



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

KAMILA DE MELO VILAR

**CORRELAÇÃO DE POLIMORFISMO NO *LGALS9* COM NÍVEIS SÉRICOS DAS
GALECTINAS -1, -4, -7 E -9 E PARÂMETROS CLÍNICOS DE ARTRITE
REUMATOIDE E ESCLEROSE SISTÊMICA.**

Recife
2019

KAMILA DE MELO VILAR

**CORRELAÇÃO DE POLIMORFISMO NO LGALS9 COM NÍVEIS SÉRICOS
DAS GALECTINAS -1, -4, -7 E -9 E PARÂMETROS CLÍNICOS DE ARTRITE
REUMATOIDE E ESCLEROSE SISTÊMICA.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Inovação Terapêutica.

Área de concentração: Inovação Terapêutica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maira Galdino da Rocha Pitta.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Michelly Cristiny Pereira.

Recife

2019

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso
(CRB4 1728)

Vilar, Kamila de Melo

Correlação de polimorfismo no LGALS9 com níveis séricos das galectinas -1,-4,-7 e -9 e parâmetros clínicos de artrite reumatoide e esclerose sistêmica / Kamila de Melo Vilar – 2019.

93 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Maira Galdino da Rocha Pitta

Coorientadora: Michelly Cristiny Pereira

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Recife, 2019.

Inclui referências e apêndices e anexo.

1. Galectinas 2. Artrite reumatoide 3. Esclerose sistêmica I. Pitta, Maira Galdino da Rocha (orient.) II. Pereira, Michelly Cristiny (coorient.) III. Título.

572.6

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2019- 389

KAMILA DE MELO VILAR

**CORRELAÇÃO DE POLIMORFISMO NO LGALS9 COM NÍVEIS SÉRICOS
DAS GALECTINAS -1, -4, -7 E -9 E PARÂMETROS CLÍNICOS DE ARTRITE
REUMATOIDE E ESCLEROSE SISTÊMICA.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Inovação Terapêutica.

Aprovada em: 14/ 08 /2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Maira Galdino da Rocha Pitta (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Pablo Ramon Gualberto Cardoso (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Renata Virgínia Cavalcanti Santos (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Laurindo Ferreira da Rocha Júnior (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

“Dedico este trabalho a minha melhor
amiga, meu exemplo, minha vida:
Minha mãe”.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por seu infinito amor e por tantas benções derramadas.

À minha Mãe, meu maior exemplo de vida e superação. Obrigada por sempre estar junto comigo, comprando minhas lutas e comemorando minhas vitórias, melhor, nossas vitórias. Tudo isso é pra senhora, te amo demais!

À minha família que mesmo distante se faz sempre presente, me dando palavras e motivações para nunca desistir!

À Prof^a Dr^a Maira Galdino da Rocha Pitta, por me dar a oportunidade de participar desse grupo de pesquisa, sendo uma das responsáveis pelo meu crescimento profissional e pessoal, muito obrigada!

À Prof^a Dr^a Michelly Cristiny Pereira, pelos ensinamentos profissionais e pessoais, paciência, dedicação, conselhos, muito obrigada!

Ao Prof^o Dr^o Moacyr Rêgo, pelos conselhos e por sempre estar disposto a me ajudar, muito obrigada!

Aos médicos do HC, em especial Dr^a Angela Duarte e Dr^a Andrea Dantas, sem a ajuda delas esse trabalho não seria o mesmo, muito obrigada!

À todos colegas LINATEanos, em especial: Heloísa, Anderson, Pablo, Renata, Eudes, Lília, Antônio, Michael, Flaviana e Maria Andreza. Muito obrigada pelos conselhos, ajudas e momentos de descontração que tive durante todo esse tempo. Sentirei falta de vocês.

À todos meus amigos que sempre me apoiaram e estiveram ao meu lado, em especial: Erwelly, Fabianne, André, Hugo, Karla, Jeann, Conceição e Joelson. Muito obrigada pelas conversas, apoio, momentos e desesperos compartilhados.

À FACEPE e INCT_i, pelo apoio financeiro para a realização deste projeto.

Deus não atrasa, não se engana, não erra endereço de entrega, não adormece, não desiste, não esquece! Ouve cada oração, anota cada lágrima!

Autor desconhecido.

RESUMO

Artrite reumatoide (AR) e esclerose sistêmica (ES) são doenças autoimunes reumáticas que afetam múltiplos órgãos ou tecidos simultaneamente. Vários fatores podem influenciar a patogênese dessas doenças. As galectinas são proteínas da família das lectinas que apresentam alta afinidade à β -galactosídeos. Os membros dessa família possuem um domínio de ligação a carboidratos que estão cada vez mais relacionadas a processos de apoptose, fibrose, migração e atividades pro e anti-inflamatórias. Nesse contexto, há uma busca para esclarecer os mecanismos genéticos, através de polimorfismos (SNPs) que estão associados com a suscetibilidade das doenças. O objetivo deste estudo foi analisar a associação de SNPs nos genes das galectinas, com seus níveis séricos e manifestações clínicas em pacientes com AR e ES. Um grupo de duzentos e vinte e nove pacientes com AR, oitenta e dois com ES e cento e setenta voluntários foram recrutados pelo Serviço de Reumatologia do HC-UFPE, cumprindo os critérios do Colégio Americano de Reumatologia, e tiveram o soro dosado pela metodologia do ELISA para as galectinas 1-4, -7 e -9. Cento e cinquenta e oito pacientes com AR, sessenta e sete com ES e duzentos controles foram genotipados para os SNPs no gene da galectina-9 (*LGALS9*) (rs479583, rs3763959, rs4239242) através da metodologia TaqMan®. O genótipo SNP rs4239242 TT apresentou associação positiva com AR em comparação ao grupo controle ($p = 0,0032$). O genótipo AG (rs3763959) foi associado com uma maior presença de erosões ósseas em pacientes com AR ($p = 0,0436$). Altos níveis séricos de Gal-1 e Gal-4 estão relacionados a pacientes em remissão ou baixa atividade da doença ($p < 0,0001$; $p = 0,0012$, respectivamente) e ausência de fator reumatóide ($p = 0,0358$; $p = 0,0099$, respectivamente), nos pacientes com AR. Nos pacientes com ES, encontramos uma associação positiva de Gal-1 com a presença de miopatia ($p = 0,0466$) e altos níveis de Gal-7 em pacientes com fibrose ($p = 0,0196$). Encontramos pela primeira vez uma possível associação entre os SNPs do *LGALS9* e os pacientes com AR. Além de associarmos a presença das galectinas em pacientes em remissão ou baixa atividade da doença para a AR e a presença do processo fibrótico nos pacientes com ES.

Palavras-chave: Artrite Reumatoide. Esclerose Sistêmica. Galectinas. Polimorfismos.

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) and systemic sclerosis (SSc) are rheumatic autoimmune diseases that affect multiple organs or tissues simultaneously. Several factors may influence the pathogenesis of these diseases. Galectins are lectin family proteins that have high affinity for β -galactosides. Members of this family have a carbohydrate-binding domain that is increasingly related to processes of apoptosis, fibrosis, migration, and pro and anti-inflammatory activities. In this context, there is a search to clarify genetic mechanisms through polymorphisms (SNPs) that are associated with disease susceptibility. The aim of this study was to analyze the association of SNPs in galectin genes, their serum levels and clinical manifestations in patients with RA and SSc. A group of two hundred and twenty-nine RA patients, eighty-two with SSc and one hundred and seventy volunteers were recruited by the HC-UFPE Rheumatology Service, meeting the criteria of the American College of Rheumatology, and had their serum dosed by the methodology of the ELISA for galectins 1-4, -7 and -9. One hundred and fifty-eight RA patients, sixty-seven patients with SSc and two hundred controls were genotyped for SNPs in the galectin-9 gene (LGALS9) (rs479583, rs3763959, rs4239242) using the TaqMan® methodology. The SNP rs4239242 TT genotype was positively associated with RA compared to the control group ($p = 0.0032$). Genotype AG (rs3763959) was associated with a higher presence of bone erosions in RA patients ($p = 0.0436$). High serum Gal-1 and Gal-4 levels are related to patients in remission or low disease activity ($p < 0.0001$; $p = 0.0012$, respectively) and absence of rheumatoid factor ($p = 0.0358$; $p = 0.0099$, respectively) in patients with RA. In patients with SSc, we found a positive association of Gal-1 with the presence of myopathy ($p = 0.0466$) and high levels of Gal-7 in patients with fibrosis ($p = 0.0196$). We first found a possible association between LGALS9 SNPs and RA patients. In addition to associating the presence of galectins in patients in remission or low disease activity for RA and the presence of fibrotic process in patients with SSc.

Keywords: Rheumatoid Arthritis. Systemic Sclerosis. Galectins. Polymorphisms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Principais articulações acometidas em pacientes com diagnóstico de AR.....	16
Figura 2 –	Principais manifestações clínicas em pacientes com ES.....	20
Figura 3 –	Classificação estrutural das galectinas em três tipos: protótipo, químera e repetição em tandem.....	24
Figura 4 –	Representação da presença das galectinas na AR.....	32
Figura 5 –	Representação da presença das galectinas na ES.....	33
Figura 6 –	Associação dos níveis séricos de Gal-9 em pacientes com AR.....	47
Figura 7 –	Presença de Erosão nos pacientes com AR, estratificada por genótipos de polimorfismos do gene <i>LGALS9</i> (rs3763959).....	50
Figura 8 –	Associação das galectinas -1, -4 e -7 nos pacientes com AR e grupo controle.....	54
Figura 9 –	Associação dos níveis séricos das galectinas -1 e -4 com o índice clínico da atividade da doença (CDAI) nos pacientes com AR.....	55
Figura 10 –	Avaliação do escore de atividade da doença para 28 articulações (DAS28) com níveis séricos de Galectina-4.....	56
Figura 11 –	Associação do FR com os níveis séricos das galectinas -1 e -4.....	56
Figura 12 –	Associação das galectinas -1, -4 e -7 nos pacientes com ES e grupo controle.....	57
Figura 13 –	Associação de parâmetros clínicos com as galectinas em pacientes com ES.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Galectinas nas doenças autoimunes.....	34
Tabela 2 –	SNPs do <i>LGALS9</i> selecionados.....	41
Tabela 3 –	Reagentes utilizados na reação em cadeia da polimerase (PCR).....	42
Tabela 4 –	Parâmetros demográficos e clínicos de pacientes genotipados com AR e grupo controle para genotipagem.....	45
Tabela 5 –	Parâmetros demográficos e clínicos de pacientes genotipados com ES e grupo controle para genotipagem.....	46
Tabela 6 –	Distribuição dos alelos e genótipos <i>LGALS9</i> em pacientes com AR e indivíduos saudáveis.....	49
Tabela 7 –	Parâmetros demográficos e clínicos de pacientes com níveis séricos dosados com AR e grupo controle para dosagem sérica.....	52
Tabela 8 –	Parâmetros demográficos e clínicos de pacientes com níveis séricos dosados com ES e grupo controle dosagem sérica.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

anti-CCP	Antipeptídeos cintrulinados cíclicos
AR	Artrite Reumatoide
ACR	Colégio Americano de Reumatologia (Do Inglês, <i>American College Of Rheumatology</i>)
CDAI	Índice Clínico de Atividade da Doença (Do Inglês, <i>Clinical Disease Activity Index</i>)
CL	Cutânea Limitada
CD	Cutânea Difusa
CD	Célula Dendrítica
CRDS	Domínio de Reconhecimento De Carboidratos
DAS28	Escore de Atividade Da Doença Em 28 Articulações (Do Inglês, <i>Disease Activity Score 28</i>)
DMARD	Fármacos Antirreumáticos Modificadores da Doença
DRB1	Heterodímero de cadeia beta
ES	Esclerose Sistêmica
EULAR	Liga Européia Contra o Reumatismo (Do Inglês, <i>European League Against Rheumatism</i>)
FLS	Fibroblastos
Gal-1	Galectina-1
Gal-3	Galectina-3
Gal-4	Galectina-4
Gal-7	Galectina-7
Gal-9	Galectina-9
GBPS	Proteínas de Ligação Ao Guanilato (Do Inglês, <i>The Guanylate-Binding Proteins</i>)
GM-CFS	Fator Estimulante das Colônias- Granulócitos-Macrófagos
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
HAQ	Questionário De Avaliação De Saúde (Do Inglês, <i>Health Assessment Questionnaire</i>)
ICAD	Índice Compostos De Atividade De Doença
IL	Interleucina

LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
LGALS2	Gene que codifica a galectina-2
LGALS3	Gene que codifica a galectina-3
LGALS9	Gene que codifica a galectina-9
MAPK	Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
MMP-3	Metaloproteinase-3
NF-KB	Fator de Sinalização Nuclear Kappa Beta
NK	Natural Killer
PCK	Proteína quinase C
PCR	Proteína C Reativa
RT-PCR	Reação Em Cadeia Da Polimerase Em Tempo Real (Do Inglês, <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>)
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único (Do Inglês, <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
SLEDAI	Índice de Atividade de Doença do Lúpus Eritematoso Sistêmico (Do Inglês, <i>Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index</i>)
VSH	Velocidade de Hemossedimentação
Th	T auxiliar (Do Inglês, <i>T Helper</i>)
TIM-3	Imunoglobulina de Células T molécula-3 Contendo o Domínio da Mucina
TLR	Receptor de Sinalização Toll-Like
TNF- α	Fatores de Necrose Tumoral Alfa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1	ARTRITE REUMATOIDE.....	16
2.2	ESCLEROSE SISTÊMICA.....	19
2.3	GLICOBIOLOGIA.....	21
2.3.1	Galectinas.....	23
2.3.1.1	Galectina-1 (Gal-1).....	25
2.3.1.2	Galectina-4 (Gal-4).....	26
2.3.1.3	Galectina-7 (Gal-7).....	27
2.3.1.4	Galectina-9 (Gal-9).....	27
2.3.2	Galectinas nas doenças autoimunes reumatológicas.....	29
2.3.3	Polimorfismos nas galectinas.....	35
3	OBJETIVO.....	37
3.1	OBJETIVO GERAL.....	37
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
4.1	POPULAÇÃO E LOCAL DE ESTUDO.....	38
4.1.1	Critérios de inclusão.....	38
4.1.2	Critérios de exclusão.....	38
4.2	COLETA E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	39
4.3	EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO.....	39
4.3.1	Determinação da concentração de DNA das amostras.....	40
4.4	SELEÇÃO DOS POLIMORFISMOS.....	40
4.5	GENOTIPAGEM.....	41
4.5.1	Reação em cadeia polimerase (PCR).....	41
4.6	DOSAGEM DAS GALECTINAS.....	42
4.7	ANALISE ESTATÍSTICA.....	43
5	RESULTADOS.....	44
5.1	CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES.....	44
5.2	CARACTERIZAÇÃO DO LGALS9 COM NÍVEIS SÉRICOS DA	

	GAL-9 E CORRELAÇÕES CLÍNICAS.....	47
5.2.1	Artrite reumatoide.....	47
5.3	CARACTERIZAÇÕES DOS NÍVEIS SÉRICOS DAS GALECTINAS E CORRELAÇÕES CLÍNICAS.....	51
5.3.1	Artrite reumatoide.....	53
5.3.2	Esclerose sistêmica.....	57
6	DISCUSSÃO.....	59
7	CONCLUSÃO.....	65
8	REFERENCIAS.....	66
APÊNDICE A–	CRITÉRIOS DE CLASSIFICAÇÃO ACR-EULAR 2010 PARA AR.....	88
APÊNDICE B–	CRITÉRIOS DE CLASSIFICAÇÃO ACR-EULAR 2010 PARA ES.....	89
APÊNDICE C–	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	90
ANEXO A–	CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	93

1 INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune inflamatória crônica de etiologia desconhecida, que atinge preferencialmente estruturas articulares podendo afetar o tecido conjuntivo de qualquer parte do organismo. Causa uma destruição articular progressiva levando, assim, as mais variadas manifestações sistêmicas, como por exemplo, deformidades físicas e até mesmo a morte precoce. Aproximadamente 1% da população mundial é acometida pela doença, que tem maior incidência nas mulheres da quarta a sexta décadas de vida (HAMMAM et al., 2017).

