau de lubrificação ocular (secreção basal e reflexa). Este teste consistiu na instalação de uma tira de papel filtro padronizado (Whatman 41) de 5mm de largura

e 35mm de comprimento, com uma dobra a 5mm da extremidade; no terço lateral da borda palpebral inferior em contato com a conjuntiva. Após 5 minutos as tiras foram removidas e a quantificação da produção de lágrima foi feita pela medição da extensão do papel que ficou úmido. Valores menores ou iguais a 5mm são considerados anormais, ou seja, lubrificação ocular insuficiente.<sup>34</sup>

#### 2.4.3 Fluxo salivar

A coleta de saliva para avaliação do fluxo salivar em repouso (FSR) foi realizada através da obtenção da saliva total não-estimulada. O exame foi realizado no período da tarde, entre 14:00 e 17:00h, em que 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 mesmos foram instruídos a levar a cabeça suavemente para frente, fazer uma deglutição inicial e então deixar toda a saliva escorrer da boca em um recipiente plástico milimetrado durante um período de 15 minutos. Considerou-se reduzido o nível de secreção < 1,5 ml em 15 minutos (Satomura, et al.).<sup>28</sup>

#### 2.4.4 Capacidade funcional

A capacidade funcional foi determinada utilizando o Health Assessment Questionnaire (HAQ – ANEXO 1). O instrumento foi desenvolvido por Fries, et al.,<sup>35</sup> traduzido e validado para o português por Ferraz, et al.,<sup>36</sup> servindo para avaliar o estado funcional dos portadores de AR ao detectar o nível de dificuldade dos mesmos em realizar atividades rotineiras do dia a dia, bem como a necessidade de assistência para realizá-las. Para cada uma das oito categorias (vestimenta e presença física, acordar, alimentar-se, andar, higiene, alcance, pegada, outras atividades), o paciente indicou o grau de dificuldade em quatro possíveis respostas que poderiam ser desde “nenhuma dificuldade = 0” até “incapaz de fazê-lo = 3”. A pontuação de cada categoria foi o resultado mais alto de qualquer um dos seus itens. A pontuação final do HAQ foi determinada pela média da pontuação das oito categorias.

#### 2.4.5 Estado geral e fadiga em indivíduos com AR e AR/SS

Escalas visuais analógicas (APÊNDICE 1), variando de 0 a 100mm, para verificar a auto-percepção do estado geral (EVA-EG) e a fadiga na semana anterior (EVA-F) também foram utilizadas como instrumentos avaliativos (Apêndice 2).<sup>37</sup>

#### 2.4.6 Atividade da doença

A atividade da artrite reumatóide foi avaliada através do Disease Activity Score 28 (DAS 28) em um programa de computação (ANEXO 2). O DAS 28 engloba a avaliação de 28 articulações distintas e considera o número de articulações dolorosas e edemaciadas, a velocidade de hemossedimentação (VSH) ou proteína C reativa (PCR) como marcador inflamatório; além da análise global da saúde ou atividade da doença feita pelo médico assistente em uma escala de 0 a 100.<sup>38</sup> Desta forma, o paciente pôde ser enquadrado em quatro categorias: em remissão (valor menor que 2,6), atividade leve (maior ou igual a 2,6 e menor ou igual a 3,2), atividade moderada (maior que 3,2 e menor ou igual a 5,1) e atividade intensa (maior que 5,1).

#### 2.4.7 Coleta de sangue

A coleta do sangue venoso de todos os pacientes foi realizada por um pesquisador treinado em flebotomia, sempre respeitando os princípios de biossegurança, sendo coletados 10ml (tubo de coleta BD Vacutainer®) por paciente.

#### 2.4.8 Extração de DNA e genotipagem

O DNA das amostras foi extraído a partir de sangue total (EDTA) com kit QIAamp Mini Spin Columns (QIAGEN Inc, Chatsworth, CA), seguindo as instruções do fabricante. O DNA extraído foi armazenado a -20°C até nova análise. As reações de genotipagem de PTX3 rs1840680 (Ensaio: C\_\_12069244\_10) e rs2305619 (Ensaio: C\_\_22275654\_10) foram realizadas em máquina de PCR em tempo real (7500 Real Time PCR System – AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA) utilizando o sistema TaqMan.

Os casos não genotipados foram reavaliados em novas reações. Os não reagentes nas duas reações foram excluídos da pesquisa. Uma percentagem de 10% da amostra foi testada em dois momentos distintos para se checar a concordância do método, não sendo observada discordância em nenhum caso.

#### 2.4.9 Análise Estatística

Os dados foram armazenados em computador no programa SPSS Statistics v.17.0. O teste Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para verificação da distribuição normal das variáveis contínuas. Comparações entre dois grupos foram realizadas com o teste Mann-Whitney. Para comparações entre mais de dois grupos, Kruskal-Wallis foi aplicado. A existência de associações entre variáveis categóricas foi avaliada pelos testes Qui-quadrado de Pearson e exato de Fisher. As diferenças foram consideradas significativas para valores de  $p < 0,05$ . A magnitude destas associações foi estimada como Odds ratios (OR), utilizando intervalos de confiança de 95%.

### 3. RESULTADOS - ARTIGO CIENTÍFICO

De acordo com as normas do periódico The Journal of Rheumatology

#### PTX3 GENE POLIMORPHISM EVALUATION IN RHEUMATOID ARTHRITIS AND SJOGREN'S SYNDROME PATIENTS

Rui Medeiros Júnior

Prof. Dr. Luiz Alcino Monteiro Gueiros

*Pós-Graduação Odontologia – Universidade Federal de Pernambuco*

#### **Abstract**

**Objective:** Evaluate two PTX3's polymorphisms (rs1840680 and rs2305619) in patients with rheumatoid arthritis and Sjogren's syndrome, correlating genotypic and allelic frequencies with clinical characteristics. **Methods:** This was a cross-sectional study with a consecutive and convenience sample consisting of 266 patients allocated in three different groups: RA patients (N=117), RA and SS (N=25) and control group (N=124). Xerostomia, xerophthalmia, resting salivary flow, Shirmer I test, functional capacity (Healyh Assessment Questionnaire – HAQ), RA activity (Disease Activity Score 28 - DAS 28), besides genotypic and allelic evaluation were investigated. **Results:** AR/SS patients group got higher xerostomia inventory values ( $p<0.0001$ ), lower resting salivary flow rate ( $p<0.0001$ ), lower value of Shirmer I test ( $p<0.0001$ ), as well as higher number of swollen joints ( $p=0.041$ ). rs1840680 genotypic frequencies revealed a significant association between rheumatoid arthritis, regardless of association with Sjogren's syndrome, and the control group ( $p=0.008$ ). Likewise, about RA and RA/SS comparing, there was also a difference ( $p=0.04$ ). The rs1840680 polymorphisms genotypic association with clinical characteristics showed a higher frequency of the GA genotype for xerostomia ( $p=0.045$ ), xerophthalmia ( $p=0.006$ ), rheumatoid arthritis subjects (RA and RA/SS:  $p=0.008$ ) and higher GG frequency associated with Sjogren's syndrome ( $p=0.032$ ).

Regarding rs2305619 polymorphism, was noticed statistical difference linked to a higher GA frequency with xerophthalmia ( $p=0.015$ ). **Conclusion:** This study revealed the first association between two PTX3's polymorphisms (rs1840680 and rs23056219) and diseases such as rheumatoid arthritis and Sjogren's syndrome.

Keywords: Autoimmunity. Genetic polymorphism. Rheumatoid arthritis. Sjogren's syndrome.