A esclerose sistêmica (ES) é uma doença autoimune rara do tecido conectivo, e de causa desconhecida. Caracterizada por vasculopatia proliferativa e obliterativa de pequenos vasos, mecanismos autoimunes com produção de autoanticorpos e lesão tecidual com ocorrência de fibrose. Também uma predominância nas mulheres, preferencialmente entre a quarta e sexta décadas de vida, sendo bem rara na infância (DENTON et al., 2017).

A etiologia dessas doenças ainda permanece desconhecida, o que dificulta o tratamento do paciente. Os mecanismos genéticos vêm sendo cada vez mais associados ao desenvolvimento e ou suscetibilidade de inúmeras patologias (SIME et al., 2017; YANABA et al., 2016; NIELSEN et al., 2015).

Atualmente, os polimorfismos de base única (SNP do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*) nas galectinas vêm sendo associados a várias doenças, como no caso da galectina-3, a qual que age no direcionamento da inflamação e resposta imunológica em diversas doenças. O SNP no gene da galectina-3 (*LGALS3*) foi associado à susceptibilidade no desenvolvimento da AR (HU et al., 2011). Nenhum SNP nos genes de Gal-1 -4, -7 e -9 foi descrito em relação as doenças autoimunes.

SNPs nos genes das galectinas podem alterar suas funções, aumentando ou diminuindo suas atividades pró-inflamatórias e, conseqüentemente, podem contribuir para o agravamento de doenças. Portanto, o presente estudo objetivou caracterizar a concentração sérica de diferentes galectinas das doenças autoimunes e avaliar se a presença de polimorfismos nos genes da galectina 9 são associadas com os seus níveis séricos e parâmetros clínicos.

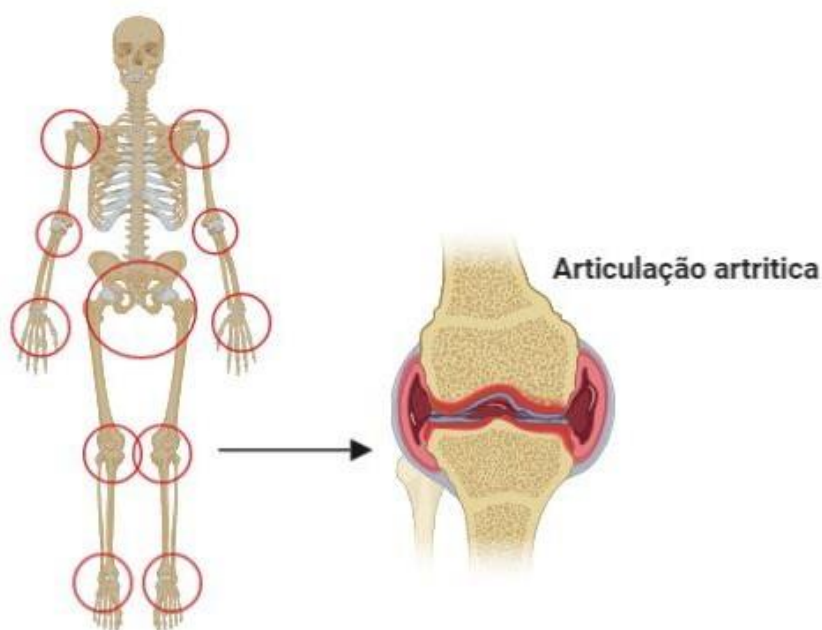
2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ARTRITE REUMATOIDE

A AR é uma doença inflamatória crônica de etiologia desconhecida, caracterizada por sinovite periférica e por diversas manifestações extra-articulares, com destruição articular irreversível causada pela proliferação de macrófagos e fibroblastos na membrana sinovial após estímulo autoimune ou infeccioso. As manifestações extra-articulares (nódulos reumatoides, vasculite, derrame pleural, episclerite e escleromácia perforante, entre outras) correlacionam-se com pior prognóstico.

A forma clínica mais comum presente na AR é a poliartrite simétrica de pequenas e grandes articulações com caráter crônico e destrutivo, podendo levar limitação à funcional, comprometendo a capacidade laboral e a qualidade de vida. Resultando em significativo impacto pessoal e social podendo levar à mortalidade, o que demonstra a gravidade da doença (BELLUCCI et al., 2016). As articulações afetadas pela AR estão demonstradas na figura 1.

Figura 1 – Principais articulações acometidas em pacientes com diagnóstico de AR.



Fonte: Adaptado do BioRender®

A AR é mais frequente em mulheres e na faixa etária de 40 a 60 anos, com pico de incidência entre a quarta e sexta décadas de vida. Todavia, o histórico familiar de AR aumenta o risco de desenvolvimento da doença de 3 a 5 vezes (ARNETT et al., 1987). No Brasil, estudo realizado em Minas Gerais encontrou prevalência de 0,46%, representando quase um milhão de pessoas com essa doença (MARQUES-NETO et al., 1993). A história familiar é um forte fator de risco para o desenvolvimento da AR, onde gêmeos homozigotos tem 15% de chances a mais de desenvolver a doença (FRISELL et al., 2016; SUZUKI; YAMOMOTA, 2015).

Avanços significativos em estudos a nível molecular ou celular têm elucidado o processo inflamatório da AR, como a identificação de citocinas que direcionam a inflamação sinovial crônica. Os fatores ambientais estão relacionados com a diferenciação de células T *naïve* em células Th17, que produzem citocinas inflamatórias, como por exemplo, interleucina-17 (IL-17), IL-6, IL-1, fator de necrose tumoral (TNF) (TANAKA et al., 2014). Em pacientes com AR, os níveis séricos das citocinas pró e antiinflamatórias podem se correlacionar com a clínica e índices de atividade da doença associando-se ao quadro clínico e o comprometimento dos pacientes (TANAKA et al., 2014; KERKMAN et al., 2013).

Apesar de a etiopatogenia de AR ainda não ser inteiramente conhecida, as análises em todo o genoma revelaram que vários genes estão ligados ao desenvolvimento de AR. Há a participação de genes que regulam a ativação de células T, sinalização fator nuclear kB (NF-kB), além de outras enzimas e moléculas reguladoras para respostas imunes, das quais o antígeno leucocitário humano (HLA) é responsável por 30% a 50% da suscetibilidade genética global para a AR (MCINNIS; SCHETT et al., 2011; DE VRIES, 2011; BAX et al., 2011).

Em estudo brasileiro com pacientes em sua maioria com herança mista, os principais fatores de risco para o desenvolvimento de AR foram a detecção de anticorpos contra peptídeos citrulinados cíclicos (anti-CCP) e a presença dos alelos HLA-DRB1 SE (*shared epitope* - epitopo compartilhado) (USNAYO et al., 2011). No entanto, variações fenotípicas apontam para fatores ambientais que, além da predisposição genética, contribuem para o surgimento da doença, tais como tabagismo e infecções periodontais (DARZI et al., 2017).

O quadro clínico do envolvimento articular é o resultado de uma interação entre células residentes, como sinoviócitos tipo fibroblastos (FLS); células do sistema imune inato, como macrófagos, células dendríticas, mastócitos e células

natural killer (NK), neutrófilos; e sistema imune adaptativo como linfócitos B e T. Os autoanticorpos, moléculas de adesão vias de transdução de sinal estão envolvidos em diferentes estágios da doença (JIANG et al., 2016; KONDA et al., 2016).

O diagnóstico de AR é estabelecido com base em achados clínicos e exames complementares, que podem estar relacionados à progressão mais rápida da destruição articular do paciente. Os critérios de classificação foram estabelecidos pelo Colégio Americano de Reumatologia (ACR, do inglês: *American College of Rheumatology*) – ACR, em 1987 e, mais recentemente, pelo Colégio Americano de Reumatologia/Liga Europeia contra o Reumatismo (*American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism*) - ACR/EULAR em 2010, e são adotados pelos médicos para a identificação de indivíduos com determinada doença e podem auxiliar no diagnóstico (ALETABA et al., 2010; ARNETT et al., 1988).

A avaliação sistemática de atividade de doença deve fazer parte do acompanhamento dos pacientes com AR, por isso, os índices compostos de atividade de doença (ICAD) devem ser utilizados, por incluir componentes clínicos e laboratoriais. Os principais ICADs são o índice de atividade de doença DAS 28 (*Disease Activity Score 28*) e o índice clínico de atividade de doença CDAI (*Clinical Disease Activity Index*). Além de atividade de doença, a capacidade funcional deve ser periodicamente avaliada, sendo o questionário mais utilizado o HAQ (*Health Assessment Questionnaire*) (DA MOTA et al., 2011).

O DAS28 leva em consideração o número de juntas dolorosas e edemaciadas (interfalangianas proximais, metacarpofalangianas, punhos, cotovelos, ombros e joelhos), velocidade de hemossedimentação (VSH) e avaliação global de saúde ou da atividade da doença feita pelo paciente. Já o CDAI é o resultado da soma simples do número de juntas dolorosas e edemaciadas (28 articulações), da avaliação da atividade da doença feita pelo paciente numa escala visual analógica de 0 a 10 cm², feita pelo médico (0-10 cm). A VSH e a proteína C reativa (PCR) são utilizados como marcadores da inflamação.

Além de medir a atividade da doença numa escala contínua, esses itens permitem categorizar o paciente pela atividade da doença: remissão, valor menor que 2,6; entre 2,6 e 3,2 com baixa atividade; maior que 3,2 e 5,1 com atividade moderada e maior que 5,1 doença muito ativa. A remissão da doença é uma meta

que tem sido buscada cada vez mais (HENSOR et al., 2010; FERRAZ et al., 1990).

A tabela com os critérios classificatórios da AR está descrita no Apêndice A.

2.2 ESCLEROSE SISTÊMICA

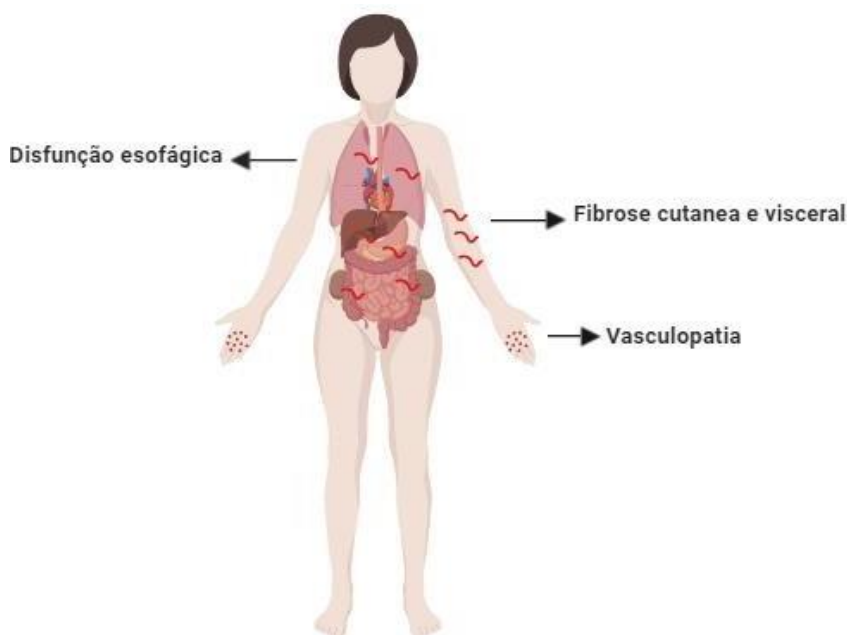
A ES uma doença autoimune do tecido conjuntivo, caracterizada por graus variáveis de fibrose cutânea e visceral de múltiplos órgãos, incluindo pulmão, rim, coração, trato gastrointestinal (TGI), presença de auto-anticorpos no soro dos pacientes e vasculopatia fibroproliferativa. É uma doença rara com uma taxa de incidência de 11,9 por milhão/habitantes e taxa de prevalência de 105,6 por milhão/habitante, com predominância do sexo feminino, sendo, 3-14 vezes mais frequente em mulheres do que em homens. Ocorre em todas as faixas etárias, mas o pico de incidência se verifica na vida adulta dos 35 aos 54 anos (HORIMOTO et al., 2017).

De acordo com a extensão e local do acometimento cutâneo, a ES pode ser classificada clinicamente em: cutânea limitada (CL) e cutânea difusa (CD). A CL é encontrada em maior frequência, apresentando um espessamento da pele restrito à face e às extremidades, possuindo uma progressão mais lenta. Enquanto que a CD tem um início mais rápido e é caracterizada por um comprometimento mais extenso da pele, acometendo além da face e extremidades, os membros e o tronco (DESBOIS; CACOUB, 2016; ODAKA et al., 2010).

O acometimento visceral, que ocorre em graus variáveis, afeta predominantemente os pulmões, o TGI, o coração e, eventualmente, os rins. ES apresenta alta morbidade com um risco até 7 vezes maior de mortalidade em comparação com a da população geral (IOANNIDIS et al., 2014).

Uma manifestação de grande importância na doença é a vasculopatia, onde os pacientes podem apresentar diferentes graus de comprometimento vascular. A lesão celular endotelial é proposta como um evento de iniciação crucial ao remodelamento vascular com proliferação de arteríolas e queda capilar e oclusão do vaso sanguíneo (MOSTMANS et al., 2017; MATUCCI-CERINIC et al., 2013). As manifestações clínicas presentes nos pacientes com ES estão resumidas na figura 2.

Figura 2 – Principais manifestações clínicas em pacientes com ES.



Fonte: Adaptado do BioRender®.

Outra manifestação importante é a desregulação do sistema imunológico, envolvendo a resposta humoral e celular. Os auto-anticorpos contra os componentes do tecido conjuntivo estão presentes na ES, sendo importantes componentes da imunidade humoral, contribuindo para respostas aberrantes e associações prognósticas. A imunidade celular é representada principalmente pelos linfócitos T, responsáveis pela produção de diversas citocinas que desempenham papéis importantes, incluindo alterações nas células endoteliais e fibroblastos (PATTANAIK et al., 2011; RAMIREZ et al., 2012).

Sua etiologia permanece desconhecida, sendo proposta uma causa multifatorial possivelmente desencadeada por fatores ambientais e indivíduo geneticamente predisposto (CABRAL-MARQUES et al, 2016). Vários genes localizados em locos no complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e não-MHC foram associados a risco de ES como, HLADRB1*11, o HLA-A*30, o HLA-DRB1*01 e o HLA-A*32 foram associados suscetibilidade à ES, enquanto o HLA-Cw*14 foi associado à diminuição risco da doença (GLADMAN et al., 2005).

Enquanto o HLA-DRB1*0802 e DQA1*0501 têm sido associados ao aumento da mortalidade desses pacientes (ASSASSI et al., 2009). Existe um alto grau de fatores genéticos que se sobrepõem entre a ES e outras doenças auto-imunes, conhecido como “autoimunidade compartilhada”.

O conhecimento de interação entre polimorfismos genéticos e outros genes reguladores mecanismos, tais como modificações epigenéticas, podem lançar novas linhas de pesquisas para o entendimento de como os SNPs de suscetibilidade à ES localizados em regiões não-codificantes poderiam afetar a qualidade e a quantidade de expressão gênica para, em última análise, resultar na patogênese da ES (Rezaei et al., 2018).

O diagnóstico da ES é realizado através dos dados clínicos em associação com as avaliações laboratoriais. Os critérios do ACR desenvolvidos em 1980, são utilizados para classificação da ES, incluindo espessamento simétrico da pele dos dedos, fibrose pulmonar e perda de tecido, embora essas características clínicas representem lesão tecidual avançada. (WALKER et al., 2007).

Como os critérios do ACR de 1980 não são sensíveis para o diagnóstico precoce da doença, especialmente pacientes com a forma CL, o ACR e a EULAR elaboraram uma proposta conjunta de critérios para a ES, com os seguintes objetivos: (1) incluir pacientes em fase precoce e tardia da doença, (2) incluir manifestações vasculares, imunológicas e fibróticas, (3) ser viável para o uso na prática clínica e (4) estar de acordo com os critérios utilizados para diagnóstico da ES na prática clínica. Os critérios incluem: espessamento bilateral da pele dos dedos, *puffy fingers* ou esclerodactilia, lesões na ponta dos dedos, telangiectasias, capilaroscopia alterada, doença pulmonar intersticial ou hipertensão arterial pulmonar, fenômeno de Raynaud, crise renal esclerodérmica e presença de autoanticorpos específicos (VAN DE HOOGEN et al., 2013; LEROY et al., 2001). A tabela com os critérios classificatórios da ES está descrita no Apêndice B.

2.3 GLICOBIOLOGIA

Glicobiologia é o estudo das estruturas e funções dos glicanos, também chamados carboidratos, sacarídeos ou açúcares. Os glicanos estão entre as moléculas biológicas mais complexas encontradas na natureza, tendo como papel

principal, o controle da imunidade inata e adaptativa (CUMMINGS et al., 2014; RABINOVICH et al., 2012).

Os glicanos humanos são constituídos, principalmente, a partir de nove monossacarídeos, a maioria dos quais estão estruturalmente relacionados, variando em um apenas único carbono. Outro nível de variabilidade do padrão em glicanos surge de múltiplas ligações entre os monossacarídeos. Enquanto os vinte aminoácidos das proteínas ou os quatro nucleotídeos dos ácidos nucléicos se combinam em sequências lineares, usando um único tipo de ligação, os monossacarídeos se ligam um ao outro por meio de duas ligações possíveis (α ou β) em qualquer um dos 3-4 grupos hidroxilas, de cada monômero em agrupamentos lineares ou ramificados (SCHNAAR et al., 2016; CUMMINGS et al., 2009).

As funções reguladoras dos glicanos são muitas vezes mediadas pelas interações de proteínas de ligação ao glicanos ou lectinas (GBPs), onde cada um dos quais carrega um domínio de reconhecimento a carboidratos (CRDs), que liga grupos específicos de açúcares em configurações pouco precisas. Nesse contexto, a glicobiologia representa basicamente o reconhecimento de padrões, sendo os glicanos constituintes dos padrões, as enzimas metabólicas dos glicanos (glicosiltransferases, glicosidases e enzimas modificadoras de glicanos) como o “padrão de escritores” e GBPs como “padrão de leitores”. Assim, os glicanos podem apresentar um padrão de reconhecimento amplo e estruturalmente flexível e, em outros casos, o padrão de reconhecimento do glicano é altamente específico, como padrões moleculares associados a patógenos (TAYLOR et al., 2014; RILLAHAAN et al., 2011; BUZÁS et al., 2006).

O transporte dos glicanos pode ser realizado por proteínas ou lipídeos, que estão envolvidos no reconhecimento célula-célula, célula-patógeno, regulação celular e reconhecimento de GBP. Sendo este último realizado pelo arranjo de cadeias laterais de proteínas que engatam múltiplas porções químicas nos glicanos (SCHNAAR et al., 2014; SCHNAAR et al., 2016).

Várias proteínas de ligação ao glicano, incluindo as lectinas de tipo C, lectinas semelhante a imunoglobulina de ligação ao ácido siálico (siglecs) e galectinas são componentes importantes do sistema imunológico (OHTSUBO et al., 2006). Por exemplo, a molécula de adesão intercelular específica de células dendríticas não absorventes (DC-SIGN) é um receptor da família da lectina de tipo C (CLR), encontrado na superfície de células dendríticas, que apresenta a função de associar

uma variedade de ligantes contendo manose e fucose e sinais para ativação da célula (GARCIA-VALLEJO et al., 2013; VAN KOOYK et al., 2003).

Outro exemplo é a célula dendrítica 22 (CD22), um membro da família do siglec, apresentando uma importância crucial no complexo receptor de células B, que auxilia a captação de antígeno e ativação de células B (O'REILLY et al., 2011). Acredita-se que as galectinas são capazes de se associar aos glicanos do hospedeiro, de modo que a superfície celular possa ser organizada em redes de receptores para que haja um espaçamento ideal do receptor e posterior sinalização e, assim, produzir sua resposta específica na célula. (RABINOVICH et al., 2012; SCHNAAR et al., 2015).

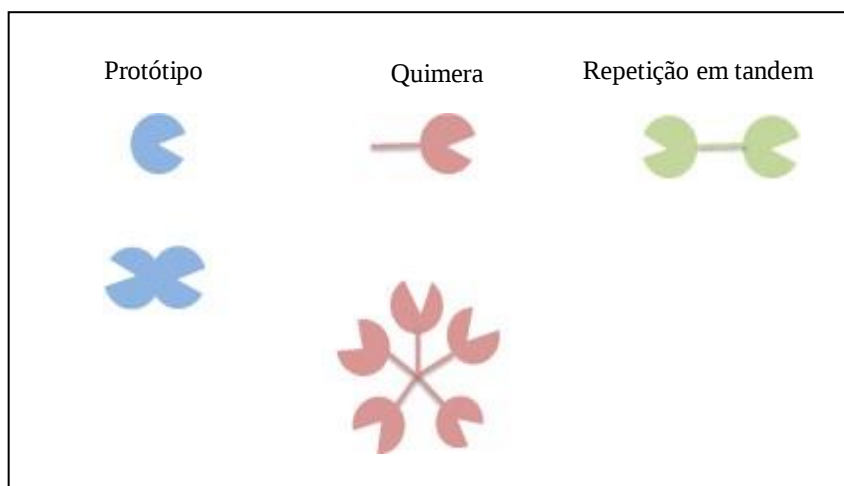
Através da ligação às lectinas e interações moleculares, os glicanos participam de vários mecanismos celulares que contribuem para respostas imunes inatas e adaptativas (PILLAI et al., 2012).

2.3.1 Galectinas

As galectinas são lectinas de animais que se ligam à β -galactose com uma alta afinidade por β -galactose em glicoconjugados, representada pelo resíduo de *N*-acetilgalactosamina (LacNAc), consistindo de β -galactose ligada a *N*-acetilglucosamina (NIO-KOBAYASHI et al., 2017). Existem vários níveis de reconhecimento de ligante do glicano para as galectinas, sendo o dissacarídeo GlcNAc (*N*-acetilgalactosamina) um ligante mais forte do que a β -galactopirranose; a substituição de resíduos de galactose em O-2 e O-3 proporcionam um aumento significativo de afinidade; e proteínas semelhantes glicosiladas podem diferir significativamente em afinidade com as galectinas (RAPOPORT et al., 2015; MCNICHOLAS et al., 2017).

Até o momento quinze galectinas foram identificados nos mamíferos, todas com CRDs em comum, com uma sequência de aproximadamente 130 aminoácidos. Essas galectinas foram classificadas em três grupos de acordo com suas estruturas em: protótipo, químera e tipos de repetição em tandem, como demonstrados na figura 3 (ADVEDISSIAN et al., 2015; NIO-KOBAYASHI et al., 2017).

Figura 3 - Classificação estrutural das galectinas em três tipos: protótipo, químera e repetição em tandem.



Fonte: Adaptado do BioRender®.

O protótipo de galectina contém um único CRD com aproximadamente 14kDa, podendo formar homodímeros. Fazem parte dessa família as galectinas 1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14, 15. Já o subtipo de repetição em tandem é composto por duas CRDs, de aproximadamente 30 kDa, não idênticas, unidas por um peptídeo curto, tendo as galectinas 4, 6, 8, 9, 12 como representantes do grupo. Enquanto que a galectina-3 faz parte do grupo químera, que contém um único CRD de 30 kDa com um N-terminal (ADVEDISSIAN et al., 2015; NIO-KOBAYASHI et al., 2017).

As galectinas são expressas por praticamente todas as células do sistema imune de forma constitutiva ou induzível. Sendo importantes, também, na regulação de células T e B, macrófagos, células NK e células T reguladoras $CD4^+CD25^+$ (Tregs) (VAN KOOYK et al., 2008; YANG et al., 2008).

Em contraste com lectinas de tipo C e siglecs, que são associados principalmente a receptores da superfície celular, as galectinas pertencem a uma categoria de proteínas imunomoduladoras solúveis, que podem atuar intracelularmente, modulando caminhos de sinalização, ou extracelularmente, como regulador bioativo de mediadores (RABINOVICH et al., 2009).

Embora as galectinas não contenham um sinal de secreção clássico, alguns membros são encontrados no compartimento extracelular e são lançados através de uma rota que requer atividade de ligação de carboidratos da proteína (YANG et al., 2008). Uma vez fora das células, as galectinas pode se ligar a múltiplos parceiros de ligação glicosilados e traduzir informações codificadas por glicano para ativação celular, diferenciação e programas homeostáticos. Desta forma, essas proteínas podem funcionar por formar estruturas de galectina-glicano ordenadas, também chamadas de redes, ou através do envolvimento direto de glicoconjugados específicos da superfície celular (DI LELLA et al., 2011; VIGUIER et al., 2014).

2.3.1.1 Galectina-1 (Gal-1)

A Gal-1 foi a primeira proteína descoberta da família das galectinas, possuindo uma estrutura de duas β folhas anti-paralelas. Esta proteína é codificada pelo gene *LGALS1* localizado no cromossomo 22q12, formado por quatro éxons e três introns. A Gal-1 pertence ao grupo protótipo, onde um único CRD de aproximadamente 14kDa, pode formar homodímeros. Os dímeros são mantidos através de interações hidrofóbicas na interface monomérica e pelo núcleo hidrofóbico bem definido (STOWEL et al., 2008; CAMBY et al., 2006).

A presença de mais de um CRD torna a Gal-1 importante na mediação da adesão celular, desencadeando sinalização intracelular e formando redes infinitas com glicoconjugados de superfície celular (HAUDEK 2010). Já no espaço extracelular os homodímeros podem se ligar a vários receptores de membrana, facilitando a sinalização celular e interações célula-célula, permitindo agregação homotípica e heterotípica (COUSIN et al., 2016).

Embora Gal-1 ainda não possua um sinal de secreção conhecido (HUGHES, 2004), ela pode ser encontrada no lado extracelular de todas membranas celulares, bem como, nas matrizes extracelulares de vários tecidos normais e neoplásicos (VAN DEN BRULE et al., 2004; WANG et al., 2015; ARCOLIA et al., 2017). Há evidências de que esta proteína é secretada de forma semelhante ao fator de crescimento de fibroblastos-2 (FGF-2), sendo necessária a presença de proteínas integrais de membranas ainda não identificadas (NICKEL, 2005).

A Gal-1 está envolvida em inúmeros processos fisiológicos, incluindo crescimento de células-tronco, diferenciação de linhagens hematopoiéticas e

diferenciação muscular (CAMBY et al., 2006). Além disso, estudos importantes indicam que a regulação positiva da gal-1 pode influenciar a progressão tumoral (COUSIN et al., 2016; NAM et al., 2017), proliferação celular (ZHANG et al., 2017), angiogênese (VAN et al., 2016; THIJSEN et al., 2014), adesão celular e invasividade (ZHU et al., 2016; CHEN et al., 2015), imunossupressão (HSU et al., 2016) e imunorregulação (HORNUNG et al., 2017).

2.3.1.2 Galectina-4 (Gal-4)

A Gal-4 foi inicialmente isolada como uma proteína de 17 kDa no extrato de intestino delgado de rato (LEFFLER et al., 1989). Posteriormente, foi identificado como um fragmento proteolítico de uma proteína maior de 36 kDa por clonagem gênica (ODA et al., 1993), e encontrado intracelularmente, na superfície celular e na circulação. In vitro, a Gal-4 intracelular regula a proliferação celular, a apoptose e a diferenciação, enquanto a Gal-4 extracelular medeia a adesão intercelular (HUFLEJT et al., 1997; HUFLEJT e LEFFLER, 2003).

Devido à ausência de sequência sinal para o transporte do retículo endoplasmático, a presença de Gal-4 na superfície celular é uma consequência da secreção da via não-clássica. Esta proteína liga-se especificamente aos β -galactosídeos através dos dois CRDs estruturalmente conservados. Os ligantes naturais conhecidos da Gal-4 são antígenos do grupo sanguíneo humano, glicoproteínas, glicoesfingolípídeos e colesterol sulfatado. Além dos β -galactosídeos. Devido à estrutura bivalente ou multivalente e afinidade aos ligantes essa galectina desempenha um papel importante na regulação bioquímica e no desenvolvimento e progressão tumoral (VOKHMYANINA et al., 2012).

A Gal-4 foi identificada como um marcador em membranas resistentes a detergentes, sendo um componente crucial para estabilizar as jangadas lipídicas (DELACOUR et al., 2005). A Gal-4 apresenta um papel contraditório na inflamação intestinal foi afirmado para exacerbar (HOKAMA et al., 2004; HOKAMA et al., 2008) ou melhorar a inflamação (PACLIK et al., 2008). Além disso, a Gal-4 também mostrou papéis contraditórios em diversos tipos de câncer (BELO et al., 2013; MAFTOUH et al., 2014; CAI et al., 2014; HAYASHI et al., 2013). Porém, até o momento não há estudos que demonstrem o papel dessa galectina nas doenças autoimunes reumatológicas.

2.3.1.3 Galectina 7 (Gal-7)

A Gal-7 foi descoberta por Madsen em 1995 na tentativa de isolar novos marcadores envolvidos na manutenção do fenótipo epidérmico humano normal (MADSEN et al., 1995). A proteína é formada por estrutura tridimensional, possuindo algumas regiões de *looping*, onde ocorrem ligações do CRD com resíduos de galactose, galactosamina, lactose e N-acetilamatosamina, podendo ligar-se a um grande número de receptores potenciais como o de outras galectinas, incluindo resíduos de LacNac e resíduos internos de oligossacarídeos LacNac (MASUYER et al., 2012).