## 1 INTRODUÇÃO

A artrite reumatóide (AR) é uma desordem sistêmica crônica inflamatória de caráter autoimune, progressiva, de etiologia incerta, caracterizada classicamente por poliartrite periférica e simétrica associada à rigidez matinal e fadiga.<sup>1,2</sup> A doença acomete 1 a 3% da população adulta, em uma faixa etária entre 35 e 45 anos de idade, estando o gênero feminino predominantemente envolvido.<sup>3,4</sup>

Embora uma maior prevalência seja observada em indivíduos adultos, as manifestações clínicas podem iniciar-se em qualquer idade e de forma variável, desde sinais e sintomas brandos e de menor duração, até uma poliartrite progressiva e destrutiva.<sup>5</sup> Assim, a AR pode apresentar um envolvimento articular caracterizado por edema, dor, rubor, alterações morfológicas deletérias de articulações sinoviais (metacarpo e metatarsofalangianas, tornozelos, punhos, dentre outras); bem como acometimento extra-articular, acarretando em vasculite, nódulos reumatóides, anormalidades renais, cardíacas, musculares, hepáticas, hipossalivação, xerostomia, dentre outras manifestações, podendo também levar a um maior risco de desenvolvimento da Síndrome de Sjogren (SS) associada.<sup>2,6</sup>

De forma semelhante, a SS apresenta-se como uma doença sistêmica inflamatória crônica, também de natureza autoimune, que acomete progressivamente glândulas exócrinas, podendo culminar com quadros importantes de xerostomia e/ou xeroftalmia, afetando diretamente a qualidade de vida dos indivíduos.<sup>7,8</sup> Mundialmente, acomete 0,3 a 0,6% da população, sendo as mulheres 10 a 20 vezes mais afetadas que os homens,<sup>9</sup> principalmente entre a quarta e quinta década de vida. A doença pode ser classificada em primária (SSp) ou secundária (SSs) quando há associação com outras doenças do sistema conjuntivo, incluindo AR, lúpus eritematoso sistêmico (LES) e esclerose sistêmica (ES); sendo a AR a mais prevalente (4 a 31%).<sup>10,11,12</sup> Clinicamente, os portadores da SS normalmente exibem sinais e sintomas orais e oculares significativos, envolvimento cutâneo e de mucosas oral, nasal e/ou genital, podendo apresentar fadiga, linfadenopatia, cirrose biliar primária, nefrite intersticial, fibrose pulmonar, vasculites e neuropatias periféricas<sup>7</sup>; sendo os achados orofaciais extremamente relevantes para o diagnóstico e evolução da doença.

De uma maneira geral, as doenças autoimunes podem ser moduladas por auto-anticorpos circulantes, imunocomplexos, linfócitos T auto-reativos, dentre outros fatores. Por isso, atualmente, alguns grupos de genes, linhagens de células T como Th1, Th2 e Th17, citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-6, IL-17), bem como moléculas envolvidas na resposta imune, como a da pentraxina 3 – PTX3, têm sido alvo de importantes pesquisas.<sup>13,14,15</sup>

As pentraxinas (PTXs) formam uma superfamília de proteínas que desempenham importante função relacionada ao sistema imune, principalmente na resposta inata<sup>16,17</sup>, processos inflamatórios, infecciosos, bem como na fertilidade feminina e, de acordo com a estrutura primária, podem ser classificadas em PTXs de cadeia curta (proteína C reativa – PCR e proteína amilóide sérica – PAS) ou longa (PTX3, PTX4, PTX neuronais 1 e 2).<sup>18,19</sup> A PTX3, primeira pentraxina de cadeia longa identificada na década de 1990<sup>15</sup>, é uma glicoproteína composta por 381 aminoácidos incluindo um segmento de 17 aminoácidos correspondentes ao peptídeo sinal.<sup>16,17</sup> e, diferentemente das PTXs de cadeia curta que são originadas no tecido hepático principalmente em resposta à interleucina-6, é produzida e liberada por uma gama de tipos celulares após ativação; em particular por macrófagos, fibroblastos, células dendríticas e endoteliais em resposta a sinais inflamatórios, tais como IL-1 e TNF- $\alpha$ .<sup>20</sup>

A PTX3 pode ainda ser expressa por monócitos circulantes no sangue periférico após estimulação por componentes microbianos (fungos, bactérias e vírus) como lipopolissacarídeos (LPS); sofrendo também influência de glicocorticóides, prostaglandinas e vitamina D3.<sup>15,18</sup> Desta forma, a PTX3 parece funcionar como importante biomarcador ligado ao diagnóstico e prognóstico de doença cardiovascular, pulmonar, patologias renais, articulares, autoimunes, bem como neoplasias e infecções.<sup>19,20</sup> Apesar dessa proteína de cadeia longa apresentar forte ligação com a imunidade inata, geralmente havendo uma resposta amplificada do padrão inflamatório reacional, ela também aparenta modular, através da via clássica do sistema complemento, a imunidade adquirida resultando, por exemplo, no aumento dos níveis de C3 e C4 para auxiliar na remoção de imunocomplexos do sangue.<sup>21</sup>

O gene da PTX3 está localizado no cromossomo 3, organizado em três éxons separados por dois íntrons. Os dois primeiros éxons codificam o peptídeo sinal e a

porção amino-terminal (N-terminal), enquanto o terceiro codifica o domínio C-terminal<sup>22</sup> e alguns de seus polimorfismos (rs1840680, rs2305619, rs3816527, rs3845978) têm demonstrado associação com desordens infecciosas, neoplásicas e autoimunes.<sup>22,23</sup> Raros são os estudos publicados que relacionam a PTX3 com doenças autoimunes e, quase todos revelam associação direta entre os níveis séricos da proteína com uma maior susceptibilidade para o desenvolvimento dessas doenças. Outros trabalhos fazem também referência à PTX3 com biomarcadores inflamatórios tentando associá-la à co-morbidades como aterosclerose, obesidade e neoplasias, entretanto alguns resultados mostram-se inconclusivos, inconsistentes e duvidosos.<sup>17,24,25,26,27,28</sup> Assim, em virtude da atual relação entre a PTX3 e condições autoimunes, associado ao fato de já haver estudo correlacionando alguns de seus polimorfismos (rs1840680 e rs2305619) com outras patologias<sup>29</sup> na população brasileira, bem como da inexistência de trabalhos que discorram a cerca de genes polimorfos em pacientes com AR e/ou SS, a presente pesquisa objetivou avaliar dois polimorfismos (rs1840680 e rs2305619) da PTX3 nestes grupos de pacientes correlacionando as características clínicas e genotípicas.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 Considerações éticas

Este estudo foi submetido para avaliação junto ao Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Federal de Pernambuco (CEP-UFPE) e aprovado sob CCAE 43281015.5.0000.5208. Todos os pacientes concordaram em participar da pesquisa através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE - APÊNDICE 1).

### 2.2 Delineamento e população do estudo

Tratou-se de um estudo transversal com amostra consecutiva e de conveniência, obtida no período de março a novembro de 2014, composta por 266 indivíduos. Dentre os participantes, 117 apresentaram diagnóstico de artrite reumatóide (AR: N=117), 25 exibiam AR e síndrome de Sjogren (SS: N=25) e 124 foram aqueles que se declararam saudáveis (C: N=124). Todos os indivíduos dos grupos caso foram provenientes do Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE) e todos os do grupo controle foram oriundos do Serviço de Estomatologia da UFPE.

O diagnóstico de AR foi baseado nos critérios determinados pelo Colégio Americano de Reumatologia<sup>30</sup> e o diagnóstico da SS estabelecido através dos critérios do Colégio Americano-Europeu de Consenso.<sup>31</sup> Todos os pacientes diagnosticados com AR que apresentaram sintomas orais e/ou oculares foram submetidos à investigação para SS.

### 2.3 Critérios de inclusão e exclusão

#### 2.3.1 Portadores de AR e SS

Considerou-se como elegíveis para o estudo todos os indivíduos adultos, de ambos os gêneros, a partir de 18 anos completos, com diagnóstico de AR e/ou AR associada à SS. Foram excluídos os 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.

### 2.3.2 Grupo controle

Foram incluídos os indivíduos que se declararam saudáveis, acima de 18 anos completos e de ambos os gêneros. Foram excluídos aqueles que cursavam com qualquer manifestação oral inflamatória/infecciosa, tabagistas, diabéticos e em uso de drogas anticolinérgicas.

## 2.4 Coleta de dados e instrumentos da pesquisa

Inicialmente, para todos os participantes, foi aplicado um questionário estruturado para obtenção dos dados sócio-demográficos, médicos e história da doença atual. Posteriormente, seguiu-se a avaliação da xerostomia, xeroftalmia, fluxo salivar (realizadas sempre pelo mesmo pesquisador – APÊNDICE 2), coleta sanguínea, extração de DNA e genotipagem.

### 2.4.1 Xerostomia

A xerostomia foi avaliada utilizando-se o inventário de xerostomia<sup>32</sup> validado em português.<sup>33</sup> O instrumento é composto por onze itens avaliados através da escala de Likert, variando de 1 a 5 cada item. A soma total das respostas (nunca = 1, quase nunca = 2, ocasionalmente = 3, quase sempre = 4, sempre = 5) dos pacientes pôde variar de 11 a 55. Os valores mais altos correspondem a uma percepção mais pronunciada da xerostomia.