Essa lectina possui alto grau de especificidade ao tecido epitelial, sendo especificamente expressa por queratinócitos. Sua expressão foi encontrada restrita principalmente na estratificação de células epiteliais do esôfago, língua, lábio e epiderme, epitélio oral, córnea, corpúsculos de Hassall do timo, o sistema urinário, epitélio escamoso estratificado do estômago e células mioepiteliais mamárias (NIO-KOBAYASHI et al., 2017; SAUSSEZ et al., 2006; PANJWANI et al., 2014).

O papel fisiopatológico dessa galectina está relacionado com a transformação neoplásica e progressão tumoral, através da regulação do crescimento celular, angiogênese, apoptose e migração celular. Ainda, apresentam função na desregulação imune presente em pacientes com doenças reumáticas inflamatórias crônicas (SARTER et al., 2013; GUO et al., 2017).

Pertencente a família protótipo, a Gal-7 não possui um sinal de sequência peptídica necessária para sua secreção e, portanto, pode ser secretada pela via não-clássica por mecanismos ainda desconhecidos (NIO-KOBAYASHI et al., 2017). Esta proteína é codificada pelo gene *LGALS7*, localizado no cromossomo 19q13.2, composto por 4 éxons e 3 introns (KOCA et al., 2016).

2.3.1.4 Galectina-9 (Gal-9)

Originalmente descoberta como um potente quimiotático de eosinófilos, a Gal-9 é atualmente conhecida como um imunomodulador versátil que afeta uma série de tipos de células. Pertencente à família das galectinas de repetições em tandem, é formada por dois CRDs conectados por um domínio de ligação com comprimento variável (HEUSSCHEN et al., 2013).

Foram relatadas três isoformas de Gal-9 que diferem no comprimento do peptídeo ligante: tipo curto (311 AA), tipo médio (323 AA) e tipo longo (355 AA). A Gal-9 também pode formar dímeros ou multímeros estáveis para induzir sinais mais fortes com afinidades diferenciadas. Esse evento de ligação ao CRD é um processo de pH sensível, implicando um papel regulador crucial da acidificação na montagem e desmontagem de redes de galectina-glicano para controle espacial-temporal da transdução de sinal (JOHN et al., 2016).

A Gal-9 intracelular desencadeia a expressão de citocinas pró-inflamatórias em monócitos por ligação ao fator de transcrição NF-IL6, enquanto que a Gal-9 extracelular desencadeia a morte celular de monócitos. A secreção dessa família das galectinas ocorre através de uma via não-clássica, uma vez que as não possuem uma sequência de sinal convencional para o transporte extracelular (FUJIHARA et al., 2013; MERANI et al., 2015; GOLDEN-MASON et al., 2017).

Um importante receptor de superfície celular para a Gal-9 é a imunoglobulina de células T molécula-3, contendo o domínio da mucina (Tim-3). Tim-3 é altamente expresso em células T CD4⁺, células T citotóxicas CD8⁺ e células dendríticas CD11b⁺ (CD), mas não em células Th2 ou macrófagos (LEE et al., 2012; LI et al., 2011; HE et al., 2018). O complexo galectina-9-Tim-3 induz a apoptose de células T citotóxicas CD4⁺ e CD8⁺. O bloqueio desta interação *in vivo* resulta em autoimunidade exacerbada da auto-tolerância (LI et al., 2013).

O estímulo de Tim-3 em monócitos humanos foi relatado por promover a secreção de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF e receptor de sinalização TLR. Nos estágios iniciais da resposta imune é provável que a Tim-3, presente em CDs, promova a inflamação através da sinergia com TLRs. Já nos estágios finais da resposta imune, Tim-3 presente em células Th1 diferenciadas, que também regulam a expressão de Gal-9 pelo IFN- γ liga-se a Gal-9 conduzindo, assim, à morte celular e à inibição da resposta das células Th1 (VEENSTRA et al., 2012; LEE et al., 2012; LI et al., 2011).

O *LGALS9* codifica a Gal-9 e está localizado no cromossomo 17, em seu braço mais longo no loci 11,2 (q11,2). O gene foi submetido à duplicação, com dois genes de codificação de segmentos de Gal-9 no braço mais curto no 11,2 (p11,2). Em humanos, os genes codificados por um braço mais longo são chamados *LGALS9* e aqueles codificados por um braço mais curto são denominados *LGALS9B* e *LGALS9C*. Além da variante de comprimento, duas outras variantes de união do

LGALS9 são frequentemente descritos na literatura, isto é, Gal-9A5 (ou Gal-9M, sem o éxon 5) e Gal-9A5 / 6 (ou Gal-9S, faltando os éxons 5 e 6) (HEUSSCHEN et al., 2013; JOHN et al., 2016).

2.3.2 Galectinas nas doenças autoimunes reumatológicas

As doenças autoimunes reumatológicas são um grupo de doenças relacionadas entre si, que podem envolver qualquer órgão ou sistema do organismo, onde há uma produção de autoanticorpo. Sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo e apresentando uma prevalência maior nas mulheres que homens, acredita-se que o desenvolvimento da autoimunidade possa estar relacionada pela predisposição genética, fatores ambientais.

Essas doenças possuem mediadores, citocinas, vias e células que favorecem a progressão e o entendimento dessas patologias. Outras proteínas e células estão sendo estudadas, a fim de buscar uma melhor compreensão do desenvolvimento e tratamento dessas patologias (SARTER et al., 2013; WANG et al., 2017; KOCA et al., 2014).

A Gal-1 emergiu como uma importante molécula imunorreguladora que exerce sua ação, através do controle da diferenciação e ativação de células T, apoptose específica para células Th1 e Th17, indução e regulação entre células apresentadoras de antígenos e células T (MOULTON et al., 2011; DE LA FUENTE et al., 2014). HSU et al., (2012), mostraram que a deficiência de Gal-1 foi responsável por promover sintomas clínicos das DAIs em modelos de animais (ratos), e o tratamento com Gal-1 mostrou ser benéfico nesse modelo.

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) apresenta uma patologia das células T muito complexa, onde há alterações generalizadas da transdução de sinal, proliferação celular defeituosa, viabilidade celular diminuída, maior sobrevivência e atividade de células T autoreativas, células pró-inflamatórias e função de Treg defeituosa (GARIN et al., 2007). Ainda, não está claro, mas a Gal-1 pode antagonizar o CD28 nas células T, assim como, seu efeito antiproliferativo e possível função inibitória das Tregs (CHUNG et al., 2000).

Enquanto HORNUNG et al., (2017) colocaram a Gal-1 no grupo de moléculas patogênicas no LES, por estar relacionada com a falha na supressão da atividade da IL-17, diminuição da supressão da via PI3K-mTOR por fosfatase, ativação

defeituosa da proteína quimera ativada por mitógenos (FAJKA-BOJA et. l., 2002; HORNUNG et al., 2017).

Estudos demonstraram que a Gal-1 apresentou-se reduzida no tecido sinovial de pacientes com longa duração da artrite idiopática juvenil (IQBAL et al., 2013; HUANG et al., 2012). Além disso, a expressão de Gal-1 nunca foi encontrada nas cartilagem de pacientes com AR. Embora os níveis plasmáticos de Gal-1 sejam comparáveis entre pacientes com AR e controles saudáveis, a sua concentração no líquido sinovial é significativamente comparáveis (XIBILLÉ-FRIEDMANN et al., 2013).

Os níveis reduzidos de Gal-1 no líquido sinovial correlacionam-se aos níveis aumentados de autoanticorpos anti-Gal-1 e anticorpos anti peptídeos citrulinados cíclicos (anti-CCP) em pacientes com AR. Esses estudos clínicos confirmaram o potencial envolvimento da Gal-1 na patogênese da AR e indicam a Gal-1 no líquido sinovial como um possível biomarcador para o prognóstico da AR (LI et al., 2013).

Enquanto que na ES, a Gal-1 apresenta uma função protetora contra o desenvolvimento da vasculopatia digital. Além disso, os níveis séricos de Gal-1 podem ser útil para a estratificação de risco para o desenvolvimento de vasculopatia digital na fase inicial da doença (YANABA et al., 2016).

A função imunorreguladora da Gal-4 ainda permanece ambígua. No entanto, estudos mostraram que essa galectina pode se ligar ao CD14 nos monócitos e induz sua diferenciação em células semelhantes a macrófagos através da via de sinalização da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK). Além disso, foi identificado que a Gal-4 induz alterações nos monócitos, modificando a expressão de várias moléculas de superfície e levando à alterações funcionais, tais como aumento da produção de citocinas e expressão de metaloproteinases de matriz e capacidade fagocitária reduzida (HONG et al., 2019).

Até o momento não há relatos do papel da Gal-4 nas doenças autoimunes reumatológicas. Porém, a Gal-4 tem sido descrita como um fator importante que está relacionado à imunidade da mucosa. Foi demonstrado que essa galectina exacerba a inflamação estimulando diretamente as células T CD4⁺ para produzir IL-6 no modelo de colite mutacional (HOKAMA et al., 2004). A Gal-4 pode interagir diretamente com as células T CD4⁺ através da ligação à sinapse imunológica, que é um ativador específico da PKC (NAGAHAMA et al., 2008). Através da ativação da

via associada à PKC, a Gal-4 estimula a produção de IL-6, portanto, exacerba a inflamação intestinal.

PACLIK D et al., (2008) demonstraram que a Gal-4 pode induzir a apoptose de células T por ligação ao epítipo de CD3 na superfície de células T no modelo de colite de tipo selvagem. Uma vez ligada a este epítipo, a Gal-4 promove a apoptose de células T de maneira dependente de calpaína e reduz a secreção de citocinas incluindo IL-6, IL-8, IL-10 e IL-17 e, em seguida, melhorando a inflamação.

Porém, outro estudo desmonstrou que o papel da Gal-4 variava em diferentes modelos de colite. Dessa forma, a Gal-4 apresenta um papel ambíguo, podendo exacerbar a inflamação intestinal no modelo de colite mutacional, ou melhorar a inflamação intestinal no modelo de colite de tipo selvagem (MATHIEU et al., 2008).

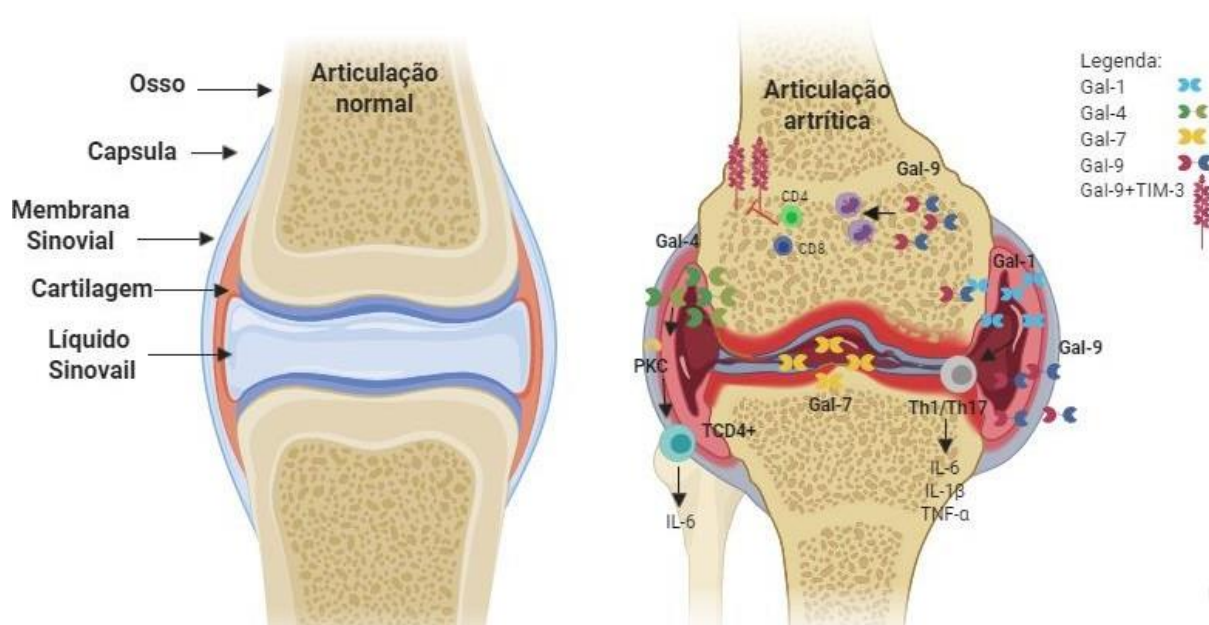
Apenas um estudo avalia a presença da Gal-7 nas doenças autoimunes reumatológicas, o qual sugere que os autoanticorpos para Gal-7 presente no soro podem contribuir para a desregulação celular que ocorre no LES (SARTER et al., 2013). Essa galectina induz uma diminuição no complexo TIM-3⁺ Th1 e Th17 como Th17 e Tregs, vias críticas para a patogênese do LES (MORITOKI et al., 2013; JIAO et al., 2016).

Estudos observaram uma diminuição da sinalização do complexo Gal-9-Tim-3 em pacientes com AR. Os níveis de expressão de Tim-3 em células T CD4⁺ de pacientes com AR foram menores em comparação com controles saudáveis, levando à apoptose mediada por Gal-9 de células T CD4⁺ (LEE et al., 2011; 2012). A Gal-9 pode regular negativamente a AR, induzindo diferenciação de células T naíve para Tregs e, assim, induzir a apoptose de TIM-3⁺ Th1 e células Th17 pró-inflamatórias (SEKI et al., 2007). Gal-9 também induz apoptose de sinoviócitos hiperproliferantes nas juntas de pacientes com AR, o que, consequentemente, diminui os níveis de citocina pró-inflamatória, como a IL-6, melhorando as manifestações clínicas da doença (JOHN et al., 2016).