### 2.4.2 Xeroftalmia

Além do questionário referente aos sintomas oculares, para a investigação da xeroftalmia foi aplicado o teste de Shirmer I (APÊNDICE 2) objetivando avaliar o grau de lubrificação ocular (secreção basal e reflexa). Este teste consistiu na instalação de uma tira de papel filtro padronizado (Whatman 41) de 5mm de largura

e 35mm de comprimento, com uma dobra a 5mm da extremidade; no terço lateral da borda palpebral inferior em contato com a conjuntiva. Após 5 minutos as tiras foram removidas e a quantificação da produção de lágrima foi feita pela medição da extensão do papel que ficou úmido. Valores menores ou iguais a 5mm são considerados anormais, ou seja, lubrificação ocular insuficiente.<sup>34</sup>

#### 2.4.3 Fluxo salivar

A coleta de saliva para avaliação do fluxo salivar em repouso (FSR) foi realizada através da obtenção da saliva total não-estimulada. O exame foi realizado no período da tarde, entre 14:00 e 17:00h, em que 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 mesmos foram instruídos a levar a cabeça suavemente para frente, fazer uma deglutição inicial e então deixar toda a saliva escorrer da boca em um recipiente plástico milimetrado durante um período de 15 minutos. Considerou-se reduzido o nível de secreção < 1,5 ml em 15 minutos.<sup>28</sup>

#### 2.4.4 Capacidade funcional

A capacidade funcional foi determinada utilizando o Health Assessment Questionnaire (HAQ – ANEXO 1). O instrumento foi desenvolvido por Fries, et al.,<sup>35</sup> traduzido e validado para o português por Ferraz, et al.,<sup>36</sup> servindo para avaliar o estado funcional dos portadores de AR ao detectar o nível de dificuldade dos mesmos em realizar atividades rotineiras do dia a dia, bem como a necessidade de assistência para realizá-las. Para cada uma das oito categorias (vestimenta e presença física, acordar, alimentar-se, andar, higiene, alcance, pegada, outras atividades), o paciente indicou o grau de dificuldade em quatro possíveis respostas que poderiam ser desde “nenhuma dificuldade = 0” até “incapaz de fazê-lo = 3”. A pontuação de cada categoria foi o resultado mais alto de qualquer um dos seus itens. A pontuação final do HAQ foi determinada pela média da pontuação das oito categorias.

#### 2.4.5 Estado geral e fadiga em indivíduos com AR e AR/SS

Escalas visuais analógicas (APÊNDICE 1), variando de 0 a 100mm, para verificar a auto-percepção do estado geral (EVA-EG) e a fadiga na semana anterior (EVA-F) também foram utilizadas como instrumentos avaliativos (Apêndice 2).<sup>37</sup>

#### 2.4.6 Atividade da doença

A atividade da artrite reumatóide (AR) foi avaliada através do Disease Activity Score 28 (DAS 28) em um programa de computação (ANEXO 2). O DAS 28 engloba a avaliação de 28 articulações distintas e considera o número de articulações dolorosas e edemaciadas, a velocidade de hemossedimentação (VSH) ou proteína C reativa (PCR) como marcador inflamatório; além da análise global da saúde ou atividade da doença feita pelo médico assistente em uma escala de 0 a 100.<sup>38</sup> Desta forma, o paciente pôde ser enquadrado em quatro categorias: em remissão (valor menor que 2,6), atividade leve (maior ou igual a 2,6 e menor ou igual a 3,2), atividade moderada (maior que 3,2 e menor ou igual a 5,1) e atividade intensa (maior que 5,1).

#### 2.4.7 Coleta de sangue

A coleta do sangue venoso de todos os pacientes foi realizada por um pesquisador treinado em flebotomia, sempre respeitando os princípios de biossegurança, sendo coletados 10ml (tubo de coleta BD Vacutainer®) por paciente.

#### 2.4.8 Extração de DNA e genotipagem

O DNA das amostras foi extraído a partir de sangue total (EDTA) com kit QIAamp Mini Spin Columns (QIAGEN Inc, Chatsworth, CA), seguindo as instruções do fabricante. O DNA extraído foi armazenado a -20°C até nova análise. As reações de genotipagem de PTX3 rs1840680 (Ensaio: C\_\_12069244\_10) e rs2305619 (Ensaio: C\_\_22275654\_10) foram realizadas em máquina de PCR em tempo real

(7500 Real Time PCR System – AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA) utilizando o sistema TaqMan.

Os casos não genotipados foram reavaliados em novas reações. Os não reagentes nas duas reações foram excluídos da pesquisa. Uma porcentagem de 10% da amostra foi testada em dois momentos distintos para se checar a concordância do método, não sendo observada discordância em nenhum caso.

#### 2.4.9 Análise Estatística

Os dados foram armazenados em computador no programa SPSS Statistics v.17.0. O teste Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para verificação da distribuição normal das variáveis contínuas. Comparações entre dois grupos foram realizadas com o teste Mann-Whitney. Para comparações entre mais de dois grupos, Kruskal-Wallis foi aplicado. A existência de associações entre variáveis categóricas foi avaliada pelos testes Qui-quadrado de Pearson e exato de Fisher. As diferenças foram consideradas significativas para valores de  $p < 0,05$ . A magnitude destas associações foi estimada como Odds ratios (OR), utilizando intervalos de confiança de 95%.

## RESULTADOS

### Pacientes e características clínicas

Duzentos e sessenta e seis indivíduos, com idade média de 53.1 anos, sendo 23 homens e 243 mulheres, foram incluídos no estudo e alocados em três grupos: pacientes com artrite reumatóide (AR, n=117), artrite reumatóide e síndrome de Sjogren (AR/SS, n=25), bem como os que se declararam saudáveis (C, n=124). Em relação aos pacientes com artrite reumatóide (AR e/ou AR/SS) e os controles, aqueles do grupo AR/SS apresentaram maior valor para o inventário de xerostomia ( $p<0,0001$ ), menor taxa de fluxo salivar em repouso ( $p<0,0001$ ), menor valor do teste de Schirmer I ( $p<0,0001$ ), bem como maior número de articulações edemaciadas ( $p=0,041$ ) (Tabela 1).

Tabela 1. Características clínicas da amostra e instrumentos avaliativos

Características clínicas	Média (desvio padrão)			p-valor
	AR (n=117)	AR/SS (n= 25)	C (n= 124)	
Idade (anos)	52.8 ( $\pm 11.5$ )	54.7 ( $\pm 10.5$ )	53.2 ( $\pm 11.7$ )	0,872
Gênero (feminino/masculino)	111/6	24/1	108/16	0,076
Inventário de xerostomia	21.9 ( $\pm 9.8$ )	29.2 ( $\pm 11.4$ )	19.1 ( $\pm 7.7$ )	<b>&lt;0,0001*</b>
Fluxo salivar em repouso (ml/min)	0.40 ( $\pm 0.29$ )	0.06 ( $\pm 0.08$ )	0.37 ( $\pm 0.31$ )	<b>&lt;0,0001*</b>
Teste de Schirmer (mm/min)	8.5 ( $\pm 9.0$ )	2.1 ( $\pm 1.8$ )	12.7 ( $\pm 12.2$ )	<b>&lt;0,0001*</b>
Duração da doença (anos)	9.0 ( $\pm 7.4$ )	10.6 ( $\pm 10.5$ )	-	0,862
Número de articulações dolorosas	6.8 ( $\pm 9.0$ )	10.3 ( $\pm 11.2$ )	-	0,920
Número de articulações edemaciadas	1.8 ( $\pm 3.9$ )	2.9 ( $\pm 3.6$ )	-	<b>0,041**</b>
EVA-EG (Estado Geral)	52.1 ( $\pm 32.6$ )	53.6 ( $\pm 30.0$ )	-	0,494
EVA-F (Fadiga)	49.0 ( $\pm 35.2$ )	51.4 ( $\pm 38.6$ )	-	0,862
Health Assessment Questionnaire (HAQ)	1.2 ( $\pm 0.9$ )	1.0 ( $\pm 0.9$ )	-	0,653
Disease Activity Score 28 (DAS 28)	4.2 ( $\pm 1.7$ )	4.5 ( $\pm 2.0$ )	-	0,643
Remissão (< 2.6)	36	5	-	
Atividade leve ( $\geq 2.6$ até $\leq 3.2$ )			-	
Atividade moderada ( $> 3.2$ até $\leq 5.1$ )	81	19	-	0,460
Atividade intensa ( $> 5.1$ )			-	

\* Teste de Kruskal-Wallis

\*\* Teste de Mann-Whitney

Ainda, pacientes com AR/SS apresentaram maior tempo médio de duração da doença ( $10.6 \pm 10.5$  x  $9.0 \pm 7.4$ ,  $p=0.862$ ) e capacidade funcional semelhante aos

indivíduos do grupo AR ( $p=0.653$ ). A presença de SS não influenciou a atividade da AR ( $p=0.653$ ), e as escalas visuais analógicas do estado geral e de fadiga mostraram valores médios semelhantes (EVA-EG: AR –  $52.1\pm 32.6$ ; AR/SS –  $53.6\pm 30.0$  e EVA-F: AR -  $49.0\pm 35.2$ ; AR/SS –  $51.4\pm 38.6$ ), sem revelar diferença estatística (Tabela 1).

### Distribuições genóticas e alélicas dos polimorfismos da PTX-3

Amostras de DNA de 260 indivíduos foram genotipadas para o polimorfismo rs1840680 (5 amostras de AR e 1 do grupo AR/SS não foram avaliadas) e 264 para o polimorfismo rs2305619 (2 amostras do grupo AR foram excluídas), perfazendo um total de 524 reações. As frequências genóticas do rs1840680 revelaram diferença estatisticamente significativa entre artrite reumatóide, independentemente da associação com a síndrome de Sjogren, e o grupo controle (AR = GG:30/27%, GA: 64/57%, AA: 18/16%; AR/SS = GG: 13/54%, GA: 09/38%, AA: 02/08%; C = GG: 57/46%, GA: 43/35%, AA: 24/19%;  $p=0,008$ ); bem como quando da comparação entre AR e AR/SS ( $p=0,04$ ). A presença do genótipo GG revelou uma maior susceptibilidade para a síndrome de Sjogren. Uma diferença significativa da frequência alélica foi observada entre os grupos AR e AR/SS para rs1840680 (AR = G: 124/55%, A: 100/45%; AR/SS = G: 35/73%, A: 27/13%;  $p=0,015$ ) e a presença do alelo G indicou um aumento na susceptibilidade para SS (Tabela 2).

Tabela 2. Frequências genóticas e alélicas dos polimorfismos de PTX3

PTX3	Genótipo	AR (n/%)	AR/SS (n/%)	C (n/%)	p-value <sup>1</sup>	OR (IC95%)	p-value <sup>2</sup>	OR (IC95%)
1840680	GG	30(27)	13(54)	57(46)	<b>0,008</b>	-	<b>0,040</b>	
	GA	64(57)	09(38)	43(35)				
	AA	18(16)	02(08)	24(19)				
	<b>TOTAL</b>	<b>112(100)</b>	<b>24(100)</b>	<b>124(100)</b>				
Freq Alélica (1840680)	A	100(45)	13(27)	91(37)	0,258	NS	<b>0,025</b>	2,17 1,1-4,36
	G	124(55)	35(73)	157(63)				
	<b>TOTAL</b>	<b>224(100)</b>	<b>48(100)</b>	<b>248(100)</b>				
2305619	GG	22(19)	07(28)	40(32)	0,094	-	0,472	-
	GA	59(51)	13(52)	52(42)				
	AA	34(30)	5(20)	32(26)				
	<b>TOTAL</b>	<b>115(100)</b>	<b>25(100)</b>	<b>124(100)</b>				
Freq Alélica (2305619)	A	127(55)	23(46)	116(47)	0,119	NS	0,236	-
	G	103(45)	27(54)	132(53)				
	<b>TOTAL</b>	<b>230(100)</b>	<b>50(100)</b>	<b>248(100)</b>				

Teste qui-quadrado de Pearson

p-value<sup>1</sup>: AR+AR/SS x C

p-value<sup>2</sup>: AR x AR/SS

Relação entre os polimorfismos (rs1840680 / rs2305619) e as características clínicas

A associação genotípica do polimorfismo rs1840680 com as características clínicas revelou uma maior frequência do genótipo GA para xerostomia (47/40.5%;  $p=0,045$ ) e xeroftalmia (48/41.4%;  $p=0,006$ ). Em relação ao polimorfismo rs2305619, notou-se diferença estatisticamente significativa atrelada a uma maior frequência de GA ligada a xeroftalmia (47/37.9%;  $p=0,015$ ) (Tabela 3).

Tabela 3. Genótipos dos polimorfismos e características clínicas

Variável	rs1840680					valor de p	rs2305619					valor de p		
	GG		GA		AA		GG		GA		AA			
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%		
<b>Gênero</b>														
▪ Masculino	9	9	9	7.8	5	11.4	0.737 <sup>A</sup>	6	8.5	12	9.7	5	7.2	0.936 <sup>A</sup>
▪ Feminino	91	91	107	92.2	39	88.6		65	91.5	112	90.3	64	92.8	
<b>Total</b>	100	100	116	100	44	100		71	100	124	100	69	100	
<b>FSR</b>														
▪ Positivo	23	23.2	14	12.1	9	20.5	0.09 <sup>B</sup>	14	20.6	22	17.7	11	15.5	0.735 <sup>B</sup>
▪ Negativo	76	76.8	102	87.9	35	79.5		54	79.4	102	82.3	60	84.5	
<b>Total</b>	99	100	116	100	44	100		68	100	124	100	71	100	
<b>Teste Shirmer</b>														
▪ Positivo	37	37.4	41	35.7	18	40.9	0.828 <sup>B</sup>	25	36.2	45	36.6	27	38.6	0.951 <sup>B</sup>
▪ Negativo	62	62.6	74	64.3	26	59.1		44	63.8	78	63.4	43	61.4	
<b>Total</b>	99	100	115	100	44	100		69	100	123	100	70	100	
<b>DAS28</b>														
▪ <2.0 (remissão)	8	18.6	12	16.7	6	30	0.405 <sup>B</sup>	6	20.7	10	14.1	10	25.6	0.316 <sup>B</sup>
▪ ≥2.0 (atividade)	35	81.4	60	83.3	14	70		23	79.3	61	85.9	29	74.4	
<b>Total</b>	43	100	72	100	20	100		29	100	71	100	39	100	
<b>Xerostomia</b>														
▪ Positivo	28	28.0	47	40.5	10	22.7	0.045 <sup>B</sup>	18	26.1	46	37.1	20	28.2	0.215 <sup>B</sup>
▪ Negativo	72	72.0	69	59.5	34	77.3		51	73.9	78	62.9	51	71.8	
<b>Total</b>	100	100	116	100	44	100		69	100	124	100	71	100	
<b>Xeroftalmia</b>														
▪ Positivo	26	26	48	41.4	8	18.2	0.006 <sup>B</sup>	19	26.8	47	37.9	15	21.7	0.015 <sup>B</sup>
▪ Negativo	74	74	68	58.6	36	81.8		52	73.2	77	62.1	54	78.3	
<b>Total</b>	100	100	116	100	44	100		71	100	124	100	69	100	
<b>HAQ</b>														
▪ Incapacidade leve	20	46.5	30	42.9	13	65.0	0.215 <sup>B</sup>	11	37.9	31	44.9	24	61.5	0.116 <sup>B</sup>
▪ Incapacidade Moderada-grave	23	53.5	40	57.1	7	35.0		18	62.1	38	55.1	15	38.5	
<b>Total</b>	43	100	70	100	20	100		29	100	69	100	39	100	

A: Teste exato de Fisher

B: Teste qui-quadrado de Pearson

## DISCUSSÃO

Estudos relacionados às doenças autoimunes são, de uma maneira geral, de grande valia em virtude dos sérios problemas morfofuncionais e psicossociais que geralmente mostram-se associados a este grupo de enfermidades, tendo importante impacto na qualidade de vida dos pacientes. Neste contexto a pentraxina 3 tem sido alvo de pesquisas recentes e indivíduos com artrite reumatóide parecem apresentar, muitas vezes, níveis séricos mais elevados dessa proteína.<sup>14,23,29</sup> Esta investigação em particular avaliou a relação de dois polimorfismos gênicos (rs1840680 e rs2305619) da PTX3 com características clínicas da AR e a associação com a síndrome de Sjogren. Pacientes com SS apresentaram maiores valores para o inventário de xerostomia, fluxo salivar em repouso reduzido e teste de Shirmer I positivo. Ambos os polimorfismos avaliados mostraram relação com AR e SS, e o alelo G, bem como o genótipo GG (para rs184060), apontaram para uma maior chance de desenvolvimento da SS. Desta forma, o presente estudo revelou a primeira evidência da associação entre dois polimorfismos (rs1840680 e rs2305619) da PTX3 e condições como AR e SS.