A Gal-9 induz o desequilíbrio imunológico por regulação negativa das células Th1/Th17 em doenças inflamatórias. Os níveis séricos dessa galectina foram significativamente elevados nos pacientes com ES e correlacionaram-se positivamente com o escore da pele. A Gal-9 apresentou uma alta produção nos fibroblastos dérmicos, com supressão da expressão de interferon- γ de células TCD4⁺ na pele, promovendo o desenvolvimento da fibrose (SAIGUSA et al., 2017). A

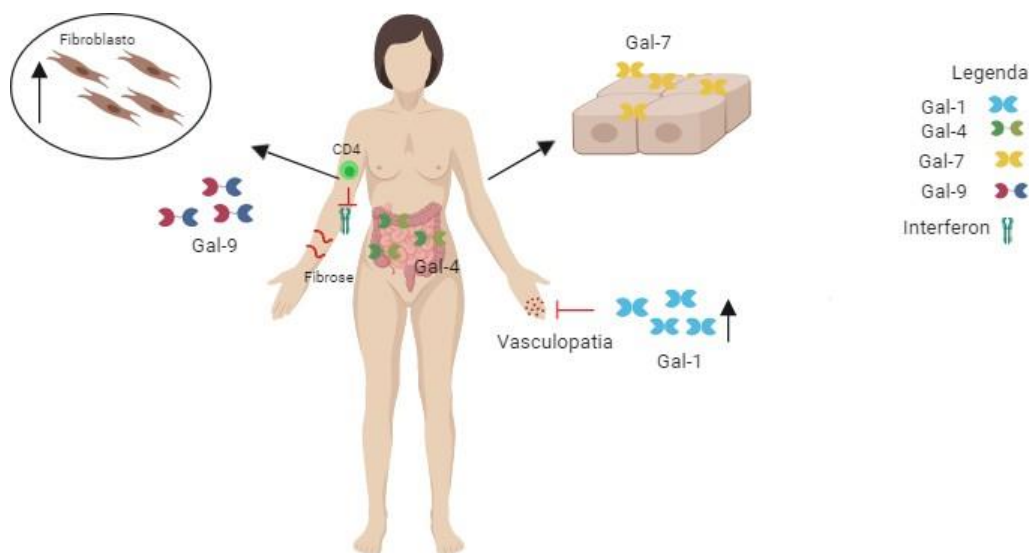
presença das galectinas na AR e ES estão demonstradas nas figuras 4 e 5, respectivamente.

Figura 4 – Representação da presença das galectinas na AR.



Fonte: Adaptado do BioRender®.

Figura 5 – Representação da presença das galectinas na ES.



Fonte: Adaptado do BioRender®.

Por possuírem etiologia ainda desconhecida, cada vez mais os mecanismos genéticos vêm sendo estudados a fim de compreender melhor a patogênese dessas doenças, através de polimorfismos que possam estar associados com a suscetibilidade. A presença das galectinas nas doenças autoimunes estão resumidas na tabela 1.

Tabela 1 - Galectinas nas doenças autoimunes.

Galectina	Doença Autoimune	Associações	Referencias
Galectina-1	AR	Os níveis de Gal-1 foram significativamente reduzidos no líquido sinovial em pacientes com AR.	XIBILLÉ-FRIEDMANN et al.,2014
	LES	A presença de Gal-1 juntamente com CD43 participam da modulação do sistema imunológico,contribuindo para a desordem imune presente no LES.	MONTIEL et al.,2010
	ES	Gal-1 é um fator protetor contra o desenvolvimento da vasculopatia digital. Além disso, os níveis séricos de Gal-1 pode ser útil para a estratificação de risco para o desenvolvimento de vasculopatia digital.	YANABA et al.,2016
Galectina-7	LES	Auto-anticorpos para Gal-7 presente no soro podem contribuir para a desregulação celular que ocorre no LES.	SARTER et al.,2013
Galectina-9	AR	Indução de apoptose de sinoviocitos hiperproliferantes, diminuição dos níveis de citocina pró-inflamatória, além da diminuição da sinalização do complexo Gal-9-Tim-3.	LEE et al.,2012; JOHN et al., 2016
	LES	O aumento da regulação da expressão de Tim-3 e Gal-9 foi relacionado com os escores de SLEDAI. A presença do anticorpo bloqueador de Gal-9 inibiu a proliferação de PBMC estimulada por CD3 e citocinas derivadas de Th1, Th2, Th17 e IL-6.	MORITOKI et al., 2013; JIAO et al., 2016
	ES	Alta produção nos fibroblastos, com supressão da expressão de IFN- γ de células TCD4 ⁺ na pele, promovendo o desenvolvimento da fibrose.	SAIGUSA et al., 2017

Fonte: da autora.

2.3.3 Polimorfismos nas galectinas

Os SNPs encontram-se amplamente distribuídos ao longo do genoma, mais de dez milhões de SNPs existentes são atualmente conhecidos, segundo dados do *The International HapMap* 2019. SNP é a variação na sequência de DNA que ocorre quando um único nucleotídeo (A, T, C, ou G) em uma determinada sequência é alterado. Esta alteração difere entre indivíduos da mesma espécie ou entre os cromossomos homólogos de um mesmo indivíduo. Os SNPs são os polimorfismos de DNA mais abundantes no genoma humano e estão presentes numa frequência alélica mínima de 1 a 5% na população (JOOSTEN LA et al., 2004).

Uma vez que diversos polimorfismos genéticos vêm sendo relacionados a um aumento no risco de ocorrência e/ou recorrência de uma série de patologias multifatoriais, que pode levar à susceptibilidade de um indivíduo. Os polimorfismos das galectinas vêm sendo cada vez mais associados com o desenvolvimento e progressão de várias doenças (CHEN et al., 2015; HU et al., 2011; CHEN et al., 2012; DJORDJEVIC et al., 2016; ROSEN et al., 2016).

No gene da Gal-1 (*LGALS1*), o rs13057866 está associado com a suscetibilidade à influenza A (H7N9) em humanos (CHEN et al., 2015). Já o rs4820294 foi associado ao desenvolvimento de diabetes gestacional (BLOIS et al., 2014). Na miastenia grave, o rs4820293 da *LGALS1* possui uma interação com o rs743777 do receptor de interleucina 2 β (IL2R β), sugerindo um papel dessas proteínas nessa rara doença (PÁL et al., 2010).

Os polimorfismos presentes no gene da Gal-3 (*LGALS3*) vêm sendo estudados em diversas doenças, devido sua função na modulação da inflamação e apoptose celular. Podemos destacar os rs4644 e rs4652, correspondentes a *LGALS3* +191 e +292, que podem contribuir para o desenvolvimento da AR (HU et al., 2011).

O rs4652 foi associado com o risco de desenvolver AR na população iraniana (ATABAKI et al., 2017); a associação dos níveis séricos de Gal-3 com os rs4644 e rs4652, pode constituir um fator de susceptibilidade para infecção do trato respiratório e crise vaso oclusiva em crianças com anemia falciforme (MENDONÇA BELMONT et al., 2016); e o rs4644 foi associado à classificação do tumor e ao prognóstico dos gliomas (CHEN et al., 2012). Já os rs2274273 e rs17128183, foram descritos por não estarem associados com o risco de complicações relacionadas à

aterosclerose carotídea avançada, no entanto essas variantes podem alterar os níveis circulantes de expressão de *LGALS3* (DJORDJEVIC et al., 2016).

Enquanto o *LGALS7* não possui, até o momento, estudos de associação de polimorfismos, dois SNPs (rs4239242 e rs4794976) no *LGALS9* foram associados com um risco aumentado de doença hepática alcoólica (ROSEN et al., 2016). Os estudos de avaliação de SNPs das galectinas nas doenças reumáticas ainda são muito escassos.

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar os níveis séricos das galectinas -1, -4, -7 e -9 e polimorfismos da *LGALS9*, bem como seus níveis séricos e manifestações clínicas avaliando suas associações clínicas e laboratoriais em pacientes com AR e ES.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.2.1** Determinar os níveis séricos das galectinas-1, -4, -7 e -9 em pacientes portadores de AR, e ES e grupo controle.
- 3.2.2** Determinar as frequências alélicas e genotípicas dos SNPs da galectina 9 (rs4795835, rs3763959 e rs4239242) em pacientes portadores de AR, ES e grupo controle.
- 3.2.3** Verificar a associação entre os níveis séricos da Gal-9 e os SNPs (rs4795835, rs3763959 e rs4239242) em pacientes portadores de AR, ES e grupo controle.
- 3.2.4** Verificar a associação entre os SNPs (rs4795835, rs3763959 e rs4239242) e manifestações clínicas em pacientes portadores de AR e ES.
- 3.2.5** Verificar a associação dos níveis séricos das galectinas -1, -4, -7 e -9 com manifestações clínicas e laboratoriais em pacientes com AR e ES.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 POPULAÇÃO E LOCAL DO ESTUDO

Foram recrutados do Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, 229 pacientes com AR, 82 ES, de acordo com os critérios de inclusão e exclusão de cada doença. O grupo controle consistiu de 170 voluntários sadios, pareados por sexo e idade entre os grupos das doenças, sem diagnóstico de qualquer doença reumatológica, imunoinflamatória ou de imunodeficiências.

4.1.1 Critérios de inclusão

Casos: Para os pacientes com AR, os critérios de inclusão consistiram em pacientes que possuem pelo menos uma articulação com sinovite clínica definida (inchaço) e com a sinovite não melhor explicada por outra doença. Além de envolvimento conjunto das articulações; sorologia (FR e ACPA); presença de reagentes de fase aguda (PCR E VHS) e duração dos sintomas.

Para os pacientes com diagnóstico de ES, os critérios de inclusão basearam-se em espessamento de pele dos dedos de ambas as mãos que se estendem próximo às articulações metacarpofalângicas; lesões na ponta dos dedos; telangiectasia; capilares anormais; hipertensão pulmonar e/ou doença pulmonar intersticial; fenômeno de Raynaud; presença de anticentromero, anti-topoisomerase I (anti-Scl-70), e anti-RNA polimerase III. E, em ambos os casos, maiores de 18 anos e que não tenham o diagnóstico de nenhuma doença autoimune de acordo com o ACR ou ACR/EULAR.

Controles: Voluntários saudáveis sem diagnóstico conhecido de outra doença reumatológica imunoinflamatória ou de imunodeficiências.

4.1.2 Critérios de exclusão

Casos: Pacientes com quadro de infecção, gravidez, neoplasia, idade inferior a 18 anos e que não tinham o diagnóstico de nenhuma doença autoimune de acordo

com o ACR ou ACR/EULAR. Grupo controle: Voluntários com diagnóstico conhecido de outra doença reumatológica imunoinflamatória ou de imunodeficiências.

4.2 COLETA E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Foram coletados 15 ml de sangue total em tubos de EDTA e tubos sem anticoagulante. A coleta do material biológico foi realizada no Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da UFPE. O material coletado foi encaminhado ao Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT) do Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica (NUPIT) da UFPE.

4.3 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

No referido laboratório, o DNA das amostras foi extraído e armazenado à -80°C. Embora exista um grande número de métodos empregados para a extração de DNA, a partir de amostras biológicas, utilizamos a técnica de extração “In House” pela metodologia padrão de fenol-clorofórmio. Esse método tem como base três passos fundamentais, sendo o primeiro a lise das membranas plasmáticas e nucleares das células, o segundo a degradação de proteínas e o terceiro a purificação e solubilização do DNA (DAVIS et al., 1986).

As amostras coletas em tubo de EDTA foram centrifugadas a 2500g por 10 minutos, o plasma foi coletado e armazenado à -80°C. Em seguida, as hemácias foram lisadas com uma solução de lise e centrifugadas a 2500g por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi transferido para um tubo de 15 ml, onde 5 ml de tampão de pouco sal mais uma gota de triton foram adicionados para a lavagem das células, sendo novamente centrifugadas a 2500g por 10 minutos. O sobrenadante foi novamente desprezado e adicionou-se 1 ml de tampão de pouco sal, transferindo o pellet para um microtubo, que foi centrifugado a 12000g por 5 minutos.

O sobrenadante foi desprezado e o pellet foi dissolvido delicadamente em 400µl de tampão com alta concentração de sal, 25µl de SDS 10%, 30µl de proteinase K. Por fim, a solução foi incubada a 60°C por 1 hora, e em seguida foram adicionados 180µl de NaCl 5M à solução, a qual centrifugada a 12000g por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo e misturado a 400µl de

clorofórmio/álcool isoamílico e 400µl de fenol saturado. A solução foi centrifugada a 12000g por 5 minutos, o sobrenadante contendo o DNA foi transferido para outro microtubo, onde foram adicionados mais 800µl de clorofórmio/álcool isoamílico (centrifugação a 12000g por 5 min). O sobrenadante foi novamente retirado e colocado em novo microtubo, onde foi acrescentado 10% do seu volume com acetato de sódio 3M e 800µl de etanol absoluto gelado, em seguida centrifugado a 12000g por 5 min. O sobrenadante foi descartado, sendo adicionado 500µl de etanol a 70% gelado, repetindo as condições da centrifugação e deixar o DNA secando em temperatura ambiente, em seguida o DNA foi ressuspensionado em 50µl água de injeção.

4.3.1 Determinação da concentração de DNA das amostras

A quantificação da concentração de DNA de cada amostra foi realizada com auxílio do NanoDrop 1000 (Thermo Scientific), utilizando 1µL da amostra de DNA.

4.4 SELEÇÃO DOS POLIMORFISMOS

Os polimorfismos foram selecionados, através do site <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>, levando em consideração a Frequência do Alelo Menor (MAF) maior que 0,1 na população europeia (CEU). Os SNPs presentes na região promotora, nos introns e exons foram selecionados através do site: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Somente os SNPs validados foram considerados. Outro fator importante para a seleção dos SNPs foi à pesquisa de trabalhos descritos na literatura que encontraram associação de polimorfismos em alguma doença de caráter inflamatório. Dessa forma, três SNPs na região intrônica para *LGALS9* foram selecionados: rs4795865, rs3763959, rs4239242. Os SNPs selecionados e genotipados para os pacientes com AR, e o grupo controle estão listados na tabela 2.

Tabela 2 - SNPs do *LGALS9* selecionados

Gene	SNP	Cromossomo	Posição	Bases
<i>LGALS9</i>	rs4795835	17:25970778	Intron	C/T
	rs3763959	17:25957334	Intron	A/G
	rs4239141	17:43554902	Intron	A/T

Fonte: da autora.

4.5 GENOTIPAGEM

Para a determinação do genótipo dos polimorfismos selecionados, as amostras de DNA foram submetidas à amplificação pelo método PCR em tempo real.

4.5.1 Reação em Cadeia Polimerase (PCR)

A PCR (reação em cadeia da polimerase) é um método de criação de múltiplas cópias de um fragmento específico de DNA *in vitro*. A síntese de fragmentos de DNA necessita da utilização de um mix contendo os elementos básicos: desoxirribonucleotídeos trifosfatos (dATP, dGTP, dTTP e dCTP), DNA polimerase (Taq), iniciadores e uma solução tampão. A amplificação dos fragmentos de DNA foi realizada utilizando-se o sistema TaqMan® (empresa- Life Tech). Esse sistema utiliza, além dos p iniciadores, uma sonda (oligonucleotídeo) contendo um fluoróforo ligado a sua extremidade 5' e um quencher ligado a extremidade 3'. Essa sonda liga-se a uma região do DNA posterior ao iniciador. Quando a sonda está intacta, ocorre a transferência de energia entre o fluoróforo e o quencher não havendo, dessa forma, emissão de fluorescência. Entretanto, quando a Taq polimerase começa a sintetizar o fragmento de DNA, a partir do iniciador, sua extremidade 3', com ação de exonuclease, sendo capaz de clivar a sonda e separar o fluoróforo do quencher havendo, dessa forma, liberação de um sinal fluorescente.

Este sinal, por sua vez, é capturado por uma câmera presente no aparelho de PCR em tempo real. Cada alelo possui uma sonda fluorescente diferente, sendo

possível determinar os genótipos de cada polimorfismo estudado de acordo com a(s) fluorescência(s) produzida(s). As amostras foram diluídas em água ultra pura DNA/RNaseFree, tendo o sistema de detecção TaqMan® SNP Genotyping assay e a sonda específica, detalhadas na tabela 3.

Tabela 3 - Reagentes utilizados na reação em cadeia da polimerase (PCR)

Reagentes utilizados na RT-PCR	Quantidade por poço
DNA Genômico	20ng
Água ultra pura DNA/RNase Free	7 µL
TaqMan® SNP Genotyping assay	0,324 µL
Genotyping Master Mix	3,24 µL

Fonte: da autora.

A reação de PCR foi realizada utilizando o termociclador StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystem) e consistiu em uma desnaturação inicial a 95°C por 10min, seguida por 40 ciclos de 95° C por 15 segundos e 60° C por 1 min. Essas reações foram realizadas em placas de 96 poços.

4.6 DOSAGEM DAS GALECTINAS

As amostras coletadas em tubo sem anticoagulante foram centrifugadas a 2500g por 10 minutos para separação do soro, e posteriormente armazenados à -80°C. As galectinas -1, -4, -7 e -9 presente no soro dos pacientes e dos controles saudáveis foram quantificadas por ELISA sanduíche, tendo como limite de detecção respectivamente 156,25 pg/ml, 15,625 pg/ml, 78,125 pg/ml e 46,87pg/ml , seguindo as informações recomendadas pelo fabricante (R&D Systems).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O estudo conduzido nesta tese foi do tipo caso-controle, o teste estatístico utilizado foi o qui-quadrado (X^2) (Chi-Square Test). Uma vez estabelecida a associação, o seu efeito foi descrito pela odds ratio. Para avaliar o equilíbrio de Hardy-Weinberg utilizamos o site: <http://oege.org/software/hardy-weinberg.html> (SANTIAGO et al., 2009).

Para a comparação das variáveis contínuas, entre dois grupos, foi aplicado o teste t Student ou teste não paramétrico Mann-Whitney e para comparação entre mais de dois grupos será aplicado o teste ANOVA ou Kruskal-Wallis, quando apropriado. Todos os gráficos foram elaborados pelo software Graph Pad Prism versão 6.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES

Um total de 356 indivíduos foram genotipados para *LGALS9* e o soro dosado para Gal-9, entre os quais 156 pacientes com AR e 200 controles pareados por idade e sexo. A idade média dos pacientes com AR e controles foi de $52,15 \pm 12,10$ anos e $48,01 \pm 12,40$ anos. As frequências genotípicas de rs4239242, rs3763959 e rs4795835 foram analisadas de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg (todos $p > 0,05$). Os dados clínicos dos pacientes foram descritos na tabela 4.

Em relação ao grupo de pacientes com ES, um total de 82 pacientes e 138 controles, foram genotipados para *LGALS9* e o soro dosado para Gal-9, pareados por idade e sexo. A idade média dos pacientes com ES e controles foi de $52,15 \pm 9,52$ anos e $48,01 \pm 10,78$ anos. As frequências genotípicas de rs4239242, rs3763959 e rs4795835 para os pacientes de ES também foram analisadas de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg (todos $p > 0,05$). No entanto a população não se encontrou no equilíbrio de Hardy-Weinberg sendo excluídas das análises. Os dados clínicos dos pacientes estão descritos na tabela 5.

Tabela 4 - Parâmetros demográficos e clínicos de pacientes genotipados com AR e grupo controle para genotipagem.

Dados Clínicos	
Nº de controles	200
Mulheres/ Homens	163/37
Média de idade (min-max)	48.01 (19-82)
Nº de pacientes	156
Mulheres/ Homens	152/4
Média de idade (min-max)	52.15 (25-77)
DAS28 (%)	
Remissão ou baixa atividade da doença	72 (46.15)
Atividade moderada da doença	47 (30.12)
Alta atividade da doença	37 (23.71)
CDAI (%)	
Remissão ou baixa atividade da doença	95 (58.97)
Atividade moderada da doença	31 (19.87)
Alta atividade da doença	30 (19.23)
HAQ	
<1	50 (32.05)
>1	106 (67.94)
Fator Reumatoide (%)	
Positivo	89 (57.05)
Negativo	37 (23.71)
Erosões (%)	
Presença	87 (55.76)
Ausência	53 (33.97)
Velocidade de hemossedimentação de eritrócitos (VHS – mm/h)	36.54 (0-125)
DMARD	
Leflunomida	29
Hidroxicloroquina	4
Metotrexato	78
Prednisona	45

Tabela 5 - Parâmetros demográficos e clínicos de pacientes genotipados com ES e grupo controle para genotipagem.

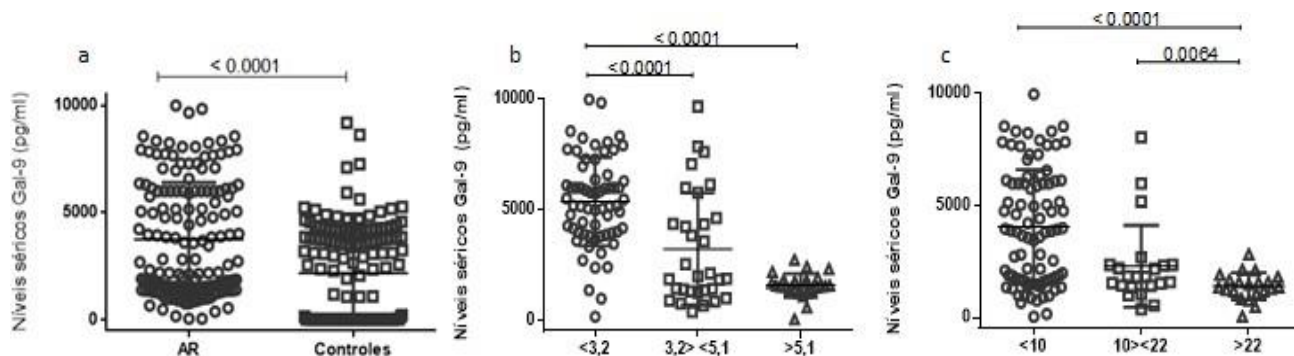
Dados Clínicos	
Nº de controles	170
Mulheres/ Homens	137/33
Média de idade (min-max)	49.4 (19-82)
Nº de pacientes	82
Mulheres/ Homens	73/9
Média de idade (min-max)	48.2 (20-81)
Variáveis	
Subtipo Cutâneo Limitado, <i>n</i> (%)	41 (50%)
Subtipo Cutâneo Difuso, <i>n</i> (%)	41 (50%)
Anticorpo Anti-SCL70 positivo, <i>n</i> (%)	20 (16%)
Anticorpo Anti-centrômero positivo, <i>n</i> (%)	4 (3.2%)
Rodnan	18.4 ±12.68
Fibrose intersticial pulmonar, <i>n</i> (%)	13 (37.28%)
Envolvimento gastrointestinal, <i>n</i> (%)	57 (94.91%)

5.2 CARACTERIZAÇÃO DO LGALS9 COM NÍVEIS SÉRICOS DA GAL-9 E CORRELAÇÕES CLÍNICAS

5.2.1 Artrite reumatoide

Avaliamos os níveis séricos de Gal-9 entre os pacientes com AR e grupo controle. Os pacientes com AR apresentaram altos níveis de Gal-9 quando comparados aos controles (mediana 27,82 pg / ml; $p < 0,0001$) (figura 6a). Pacientes em remissão e baixa atividade ($\text{DAS28} \leq 3,2$) apresentaram níveis elevados de Gal-9 em comparação com o grupo de atividade moderada ($\text{DAS28 } 3,2 > \leq 5,1$) ($p < 0,0001$). Observou-se também o grupo em remissão em relação ao grupo com alta atividade da doença ($\text{DAS28} > 5,1$) ($p < 0,0001$) (figura 6b). Em relação ao CDAI, os pacientes em remissão ou baixa atividade clínica da doença ($\text{CDAI} < 10$) apresentaram altos níveis da Gal-9 quando comparados aos grupos em moderada e alta atividade, respectivamente ($p < 0,0001$; $p = 0,0064$).

Figura 6- Associação dos níveis séricos de Gal-9 em pacientes com AR. (a) níveis séricos de galectina-9 em pacientes com AR e grupo controle. (b) associação dos níveis séricos de Gal-9 com escore de atividade da doença (DAS28). (c) associação dos níveis séricos de galectina-9 com o Índice de Atividade de Doença Clínica (CDAI).



Fonte: da autora.

Como frequências genótípicas de rs4239242, rs3763959 e rs4795835 foram distribuídos de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg (todos $p > 0,05$), as frequências dos genótipos e alelos em pacientes com AR e os controles são mostrados na tabela 6. O genótipo TT do rs4239242 apresentou associação positiva com AR (15,59% em pacientes com AR e 5,20% em controles, $p = 0,0032$, odds ratio = 0,28; 95% IC = 0,12-0,64). O genótipo CT apresentou prevalência no grupo controle (66,14%) em comparação com AR (19,26%, $p = 0,0001$, odds ratio = 7,99; IC95% = 4,59-13,91). Para o genótipo AA do rs3763959, encontramos uma possível associação negativa com AR 6,67% nos pacientes com AR e 15,10% nos controles, $p = 0,040$, odds ratio = 2,49; IC95% = 1,05-5,90). Já os homozigotos GG foram prevalentes em pacientes com AR (55,23%) em comparação com o grupo controle (34,89%, $p = 0,0009$, odds ratio = 0,43; 95% IC = 0,26-0,70). O genótipo AG (rs3763959) tem sido associado com uma maior presença de erosões ósseas em pacientes com AR ($p = 0.0436$). Não encontramos diferenças alélicas e genótípicas do rs4795835 com AR e os controles (tabela 6).

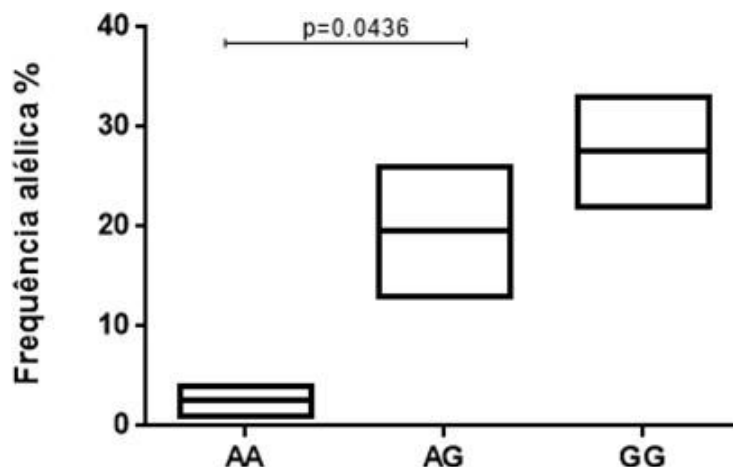
Tabela 6 - Distribuição dos alelos e genótipos *LGALS9* em pacientes com AR e indivíduos saudáveis.

<i>SNP</i>	<i>RA</i>		<i>Controles</i>		<i>p-value</i>	<i>RR</i>	<i>OR (95%IC)</i>
<i>rs4795835</i>	<i>(N=154)</i>	%	<i>(N=195)</i>	%			
CC	103	66.88	109	55.89	0.063	0.83	0.65 (0.42-1.01)
CT	44	28.57	80	41.03	0.025	1.25	1.69 (1.08-2.64)
TT	7	4.54	6	3.07	0.415	0.76	0.59 (0.20-1.75)
CT + TT	51	33.11	86	44.10	0.063	1.20	1.52 (0.98-2.34)
C- alelo	250	81.16	298	76.41	0.233	0.90	0.79 (0.54-1.13)
T-alelo	58	18.83	92	23.58	0.233	1.10	1.26 (0.87-1.81)
<i>rs3763959</i>	<i>(N=105)</i>	%	<i>(N=192)</i>				
AA	7	6.67	29	15.10	0.040	1.29	2.49 (1.05-5.90)
AG	40	38.09	96	50	0.052	1.18	1.62 (1.00-2.63)
GG	58	55.23	67	34.89	0.0009	0.73	0.43 (0.26-0.70)
AG + GG	98	93.33	163	84.89	0.040	0.77	0.40 (0.16-0.95)
A-alelo	54	25.71	154	40.10	0.0001	1.83	4.20 (2.90-6.09)
G-alelo	156	74.28	230	59.89	0.0004	1.55	1.93 (1.33-2.80)
<i>rs4239242</i>	<i>(N=109)</i>	%	<i>(N=192)</i>				
TT	17	15.59	10	5.20	0.0032	0.54	0.28 (0.12-0.64)
TC	21	19.26	127	66.14	0.0001	2.03	7.99 (4.59-13.91)
CC	71	65.13	55	28.64	0.0001	0.55	0.22 (0.13-0.36)
TC + CC	92	84.40	182	94.79	0.0054	1.79	3.36 (1.48-7.64)
T-alelo	55	25.22	147	38.28	0.0019	1.21	1.77 (1.23-2.55)
C-alelo	163	74.77	237	61.71	0.0019	0.82	0.56 (0.39-0.80)

Fonte: da autora.

Em relação ao CDAI, altos níveis da Gal-9 foram detectados nos pacientes em remissão ou baixa atividade da doença (CDAI <10), quando comparados aos pacientes em alta atividade (CDAI > 22) ($p < 0,0001$). Também avaliamos pacientes com atividade moderada (CDAI > 10 < 22) e CDAI > 22, onde, os pacientes em atividade moderada tiveram um valor mais alto da Gal-9, em comparação com os pacientes que estavam em maior gravidade da doença ($p = 0,0064$) (figura 6c). Não encontramos significância entre os parâmetros clínicos, como: HAQ, FR, VHS, DAS28, e o soro desses pacientes. No entanto, o genótipo AG (rs3763959) foi possivelmente associado a uma maior presença de erosão óssea em pacientes com AR ($p = 0,0436$) (figura 7).

Figura 7- Erosão estratificada por genótipos de polimorfismos do gene *LGALS9* (rs3763959) em pacientes com AR.



Fonte: da autora.

5.3 CARACTERIZAÇÕES DOS NÍVEIS SÉRICOS DAS GALECTINAS -1, -4 E -7 E CORRELAÇÕES CLÍNICAS

Foram realizadas as dosagens séricas das galectinas -1, -4 e -7, em 229 pacientes com AR (220 mulheres e 9 homens) e 170 controles (137 mulheres e 33 homens), com média de idade $55,66 \pm 6$ e $49,57 \pm 13,96$ anos, respectivamente. As características básicas dos sujeitos do estudo são mostradas na tabela 6.

Além de 82 pacientes com ES (73 mulheres e 9 homens, média de idade $81 \pm 12,76$ anos), no qual 41 pacientes foram classificados em grupos cutâneos difusos (CD, n = 41) e cutâneos limitados (DL; n = 41). Já o grupo controle consistiu de 170 indivíduos saudáveis (137 mulheres e 33 homens, média de idade $81 \pm 16,20$ anos) (Tabelas 7 e 8, respectivamente).

Tabela 7- Parâmetros demográficos e clínicos de pacientes com níveis séricos dosados com AR e grupo controle.