Foram incluídos neste trabalho um total de 266 pacientes, divididos em três grupos distintos (AR: n=117, AR/SS: n=25 e C: n=124) e, de acordo com os parâmetros clínicos, observou-se diferença estatisticamente significativa relacionada ao número de articulações edemaciadas, inventário de xerostomia, fluxo salivar em repouso e teste de Shirmer I. Assim, estas manifestações articulares e extra-articulares ligadas aos portadores de AR e SS corroboram com os achados clínicos clássicos das doenças secundárias à inflamação dos tecidos sinoviais, edema, deformidade e comprometimento de glândulas salivares e lacrimais.<sup>2,7,12,39</sup> A prevalência da SS em pacientes com AR pode variar de 4 a 31%<sup>12</sup> dependendo de condições como critérios de diagnóstico, nacionalidade dos indivíduos, bem como dos testes utilizados e, independentemente destes parâmetros, os portadores da síndrome podem evoluir com uma apresentação mais agressiva e um pior prognóstico da doença.<sup>40,41</sup> Além disso, e de acordo com os resultados ora apresentados, estudos têm sugerido associações entre quadros de hipossalivação, xerostomia, xeroftalmia, maior número de articulações dolorosas, edemaciadas, bem como escores mais elevados do HAQ em indivíduos que evoluem simultaneamente

com AR e SS.<sup>42,43</sup> Embora não tenha sido observada diferença estatística entre atividade de doença entre pacientes com AR e AR/SS, a maioria dos indivíduos evoluiu com atividade moderada/intensa da doença; evidenciando a necessidade de uma terapia mais enérgica que consiga associar fármacos remitentes, seguindo protocolos adequados com o intuito de diminuir a incidência de prejuízo estrutural e a conservação das funções fisiológicas dos pacientes.<sup>44</sup>

PTX3 é o protótipo das pentraxinas de cadeia longa podendo ser expressa por diferentes linhagens de células como macrófagos, neutrófilos, células endoteliais, fibroblastos, células da musculatura lisa, bem como células epiteliais em várias circunstâncias; principalmente quando há envolvimento de componentes inflamatórios.<sup>45</sup> Trabalhos evidenciam que os níveis plasmáticos desta proteína, caracterizada como sendo de fase aguda, encontram-se elevados durante a inflamação e sua produção a partir de células vasculares endoteliais em resposta a mediadores como IL-2, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , parece representar um importante papel na imunidade humoral mostrando relação direta com processos inflamatórios e imunológicos.<sup>46,47</sup> Assim, avaliações dos seus níveis séricos, dosagens nos fluidos de articulações sinoviais, bem como sua detecção em sinoviócitos, têm apontado para um real envolvimento da PTX3 na patogenia de algumas doenças autoimunes como AR, espondilite anquilosante, esclerose sistêmica e esclerose múltipla.<sup>17,25,27,38</sup>

Diferentemente das pentraxinas de cadeia curta, o gene da PTX3 manteve sua sequência altamente conservada durante a evolução, localizando-se no cromossomo 3 entre os mamíferos<sup>22</sup>; havendo poucos estudos relacionando alguns de seus polimorfismos com a susceptibilidade para diferentes doenças. Assim o gene humano da PTX3 consiste em alguns polimorfismos conhecidos como rs23056219, rs1840680, rs3845978, rs35948036, rs6788044, rs2614 e rs3816527.<sup>22,23,48</sup> Os mesmos polimorfismos (rs23056219 e rs1840680) citados na presente pesquisa também foram estudados por Barbati et al. (2012), com o propósito de investigar a relação dos níveis séricos dessa proteína com a predisposição para infarto agudo do miocárdio<sup>49</sup>; não sendo revelada diferença entre a associação. Diferentemente, outros estudos mostraram associação positiva entre estes mesmos alelos e a susceptibilidade para infecções causadas por *Mycobacterium tuberculosis* e *Pseudomonas aeruginosa*.<sup>22,50</sup> Ainda neste contexto, Carmo et al. (2016) também relataram existir uma correlação entre os níveis séricos

de PTX3 (rs2305619 – genótipo AA) e carcinoma hepatocelular em indivíduos infectados com o vírus da hepatite C.<sup>29</sup>

Para ambos os polimorfismos aqui estudados, o alelo G é considerado o selvagem. Desta forma, diante das variações das frequências genotípicas apresentadas, houve diferença estatística entre os grupos caso (AR e AR/SS) e controle, bem como entre os grupos AR e AR/SS relacionados ao nucleotídeo rs1840680; sendo, para os pacientes do grupo caso, o genótipo GA aquele polimorfo mais associado à presença de AR e o genótipo GG o mais ligado à SS. Estudos anteriores revelaram haver associação entre polimorfismos como rs2305619 (genótipo AA) e rs3816527 (genótipo CC) e o aumento dos níveis séricos de PTX3 em pacientes com infarto agudo do miocárdio, transplantados pulmonares, bem como portadores de neoplasias malignas.<sup>38,51</sup> Por outro lado, Zhang & Ding<sup>18</sup> (2016) não encontraram associação importante entre rs2305619 e o risco de desenvolvimento para espondilite anquilosante. Mesmo diante dos resultados por ora encontrados alguns aspectos limitadores devem ser considerados como a falta de um grupo composto apenas por portadores da SS, a não mensuração dos níveis séricos de PTX3, bem como o fato de se tratar de um estudo transversal não conseguindo-se avaliar o risco para desenvolvimento de AR e/ou SS associado aos genes polimorfos.

Assim, este estudo indicou a primeira associação entre dois polimorfismos (rs1840680 e rs23056219) da PTX3 e doenças autoimunes como artrite reumatóide e síndrome de Sjogren. Os pacientes dos grupo caso apresentaram maior valor para o inventário de xerostomia, menor taxa de fluxo salivar em repouso, menor valor do teste de Shirmer I e maior número de articulações edemaciadas. A presença do genótipo GG e do alelo G revelou um aumento na susceptibilidade para SS ligada ao gene polimorfo rs1840680 e uma maior frequência do genótipo GA foi relacionada ao quadro de xeroftalmia atrelada ao polimorfismo rs2305619. Diante desse contexto, novos estudos se fazem necessários para uma melhor elucidação do real papel dos polimorfismos da PTX3 na patogênese, susceptibilidade e curso clínico da artrite reumatóide e síndrome de Sjogren.

## REFERENCIAS

1. Pinto MRC, Miguel RCC, Rezende GG. Rheumatoid arthritis treatment. *Rev Bras Reumatol* 2006;46:219-223.
2. Goeldner I, Skare TS, Reason TM, Utiyama RR. Rheumatoid arthritis: a current view. *J Bras Patol Med Lab* 2011;47(5):495-503.
3. Baldini C, Talarico R, Tzioufas AG, Bombardieri S. Characteristics of Sjogren's syndrome in rheumatoid arthritis: a critical review. *J Autoimmun* 2012;39:9-14.
4. Venables PJ, Maini RN. Clinical features of rheumatoid arthritis. In: JM Greene, Ed *UpToDate*. Rio de Janeiro, Brazil: Artes Médicas 2008;357-364.
5. Hochberg MC, Johnston SS, John AK. The incidence and prevalence of extra-articular and systemic manifestations in a cohort of newly-diagnosed patients with rheumatoid arthritis between 1999 and 2006. *Curr Med Res Opin* 2008;24:496-480.
6. Montenegro R, Rocha A. Extra-articular manifestations of rheumatoid arthritis. *Temas Reumatol Clin* 2009;10:74-83.
7. Tzioufas AG, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM. Pathogenesis of Sjogren's syndrome: what we know and what we should learn. *J Autoimmun* 2012;39:4-8.
8. Jonsson R, Vogelsang P, Volchenkov R, Espinosa A, Wahren-Herlenius M, Appel S. The complexity of Sjogren's syndrome: novel aspects on pathogenesis. *Immunol Lett* 2011;141:1-9.
9. Seror R, Theander E, Bootsma H, Bowman SJ, Tzioufas A, Gottenberg JE, Ramos-Casals M, Doner T, Ravaud P, Mariette X, Vitali C. Outcome measures for primary Sjogren's syndrome: a comprehensive review. *J Autoimmun* 2014;51:51-56.
10. Mavragani CP, Moutsopoulos HM. Conventional therapy of Sjogren's syndrome. *Crit Ver Allerg Immunol* 2007;32:284-291.
11. Roescher N, Tak PP, Illei GG. Cytokines in Sjogren's syndrome: potential therapy targets. *Ann Rheum Dis* 2010;69:945-948.
12. Ramos-Casals M, Brito-Zerón P, Font J. The overlap of Sjogren's syndrome with other systemic autoimmune diseases. *Semin Arthritis Rheum* 2007;36:246-255.

13. Souza TR, Carvalho AAT, Duarte AP, Porter SR, Leão, JC, Gueiros LAM. Th1 and Th2 polymorphisms in Sjogren's syndrome and rheumatoid arthritis. *J Oral Pathol Med* 2014;43(6):418-426.
14. Carvalho CM, Carmo RF, Duarte ALP, Carvalho AAT, Leão JC, Gueiros LAM. IL-17A and IL-17F polymorphisms in rheumatoid arthritis and Sjogren's syndrome. *Clin Oral Invest* 2016;20(3):495-502.
15. Bottazzi B, Doni A, Garlanda C, Mantovani A. An integrated view of humoral innate immunity: pentraxins as a paradigm. *Annu Rev Immunol* 2010;28:157-183.
16. Moalli F, Jaillon S, Inforzato A, Sironi M, Bottazzi B, Mantovani A, Garlanda C. Pathogen recognition by the long pentraxin PTX3. *J Biomed Biotechnol* 2011;6:1-15.
17. Huang X, Zhang L, Duan Y, Wang Y, Wang J. Association of Pentraxin 3 with autoimmune disease: a systematic review and meta-analysis. *Arch Med Res* 2016;47:223-231.
18. Zhang X, Ding W. association of genetic variants in pentraxin 3 gene with ankylosing spondylitis. *Med Sci Monit* 2016;22:2911-2916.
19. Kunes P, Holubcova Z, Kolackova M, Krejsek J. Pentraxin 3 (PTX 3): an endogenous modulator of the inflammatory response. *Mediators Inflamm* 2012;5:1-10.
20. Balhara J, Koussih L, Zhang J, Gounni AS. Pentraxin 3: an immuno-regulator in the lungs. *Front Immunol* 2013;4:127-134.
21. Inforzato A, Doni A, Barajon I, Leone R, Garlanda C, Bottazzi B, Mantovani A. PTX3 as a paradigm for the interaction of pentraxins with the complement system. *Semin Immunol* 2013;25:79-85.
22. Olesen R, Wejse C, Velez DR, Bisseye C, Sodemann M, Aaby P, Rabna P, Worwui A, Chapman H, Diatta M, Adegbola RA, Hill PC, Ostergaard L, Williams SM, Sirugo G. DC-SIGN (CD209), pentraxin 3 and vitamin D receptor gene variants associate with pulmonary tuberculosis risk in West Africans. *Genes Immun* 2007;8(6):456-467.
23. Chiarini M, Sabelli C, Melotti P, Garlanda C, Savoldi G, Mazza C, Padoan R, Plebani A, Mantovani A, Notarangelo LD, Assael BM, Badolato R. ptx genetic

variations affect the risk of pseudomonas aeruginosa airway colonization in cystic fibrosis patients. *Genes Immun* 2010;11:665-670.

24. Luchetti MM, Piccinini G, Mantovani A, Peri G, Matteucci C, Pompino G, Fratini M, Fraticelli P, Sambo P, Di Loreto C, Doni A, Inrona M, Gabrielli A. Expression and production of long pentraxin PTX3 in rheumatoid arthritis (RA). *Clin Exp Immunol* 2000;119:196-202.

25. Deyab G, Hokstad I, Whist JE, Smastuen MC, Agewall S, Lyberg T, Bottazzi B, Meroni PL, Leone R, Hjeltnes G, Hollan I. Anti-rheumatic treatment is not associated with reduction of pentraxin 3 in rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis and ankylosing spondylitis. *Plos One* 2017;22:1-14.

26. Kahlow BS, Petisco R, Skare TL, Goeldner I, Nisihara RM, Messias-Reason IJT. Serum pentraxin 3 levels are negatively associated with carotid intima media thickness in non-obese rheumatoid arthritis patients. *Int J Cardiol* 2016;221:298-301.

27. Mabrouk MM, Ghazy MA, Hassan TM. Serum pentraxin 3 and interleukin-6 are associated with subclinical atherosclerosis in recent-onset rheumatoid arthritis. *Egypt J Immunol* 2010;17(1):87-99.

28. Satomura, K, Torigoshi T, Koga T, Maeda Y, Izumi Y, Jiuchi Y, et al. Serum amyloid A (SAA) induces pentraxin 3 (PTX3) production in rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* 2013;23:28-35.

29. Carmo RF, Aroucha D, Vasconcelos LRS, Pereira LMMB, Moura P, Cavalcanti MSM. Genetic variation in PTX3 and plasma levels associated with hepatocellular carcinoma in patients with HCV. *J Viral Hepat* 2016;23:116-122.

30. Arnett FC, et al. The american rheumatism association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31(3):315-324.

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

32. Thomson WN, Chalmers JM, Spencer AJ, Williams SM. The xerostomia inventory: a multi-item approach to measuring dry mouth. *Community Dent Health* 1999;16:12-7.

44. Carbacho MI, Dapuetto JJ. Avaliação da capacidade funcional e da qualidade de vida de pacientes com artrite reumatóide. *Rev Bras Reumatol* 2010;50(1):31-43.
45. Garlanda C, Bottazzi B, Bastone A, Mantovani A. Pentraxins at the crossroads between innate immunity inflammation, matrix deposition and female fertility. *Annu Immunol* 2005;23:337-366.
46. Mantovani A, Garlanda C, Bottazzi B, Peri G, Doni A, Martinez de la Torre Y, et al. The long pentraxin PTX3 in vascular pathology. *Vascul Pharmacol* 2006;45:326-330.
47. Zandifar A, Iraj N, Taheriun M, Tajaddini M, Javanmard SH. Association of the long pentraxin PTX3 gene polymorphism (rs3816527) with migraine in an Iranian population. *J Neurol Sci* 2015;349:185-189.
48. Cieslik P, Hrycek A. Long pentraxin 3 (PTX3) in the light of its structure, mechanism of action and clinical implications. *Autoimmunity* 2012;45:119-128.
49. Barbati E, Specchia C, Vilella M, Rossi ML, Bariera S, Bottazzi B, et al. Influence of pentraxin 3 (PTX3) genetic variant on myocardial infarction risk and PTX3 plasma levels. *Plos One* 2012;7:e53030.
50. May L, Kuningas M, van Bodegom D, Meij HJ, Frolich M, Slagboom PE, et al. Genetic variation in pentraxin (PTX) 3 gene associates with PTX3 production and fertility in women. *Biol Reprod* 2010;82:299-304.
51. Diamond JM, Meyer NJ, Feng R, et al. Variation in PTX3 is associated with primary graft dysfunction after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;186:546-552.

33. da Mata AD, Marques DNS, Freitas FN, Amaral JPAR, Trindade RT, Barcelos FA, et al. Translation, validation, and construct reliability of a portuguese version of the xerostomia inventory. *Oral Dis* 2012;18(3):293-8.
34. Kim M, Kim HS, Na KS. Correlation between tear osmolarity and other ocular surface parameters in primary Sjogren's Syndrome. *Korean J Ophtalmol* 2017;31(1):25-31.
35. Fries JF, Spitz P, Kraines RG, Holman HR. Measurement of patient outcome in arthritis. *Arthritis Rheum* 1980;23(2):137-45.
36. Ferraz MB, Oliveira LM, Araujo PM, Atra E, Tugwell P. Crosscultural reliability of the physical ability dimension of the health assessment questionnaire. *J Rheumatol* 1990;17(6):813-7.
37. Pincus T, Sokka T. Quantitative measures for assessing rheumatoid arthritis in clinical trials and clinical care. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2003;17(5):753-781.
38. van der Heijde DM, van 't Hof MA, van Riel PL, Theunisse LA, Lubberts EW, van Leeuwen MA, van Rijswijk MH, van de Putte LB. Judging disease activity in clinical practice in rheumatoid arthritis: first step in the development of a disease activity score. *Ann Rheum Dis* 1990;49(11):916-920.
39. Weitoft T, Larsson A, Saxne T, Manivel VA, Lysholm J, Knight A, Ronnelid J. Pentraxin 3 in serum and synovial fluido f patients with rheumatoid arthritis with and without autoantibodies.
40. Smith HS, Smith AR, Seidner P. Painful rheumatoid arthritis. *Pain Physician* 2011;14:427-458.
41. Young A, Koduri G, Extra-articular manifestations and complications of rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2007;21:907-927.
42. Silva ML, Carvalho CN, Carvalho AAT, Leão JC, Duarte ALP, Gueiros LA. Effect of xerostomia on the functional capacity of subjects with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2016;20:1-6.
43. Uhlig T, Kvien TK, Jensen JL, Axell T. Sicca symptoms, saliva and tear production, and disease variables in 636 patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1999;58:415-422.