Dados Clínicos	
Nº de controles	170
Mulheres/ Homens	137/33
Média de idade (min-max)	49.44 (19-82)
Nº de pacientes	229
Mulheres/ Homens	220/9
Média de idade (min-max)	52.66 (18-78)
DAS28 (%)	
Remissão ou baixa atividade da doença	114 (49.78)
Atividade moderada da doença	70 (30.56)
Alta atividade da doença	45 (19.65)
CDAI (%)	
Remissão ou baixa atividade da doença	158 (68.99)
Atividade moderada da doença	40 (17.46)
Alta atividade da doença	31 (13.53)
HAQ	
<1	64 (27.94)
>1	121 (52.83)
Fator Reumatoide (%)	
Positivo	130 (56.76)
Negativo	76 (33.18)
Erosões (%)	
Presença	101 (44.10)
Ausência	74 (32.31)
Velocidade de hemossedimentação de eritrócitos (VHS – mm/h)	33.01 (0-125)

Tabela 8- Parâmetros demográficos e clínicos de pacientes com níveis séricos dosados com ES e grupo controle.

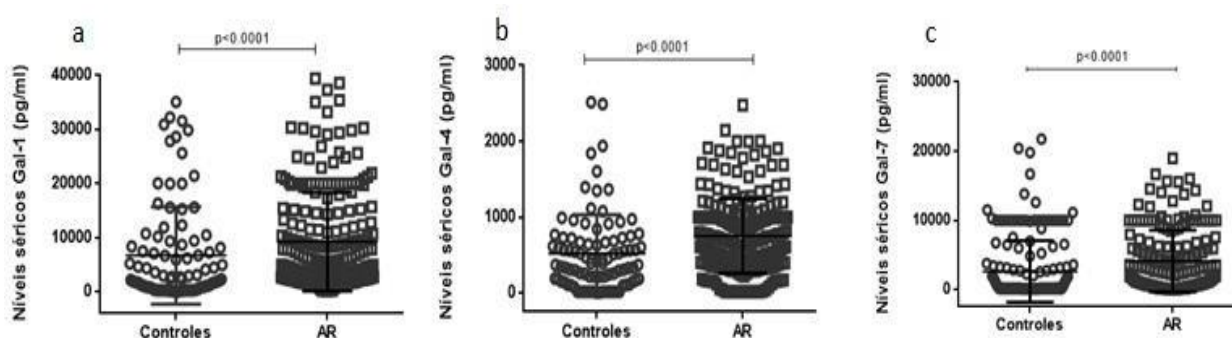
Dados Clínicos	
Nº de controles	170
Mulheres/ Homens	137/33
Média de idade (min-max)	49.4 (19-82)
Nº de pacientes	82
Mulheres/ Homens	73/9
Média de idade (min-max)	48.2 (20-81)
Variáveis	
Subtipo cutâneo limitado, <i>n</i> (%)	41 (50%)
Subtipo cutâneo difuso, <i>n</i> (%)	41 (50%)
Anticorpo Anti-SCL70 positivo, <i>n</i> (%)	20 (16%)
Anticorpo Anti-centrômero positivo, <i>n</i> (%)	4 (3.2%)
Rodnan	18.4 ±12.68
Fibrose intersticial pulmonar, <i>n</i> (%)	13 (37.28%)
Envolvimento gastrointestinal, <i>n</i> (%)	57 (94.91%)

5.3.1 Artrite reumatoide

Um total de 229 pacientes com AR (220 mulheres, 9 homens) e 170 controles (137 mulheres e 33 homens), com média de idade $55,66 \pm 6$ e $49,57 \pm 13,96$ anos, respectivamente. As características básicas dos sujeitos do estudo são mostradas na tabela 6. Os níveis séricos das galectinas foram detectados em pacientes quando comparados ao grupo controle (Gal-1: $p < 0,0001$; mediana = 5435 pg / ml, Gal-4: p

$<0,0001$; mediana = 702,30 pg / ml e Gal-7: $p <0,0001$; mediana = 2134 pg / ml) (Figura 8).

Figura 8 – Associação das galectinas -1, -4 e -7 nos pacientes com AR e grupo controle. (a) Comparação dos níveis séricos de Gal-1 nos pacientes e controles ($p <0,0001$); (b) Comparação dos níveis séricos de Gal-4 nos pacientes e controles ($p <0,0001$); (c) Comparação dos níveis séricos de Gal-7 nos pacientes e controles ($p <0,0001$).

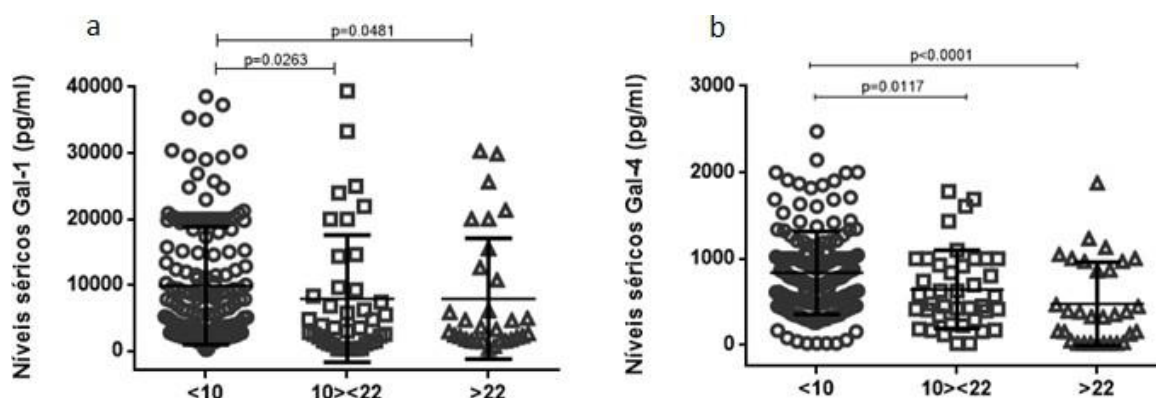


Fonte: da autora.

Avaliamos os níveis séricos das galectinas em relação à atividade clínica dos pacientes. Pacientes em remissão ou baixa atividade da doença ($\text{CDAI} \leq 10$) foram associados a níveis mais elevados de Gal-1, quando comparados a pacientes em atividade moderada da doença ($\text{CDAI } 10 > \leq 22$) ($p = 0,0263$; mediana = 3673 pg / ml). Pacientes que apresentavam alta atividade ($\text{CDAI} > 22$) apresentavam menores níveis de Gal-1 quando comparados ao grupo em remissão ou baixa atividade da doença ($\text{CDAI} \leq 10$) ($p = 0,0476$; mediana = 3210 pg / ml) (figura 9a). Não encontramos correlação entre os níveis de Gal-7 e os parâmetros de atividade da doença. Observamos também que pacientes em remissão ou baixa atividade da doença ($\text{CDAI} \leq 10$) apresentaram níveis elevados de Gal-4 quando comparados aqueles em atividade moderada da doença ($\text{CDAI } 10 > \leq 22$) ($p = 0,0117$; mediana = 518,9pg / ml) (Figura 9b). Altos níveis de Gal-4 também foram encontrados em pacientes em remissão ou baixa atividade da doença ($\text{CDAI} \leq 10$) quando

comparados ao grupo em com alta atividade da doença (CDAI > 22) ($p < 0,0001$; mediana = 346,0 pg / ml) (figura 9b).

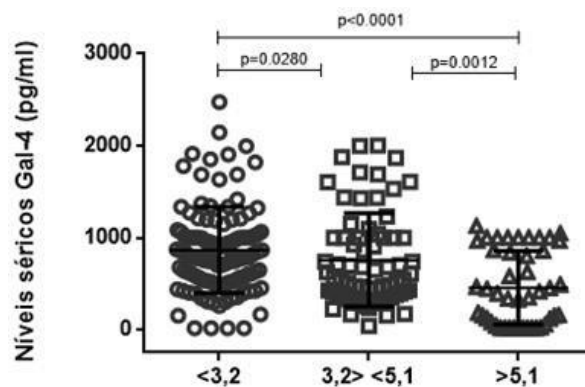
Figura 9 – Associação dos níveis séricos das galectinas -1 e -4 com o CDAI nos pacientes com AR. (A) Avaliação do CDAI com níveis séricos de Gal-1. (b) Avaliação do CDAI com os níveis séricos de Gal-4.



Fonte: da autora.

Pacientes com baixa atividade ou remissão da doença (DAS28 <3,2) apresentaram níveis elevados da Gal-4 quando comparados com pacientes em atividade moderada da doença (DAS28 3,2 > ≤5,1) ($p = 0,0280$; mediana = 587,3 pg / ml) e pacientes em alta atividade da doença (DAS28 >5,1) ($p < 0,0001$; mediana = 391,0 pg / m) (Figura 10). Níveis elevados de Gal-4 foram identificados em pacientes que apresentaram atividade moderada da doença (DAS28 3,2 > ≤5,1), quando comparados ao grupo alta atividade da doença (DAS28 > 5,1) atividade moderada da doença (DAS28 3,2 <5,1) ($p = 0,0012$; mediana = 391,0 pg / ml, respectivamente) (Figura 10).

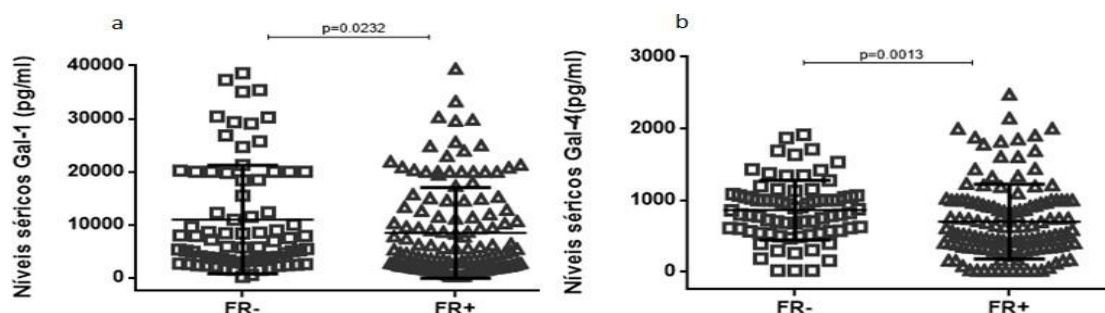
Figura 10 - Avaliação do escore de atividade da doença para 28 articulações (DAS28) com níveis séricos de Galectina-4.



Fonte: da autora.

Avaliando o FR, os pacientes com FR negativo apresentaram níveis mais elevados de Gal-1 e Gal-4 em comparação aos pacientes positivos para o FR, respectivamente, $p = 0,0358$; mediana = 7057pg /ml; $p = 0,0099$; mediana = 864,1pg/ ml (Figuras 11a e 11b).

Figura 11- Associação do FR com os níveis séricos das galecinas -1 e -4. (a) Avaliação do fator reumatóide e níveis de Galectina-1. (b) Avaliação do fator reumatóide e níveis de Galectina-4.

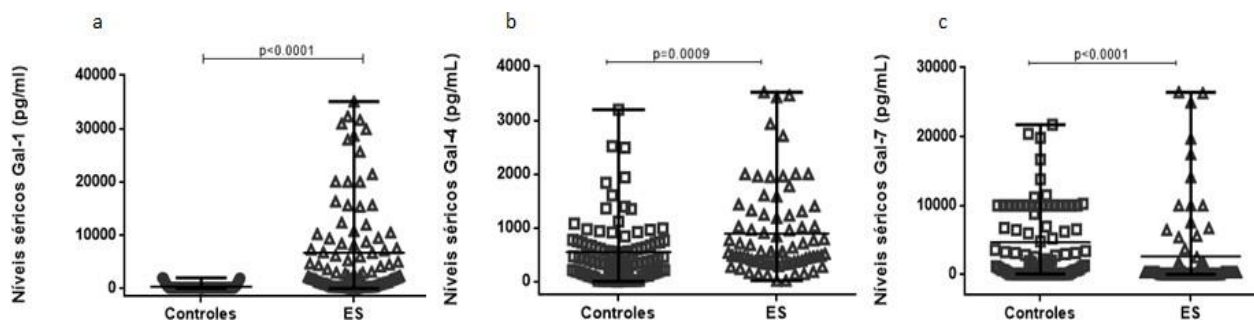


Fonte: da autora.

5.3.2 Esclerose sistêmica

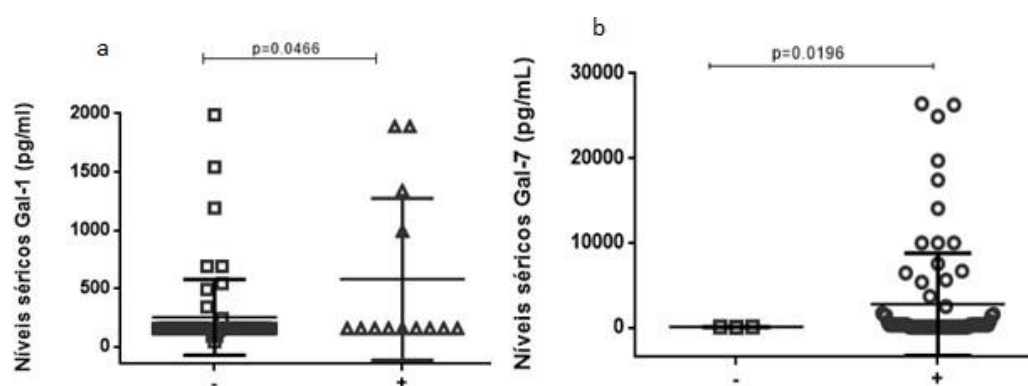
Os níveis séricos de galectinas -1, -4 e -7 foram significativamente aumentados em pacientes com ES comparados aos controles ($p < 0,001$; Figura 12). Os níveis de galectina não mostraram diferenças significativas entre a CD e o CL. Níveis séricos elevados de Gal-1 foram associados à presença de miopatia ($p = 0,0466$; Figura 13a). Da mesma forma, níveis séricos elevados de Gal-7 foram associados a pacientes com fibrose ($p = 0,0196$; Figura 13b).

Figura 12- Associação das galectinas -1, -4 e -7 nos pacientes com ES e grupo controle. (a) Comparação dos níveis séricos de Gal-1 nos pacientes e controles ($p < 0,0001$); (b) Comparação dos níveis séricos de Gal-4 nos pacientes e controles ($p < 0,0001$); (c) Comparação dos níveis séricos de Gal-7 nos pacientes e controles ($p < 0,0001$).



Fonte: da autora.

Figura 13 - Associação de parâmetros clínicos com as galectinas em pacientes com ES. (a) Associação dos níveis séricos de galectina-1 com miopatia em pacientes com ES ($p = 0,0466$). (b) Associação dos níveis séricos de galectina-7 com fibrose em pacientes com ES ($p = 0,0196$).



Fonte: da autora.

6 DISCUSSÃO

As galectinas são classificadas como uma família de proteínas que possuem alta capacidade de se ligar a β -galactosídeos através de uma sequência de aminoácidos dentro de CRDs. Elas regulam não apenas células crescimento e diferenciação, mas também respostas imunes, bem como inflamação (O'SULLIVAN et al., 2017; RAO SP et al., 2017).

Muitos estudos avaliaram o papel dos polimorfismos nos genes da galectina na AR (PÁL et al., 2012; HU et al., 2011; PANOULAS et al., 2009). No entanto, até o momento, não há estudo sobre SNPs de *LGALS9* na AR. ROSEN et al., (2016) relataram que os polimorfismos de *LGALS9* estão associados ao risco de desenvolver a doença hepática alcoólica (ALD), onde uma associação entre o alelo T rs4239242, a proteção contra a ALD e a presença do alelo C foram associados com uma diferença de 70% no risco de desenvolver ALD.