## APÊNDICE A — Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) (PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS – Resolução 466/12)

Convidamos o(a) Sr.(a) para participar como voluntário(a) da pesquisa AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS GÊNICOS DA PENTRAXINA 3 EM INDIVÍDUOS COM ARTRITE REUMATÓIDE E SÍNDROME DE SJOGREN, que está sob responsabilidade do(a) pesquisador(a) Rui Medeiros Júnior, Av. Prof. Moraes Rego, s/s, CEP: 50670-901, Recife-PE – (81) 98686-4999, [ruijrbmf@hotmail.com](mailto:ruijrbmf@hotmail.com) (inclusive ligações à cobrar). Também participam desta pesquisa os(as) pesquisadores(as) Marília Lins e Silva (81) 99783-1115, Camila Nunes Carvalho (81) 99950-3786, sob a orientação do Prof. Dr. Luiz Alcino Monteiro Gueiros (81) 99138-1637 ([laqueiros@gmail.com](mailto:laqueiros@gmail.com)).

Caso este TCLE contenha informações que não lhe sejam compreensível, as dúvidas podem ser esclarecidas com a pessoa que está lhe entrevistando e apenas ao final, quando todos os esclarecimentos forem dados, caso concorde com a realização do estudo pedimos que rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que se apresenta em duas vias; em que uma via lhe será entregue e a outra ficará com o pesquisador responsável.

Caso não concorde não haverá penalização, bem como será possível retirar o consentimento a qualquer momento, também sem qualquer penalidade.

### INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

Justificativa e objetivos: Através deste estudo e de estudos futuros decorrentes deste, poderemos compreender melhor os mecanismos da Síndrome de Sjogren secundária (SSs) a Artrite Reumatóide (AR). Este estudo visa avaliar polimorfismos da PTX-3 (rs1840680 e rs2305619) em pacientes portadores de AR e SS.

Informações/procedimentos: Será realizado um **questionário** para obtenção dos dados relativos ao seu nome, endereço e história clínica da doença. O Sr(a) passará por um **exame clínico** da boca para determinar a quantidade de saliva 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 relativo ao procedimento cirúrgico. Será feita uma coleta 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, serão coletados 10ml por punção da veia do braço. Será realizado, também, um teste para determinar a **produção de lágrima**, onde será colocado no Sr(a) uma fita especial de papel na pálpebra inferior de cada olho por 5 minutos. Não há **métodos alternativos** existentes para a obtenção da informação desejada desta pesquisa.

Desconfortos, riscos previsíveis e benefícios esperados: Os pacientes submetidos à pesquisa poderão correr o risco de, durante o exame clínico, se sentirem constrangidos devido às perguntas sobre a sua história médica. Os voluntários podem apresentar hematoma pós-coleta de sangue periférico (coletado da veia do braço) e/ou dor durante a injeção da agulha. Estes acontecimentos também poderão ser contornados através da experiência do profissional especializado que fará a coleta. A quantidade de sangue a ser coletada será de 10ml. Além disso, poderão ocorrer reações não esperadas relacionadas ao procedimento da biópsia, tais como: alergia ao anestésico local, sangramento e desconforto pós-operatório. Alguns pacientes também poderão sentir um desconforto leve durante o teste de produção da lágrima. Essas situações serão minimizadas pela experiência do examinador, que fará o seu exame em local apropriado (Ambulatório de Reumatologia do Hospital das Clínicas e Clínica de Estomatologia da UFPE) e estará sob a orientação do professor responsável. Vale ressaltar que todos os procedimentos serão realizados respeitando os critérios de biossegurança necessários. Em relação aos benefícios esperados, os pacientes diagnosticados com a Síndrome de Sjogren poderão ser acompanhados no tratamento da “secura bucal”. O atendimento clínico será realizado pelo pesquisador responsável. Caso necessitem de tratamento odontológico serão orientados(a) a procurar o Serviço de Odontologia da UFPE.

Forma de acompanhamento e assistência: Todas as informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo; sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa serão arquivados no computador pessoal do pesquisador responsável e estarão disponíveis pelo período de no mínimo 5 anos, no endereço acima citado. Os pesquisadores estarão à disposição para quaisquer esclarecimentos adicionais pessoalmente, por telefone ou email (contato acima).

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 desta pesquisa, ou desistir da participação se achar necessário, em qualquer fase da mesma; sem qualquer penalização e sem prejuízo, inclusive do seu atendimento clínico.

Sigilo: Seus dados pessoais serão mantidos em sigilo.

Ressarcimento e indenização: Nada lhe será pago e nem será cobrado para participar da pesquisa, pois a aceitação é voluntária, mas fica também garantida a indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa; conforme decisão judicial ou extra-judicial. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação).

Você receberá uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: Av da Engenharia, s/n – primeiro andar, sala 4 – Cidade Universitária, Recife/PE, CEP: 50740-600, tel: (81) 2126-8588 – email: [cepccs@ufpe.br](mailto:cepccs@ufpe.br).

---

Assinatura do pesquisador

#### CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO(A)

Eu, \_\_\_\_\_,  
CPF \_\_\_\_\_, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS GÊNICOS DA PENTRAXINA 3 EM INDIVÍDUOS COM ARTRITE REUMATÓIDE E SÍNDROME DE SJOGREN, 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 da minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção) do meu acompanhamento/assistência/tratamento.

Loca e data \_\_\_\_\_

Assinatura do participante: \_\_\_\_\_

<p>Impressão Digital (Opcional)</p>
---

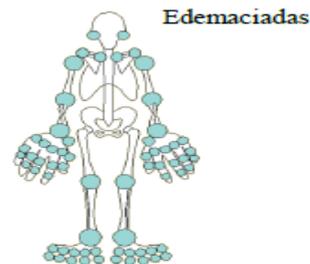
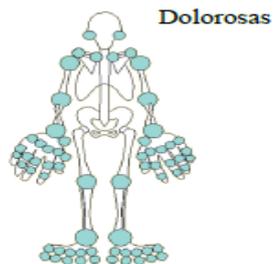
Presenciamos a solicitação do consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar. (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores)

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

## APÊNDICE B — QUESTIONÁRIO DA PESQUISA

### 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?			
<b>EVA paciente:</b>			
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		
<b>Fadiga:</b>			
Com relação ao cansaço, indique como você tem se sentindo nesta última semana:			
_____		_____	
Muito bem		Muito mal	
Score:	mm		



Exames	Resultado	Data
VHS (1h)		
PCR		
Fator reumatóide (método)		
FAN		
Anti-CCP		
Anti-Ro		
Anti-La		
Tratamento		
<b>AINH Droga:</b>	<b>Dose:</b>	<b>Início:</b>
Prednisona	dose	Data de início
Cloroquina	dose	Data de início
Hidroxicloroquina	dose	Data de início
Metotrexate	dose	Data de início
Leflunomida	dose	Data de início
Sulfassalazina	dose	Data de início
<b>Anti-TNF início:</b>	<b>Droga:</b>	<b>Dose:</b>
		Tempo:
<b>Vitamina D</b>	dose:	Data de início:
<b>Carbonato de cálcio</b>	dose:	Data de início:
<b>Bifosfonato</b>	dose:	Data de início:
<b>Outros:</b>		Tempo:

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:	
<b>Exame Oral</b>	Lesão: 1. Sim 2 –Não	Cárie:
Candidose: 1. Sim 2 –Não	Língua despapilada: 1. Sim 2 –Não	

#### Questionário de xerostomia

- Sinto minha boca seca  
 Nunca  Quase nunca  ocasionalmente  quase sempre  sempre
- Tenho dificuldade em comer alimentos secos  
 Nunca  Quase nunca  ocasionalmente  quase sempre  sempre
- Acordo a noite para beber água  
 Nunca  Quase nunca  ocasionalmente  quase sempre  sempre
- Minha boca fica seca durante a alimentação  
 Nunca  Quase nunca  ocasionalmente  quase sempre  sempre
- Eu molho a boca para facilitar a deglutição  
 Nunca  Quase nunca  ocasionalmente  quase sempre  sempre
- Eu como balas e chicletes doces para aliviar a secura da boca  
 Nunca  Quase nunca  ocasionalmente  quase sempre  sempre
- Tenho dificuldade em deglutir algumas comidas  
 Nunca  Quase nunca  ocasionalmente  quase sempre  sempre
- A pele do meu rosto é ressecada  
 Nunca  Quase nunca  ocasionalmente  quase sempre  sempre
- Sinto meus olhos secos  
 Nunca  Quase nunca  ocasionalmente  quase sempre  sempre
- Sinto meus lábios secos  
 Nunca  Quase nunca  ocasionalmente  quase sempre  sempre
- A parte interna do meu nariz é ressecada  
 Nunca  Quase nunca  ocasionalmente  quase sempre  sempre

Nunca = 1 ponto  
 Quase nunca = 2 pontos  
 Ocasionalmente = 3 pontos  
 Quase sempre = 4 pontos  
 Sempre = 5 pontos

PONTUAÇÃO MÍNIMA = 11  
 PONTUAÇÃO MÁXIMA = 55

Fluxo salivar: \_\_\_\_ ml/min

<b>Sintomas oculares</b>	
Sensação de corpo estranho:	sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
Ardência ou queimação:	sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
Sensação de olho seco:	sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
Fotofobia ( problema de claridade):	sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
Cansaço visual quando lê ou vê televisão:	sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
Cansaço visual quando lê ou vê televisão:	sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
Sensação que a acuidade visual varia (flutua):	sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
Produção excessiva de muco:	sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
Sensação de arranhão quando pisca os olhos	sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
Piora com: ar-condicionado:	sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
vento:	sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
fumaça de cigarro:	sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>

Teste de Shirmer I: \_\_\_\_\_mm/min

<b>CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO – SÍNDROME DE SJOGREN</b>	
<b>1. Sintomas oculares</b>	sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
Você tem desconforto olhos secos de modo diário e persistente nos últimos 3 meses?	sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
Você tem sensação recorrente de areia nos olhos?	sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
Você utiliza substitutos lacrimais mais de 3 vezes por dia?	sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
<b>2. Sintomas orais:</b>	sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
Você tem sensação de boca seca diariamente há mais de três meses?	sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
Você teve aumento recorrente ou persistente de glândulas salivares na fase adulta?	sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
Você sente necessidade de ingerir líquidos para auxiliar a deglutição de alimentos secos?	sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
<b>3. Sinais oculares:</b>	Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/>
Teste de Schimer: OD- _____mm/5min (<5mm em 5 minutos) OE- _____mm/5min (<5mm em 5 minutos)	
<b>4. Histopatologia:</b>	Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/>
Número de focos: _____	
<b>5. Envolvimento de glândula salivar</b>	Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/>
Fluxo salivar não estimulado: _____ml/min (<0.5 ml em 5 min)	
<b>6. Auto-anticorpos:</b>	Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/>
Anti SSA:	sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> Resultado: _____
Anti SSB:	sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> Resultado: _____

## ANEXO A — HEALTH ASSESSMENT QUESTIONNAIRE

(Health Assessment Questionnaire - HAQ)

CATEGORIA	(HAQ) Atividade	Sem dificuldade = 0	Pouca dificuldade = 1	Muita dificuldade = 2	Não consegue = 3	Maior valor
Vestimenta e presença física	1. Vestir-se, inclusive amarrar os cordões e abotoar as roupas					
	2. Lavar sua cabeça e seus cabelos					
Acordar	3. Levantar-se de maneira ereta de uma cadeira de encosto reto e sem braços					
	4. Deitar-se e levantar-se da cama					
Alimentar-se	5. Cortar pedaços de carne					
	6. Levar à boca um copo ou xícara cheia de café, leite ou água					
	7. Abrir um saco (caixa) de leite comum					
Andar	8. Caminhar em lugares planos					
	9. Subir 5 degraus					
Higiene	10. Lavar e secar seu corpo após o banho					
	11. Tomar					

	banho de chuveiro					
	12. Sentar-se e levantar-se de um vaso sanitário					
Alcance	13. Levantar os braços e pegar um objeto de +/- 2,5kg que está posicionado pouco acima da cabeça					
	14. Curvar-se para pegar roupas no chão					
Pegada	15. Segurar-se em pé no ônibus ou metrô					
	16. Abrir potes ou vidros de conservas que tenham sido previamente abertos					
	17. Abrir e fechar torneiras					
Outras atividades	18. Fazer compras nas redondezas onde mora					
	19. Entrar e sair de um ônibus					
	20. Realizar tarefas tais com usar vassoura para varrer e ou rodo para a água					
SOMATÓRIO						
SOMATÓRIO DIVIDIDO POR 8 (RESULTADO DO HAQ)						

HAQ dividido em 8 categorias: vestimenta e presença física, acordar, alimentar-se, andar, higiene, alcance, pegada e outras atividades. A pontuação de cada categoria foi o resultado mais alto de qualquer um dos seus itens. A pontuação final do HAQ foi determinada pela média da pontuação das oito categorias (podendo variar de 0 a 3).

## ANEXO B — DISEASE ACTIVITY SCORE 28

### Disease Activity Score 28 (DAS 28)

Enter Patient ID (for printing):

---

#### Joint Scores

Tender:

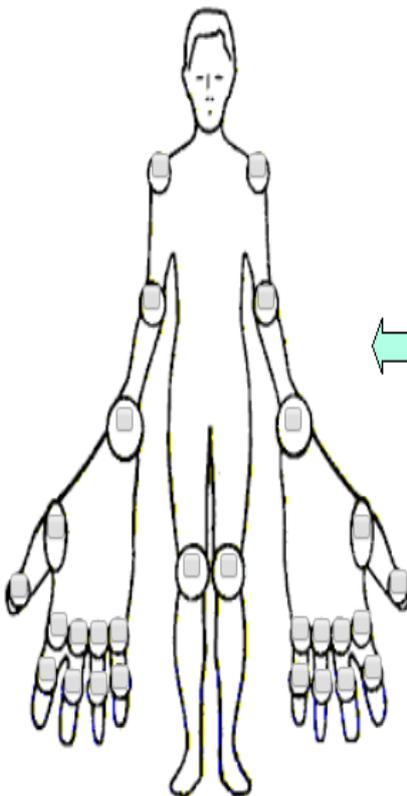
Swollen:

To enter joint scores, I prefer to:

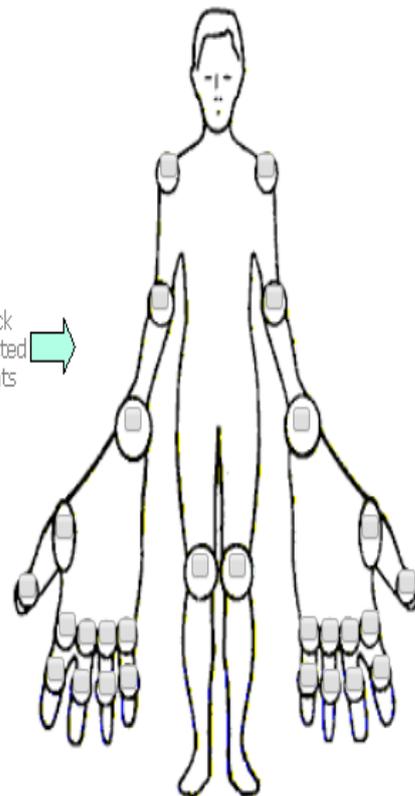
Use Mannequin

Type totals

#### Tender Joints



#### Swollen Joints



← Click affected joints →

#### Additional Measures

ESR:  mm/hr

CRP:  mg/l

Patient Global Health:  mm



0 - Best Worst - 100

Em remissão (valor menor que 2,6), atividade leve (maior ou igual a 2,6 e menor ou igual a 3,2), atividade moderada (maior que 3,2 e menor ou igual a 5,1) e atividade intensa (maior que 5,1)