Este resultado difere do encontrado onde o genótipo TT apresentou associação positiva com AR ($p = 0,0032$). Enquanto o genótipo AG (rs3763959) foi associado a uma maior presença de erosões ósseas em pacientes com AR. O rs3751093 foi avaliado e a proporção de portadores do alelo G foi significativamente maior entre os indivíduos que estavam em risco de desenvolver lesão hepática alcoólica em comparação com aqueles que tinham maior probabilidade de o alelo A desenvolver ALD. Dessa forma, fica claro que, para diferentes doenças o polimorfismo pode gerar efeitos diversos no indivíduo (ROSEN et al., 2016).

A maioria dos polimorfismos avaliados (genótipos e alelos polimórficos) teve um efeito protetor na AR. SEKI et al., (2007) demonstraram que a Gal-9 está sendo usada em pacientes com AR, e pode ser benéfica na artrite induzida por colágeno de camundongos quando administrada por via exógena. Nos pacientes com AR, foi observada uma diminuição na sinalização do complexo Gal-9-Tim-3.

Os níveis de expressão de Tim-3 em células T CD4⁺ de pacientes com AR foram menores em comparação com aqueles de controles saudáveis, resultando em uma diminuição na apoptose mediada por Gal-9 de células T CD4⁺ (ARIKAWA et al., 2009). Outro estudo avaliou a expressão de mRNA da Gal-9 em PBMCs, onde foi observada uma menor expressão em pacientes de AR com atividade moderada a alta da doença, indicando que a Gal-9 pode prevenir a progressão da doença (LI et al., 2012).

A Gal-9 foi inicialmente identificada como um fator quimiotático para eosinófilos estando envolvida no processo regulatório da inflamação (MORIYAMA et al., 2014). Possui um receptor de superfície, o TIM-3, que é altamente expresso em células $CD4^+$, Th1, $CD8^-$, $CD11b^+$ e células dendríticas, não sendo expresso nos macrófagos e Th2. Sendo o complexo Gal-9+TIM-3 responsável por induzir apoptose das células T citotóxicas ($CD4^+$, Th1, $CD8^-$) (LI S et al., 2013).

Encontramos altos níveis da Gal-9 nos pacientes em remissão ou baixa atividade da doença (CDAI <10), quando comparados aos pacientes em alta atividade (CDAI > 22) ($p < 0,0001$). Além dos pacientes com atividade moderada (CDAI > 10 <22) e CDAI > 22, onde, tiveram um valor mais alto da Gal-9, em comparação com os pacientes que estavam em maior gravidade da doença ($p = 0,0064$).

LEE et al., (2011) encontraram uma correlação negativa quando avaliaram a expressão do mRNA de TIM-3 de PBMCs em relação ao DAS28. Outro estudo demonstrou que a Gal-9 está presente em maiores níveis no líquido sinovial de pacientes com AR quando comparados a pacientes com oostoartrite, podendo induzir a apoptose de fibroblastos e assim prevenir a hiperproliferação de sinoviócitos nas articulações, sugerindo o envolvimento de Gal-9 no desenvolvimento da AR. Dessa forma, o papel exato dessa galectina e do seu complexo com o receptor na AR precisa ser melhor estudado para uma melhor compreensão da doença (SEKI et.al., 2007).

Altos níveis séricos da Gal-9 foram encontrados nos pacientes com ES quando comparados ao grupo controle (mediana= 2554pg/ml; $p < 0,0001$). Apenas um artigo mostra a relação da Gal-9 e a fibrose presente nos pacientes com ES, onde fibroblastos dérmicos promovem a transdiferenciação localizada na pele de células Tregs para células Th2, sendo a Gal-9 responsável pela indução do desequilíbrio imune predominante de citocinas Th2 por regulação negativa das células Th1/Th17 em doenças inflamatórias.

Os fibroblastos dérmicos da ES suprimem a expressão de IFN- γ de células T $CD4^+$ através da superprodução de Gal-9, promovendo o desenvolvimento da fibrose da pele (SAIGUSA et al., 2017). Uma das limitações do nosso estudo foi que a grande maioria dos pacientes estava em remissão clínica, e talvez por causa disso a frequência dos alelos de proteção fosse maior, e pode não mostrar a real função do polimorfismo. Outra limitação que encontramos foi a ausência de associação dos

polimorfismos com CDAI, FR, VHS e correlação entre os parâmetros clínicos da ES com os SNPs.

A Gal-1 demonstrou ser um importante modulador da homeostase celular por induzir a apoptose em diferentes tipos celulares, como monócitos e células, além da sobrevivência e proliferação celular (OHSHIMA et al., 2013; RABINOVICH et al., 2007; TOSCANO et al., 2011). Estudos anteriores sugeriram um possível efeito terapêutico após a aplicação de Gal-1 em ratos com modelos de AR (MENDEZ-HUERGO et al., 2019; RABINOVICH et al., 1999). Enquanto outro estudo mostrou que a expressão de Gal-1 foi regulada negativamente na artrite idiopática juvenil caracterizada por hiperplasia das células sinoviais, no entanto, sua implicação na fisiologia da doença humana permanece desconhecida (XIBILLÉ-FRIEDMANN et al., 2013; KIM et al., 2006).

Nossos resultados atuais mostraram um aumento significativo em pacientes com AR em comparação ao controle ($p < 0,0001$). É bem conhecido que os níveis de Gal-1 aumentam acentuadamente nos soros de pacientes com AR e correlacionam positivamente com VSH e DAS28 (MENDEZ-HUERGO et al., 2019). Estudos de proteoma sinovial confirmaram a presença de Gal-1 em pacientes com AR, sugerindo um papel inflamatório maior em comparação com pacientes com osteoartrite (XIBILLÉ-FRIEDMANN et al., 2013; LI et al., 2013).

Nossos achados corroboram estudos prévios, uma vez que os níveis séricos desta galectina estão presentes em maior número em nosso grupo de pacientes com remissão da doença ($p = 0,0476$). Pacientes que apresentavam FR negativo, apresentavam níveis elevados de galectina ($p = 0,0232$).

Um estudo recente demonstrou o papel da Gal-1 na AR, onde foram encontrados altos níveis dessa galectina em pacientes, além da associação da Gal-1 com atividade da doença indicando que a galectina pode contribuir para os efeitos antiinflamatórios causados pelos DMARDs e corticoterapia em pacientes com AR (MENDEZ-HUERGO et al., 2017). Assim, embora sua função não seja completamente compreendida, nossos resultados corroboram com os achados da literatura, sugerindo que a presença dessa galectina está relacionada ao pior prognóstico da doença (XIBILLÉ-FRIEDMANN et al., 2014).

Na ES, encontramos um aumento nos níveis séricos de Gal-1 em comparação ao grupo controle. Como essa galectina é expressa em muitos tecidos, incluindo o músculo esquelético (YANABA et al., 2016; SUNDBLAD et al., 2017),

encontramos nos pacientes níveis elevados de Gal-1 correlacionados com a presença de miopatia ($p = 0,0466$), que é uma condição clínica que pode manifestar vários graus de atrofia muscular e elevação da enzima creatina fosfoquinase sérica (CPK) (POPE, 2003; NIO-KOBAYASHI, 2017).

A Gal-1 desempenha um papel duplo muito importante na angiogênese, aumentando assim a proliferação e migração de células endoteliais, mas também tem a capacidade de proteger as células da apoptose celular induzida pelo estresse oxidativo que se acredita ser relacionado ao desenvolvimento da ES (NIO-KOBAYASHI, 2017).

A Gal-4 é uma importante lectina diretamente relacionada à imunidade da mucosa e está fortemente associada ao aumento da inflamação intestinal ao estimular diretamente as células T $CD4^+$ para produzir IL-6 no modelo de colite mutacional TCR (DASURI et al., 2004). Através de um sinal ligação, que ocorre através de um ativador específico da cascata de sinalização associada à PKC, a Gal-4 pode interagir com células T $CD4^+$ estimulando a produção de IL-6 causando um aumento na inflamação intestinal.

No entanto, estudos mostraram que a Gal-4 pode induzir a apoptose de células T através da sua ligação ao epítipo CD3, que está presente na superfície das células T no modelo de colite de tipo selvagem. Até o momento, a implicação dessa glectina na fisiologia da doença autoimune permanece desconhecida. Assim, nosso resultado apresenta evidências inéditas, onde a Gal-4 está presente em níveis elevados em comparação com os controles ($p < 0,0001$).

Em relação aos parâmetros clínicos, os níveis elevados de Gal-4 foram encontrados em pacientes em remissão ou baixa atividade ($CDAI \leq 10$) quando comparados ao grupo em com alta atividade ($CDAI > 22$) ($p < 0,0001$). O DAS28, avaliado em pacientes em remissão ou baixa atividade ($DAS28 \leq 3,2$), apresentou níveis elevados de Gal-4 quando comparados ao grupo em com alta atividade da doença ($DAS28 > 5,2$) e atividade individual moderada ($DAS28 3,2 \leq 5,1$) ($p < 0,0001$, $p = 0,0012$, respectivamente). O FR negativo também foi associado à níveis elevados de Gal-4, o que corrobora os resultados acima ($p = 0,0013$). Como vários mecanismos podem estar relacionados ao desenvolvimento e melhor prognóstico da doença, já que pacientes com baixa atividade ou remissão da doença estão relacionados aos níveis de Gal-4, sugerindo que sua presença pode estar

relacionada ao melhor prognóstico. Novos estudos devem ser realizados para definir o papel deste Gal-4 na patogênese da AR.

Encontramos níveis elevados de Gal-4 em pacientes com ES em comparação com o grupo controle ($p = 0,0009$). A Gal-4 intracelular regula a proliferação, diferenciação e apoptose celular, enquanto a Gal-4 extracelular atua na adesão intercelular (HUFLEJT et al., 1997; HUFLEJT et al., 2003).

No presente estudo, a galectina demonstrou ter um papel duplo na sua função, em que a sua presença de inflamação intestinal foi exacerbada (HOKAMA et al., 2004, HOKAMA et al., 2008) ou para melhorar a inflamação (PACLIK et al., 2008). Não encontramos associações entre as manifestações clínicas da doença com níveis séricos de galectina, nem estudos na literatura para correlacionar nossos achados. No entanto, mais estudos são necessários para confirmar seu papel na ES.

A Gal-7 é considerada um marcador de epitélio estratificado, desempenhando um papel importante no desenvolvimento da migração celular. Possui várias funções celulares, sendo a maioria relacionada à manutenção da integridade epitelial, indução de apoptose de células T ativadas com ativação de caspases, e também atua como fator antifibrótico na fibrose hepática (PACLIK et al., 2008; INAGAKI et al., 2008).

Um estudo anterior avaliou o soro de pacientes com várias doenças autoimunes para autoanticorpos, onde o perfil de resposta caracterizava o tipo de doença. Os achados sugerem que os autoanticorpos presentes no soro podem contribuir para a desregulação do sistema imunológico, onde a resposta imunológica à idade e sexo nos controles foi encontrada contra o protótipo Gal-7, com indicações de positividade para Gal-7 em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico.

Além da presença de autoanticorpos, as galectina-2, -3, -4 e -7 foram altamente significativos na trombose arterial e venosa, abortos recorrentes e trombocitopenia (SARTER et al., 2013). Até o momento, não há dados que demonstrem uma relação entre Gal-7 e AR. Nossos resultados são sem precedentes em demonstrar pela primeira vez que pacientes com AR têm níveis elevados de Gal-7 em comparação com controles ($p < 0,0001$). No entanto, não encontramos associações positivas em relação aos parâmetros de atividade da doença. Mais estudos são necessários para demonstrar o seu verdadeiro papel nesta doença.

Assim como na AR, até o momento, não existe nenhum estudo sobre o papel da Gal-7 em pacientes com ES e sua correlação com os achados clínicos. Sendo a fibrose tecidual responsável pela maioria das manifestações clínicas da ES, onde a extensão e gravidade do tecido fibrótico está relacionada ao pior prognóstico e mortalidade da doença. Dessa forma, pode haver uma relação entre o processo fibrótico e a Gal-7, sabendo que há uma interação de outros fatores, até mesmo outras galectinas, que estão presentes nesse processo (GENDRONNEAU et al., 2008; MATSUSHITA; TAKEHARA, 2017).

Nossos achados mostraram que há uma possível relação entre fibrose e Gal-7, onde pacientes com altos níveis de Gal-7 presente no soro estão correlacionados com presença do processo fibrótico ($p = 0,0196$). Como não existe no momento estudos que corroborem nossos achados, são necessários mais pesquisas e até associações com os SNPs para confirmar nossa hipótese. No entanto, não encontramos associações positivas em relação aos parâmetros de atividade da doença. Mais estudos são necessários para demonstrar o seu verdadeiro papel nesta doença.

Uma das limitações do nosso estudo foi que a grande maioria dos pacientes estava em remissão clínica, e talvez por causa disso a frequência de alelos de proteção fosse maior e não mostrasse a real função do polimorfismo. Outra limitação foi a avaliação do significado funcional dos polimorfismos selecionados no gene da galectina-9. Quando examinamos os níveis séricos de galectina-9 com cada genótipo de pacientes com AR, no entanto, as frequências genotípicas e alélicas não foram associadas aos níveis séricos.

Levando em conta que a AR é uma doença dependente do microambiente, os polimorfismos podem fornecer alguma função com a galectina no líquido sinovial, em vez de no nível sistêmico. Além disso, esse polimorfismo pode ser influenciado por outras proteínas relacionadas à síntese, excreção ou degradação da galectina-9. No entanto, nosso estudo é o primeiro a investigar o papel do polimorfismo LGALS9 em pacientes com AR, contribuindo para o conhecimento do *background* genético da AR.

7 CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem pela primeira vez que alterações genéticas no gene *LGALS9* podem estar associadas à AR. O genótipo SNP rs4239242 TT apresentou associação positiva com AR em comparação ao grupo controle. Como o genótipo AG (rs3763959) tem sido associado com uma maior presença de erosões ósseas em pacientes com AR, estes achados sugerem que os polimorfismos no *LGALS9* podem ser uma área interessante para uma maior exploração na artrite reumatóide.

Também foi demonstrada a presença das Gal-1, -4, -7 pela primeira vez nos pacientes com AR e ES. A presença de altos níveis séricos de Gal-1 e Gal-4 foram relacionados a pacientes em baixa atividade da doença e ausência de fator reumatóide, nos pacientes com AR.

Nos pacientes com ES, encontramos uma associação positiva de Gal-1 com a presença de miopatia e altos níveis de Gal-7 em pacientes com fibrose. Desta forma, as galectinas podem vir a atuar como o biomarcadores da doença. No entanto, mais estudos são necessários a fim de elucidar o papel destas proteínas, e assim, entender melhor o mecanismo que possam estar relacionados à AR e à ES.

8 REFERENCIAS

ADVEDISSIAN T, Deshayes F, Poirier F, Grandjean C, Viguier M. **Galectins, a class of unconventional lectins**. Med Sci (Paris). 31(5):499-505, 2015.

ARCOLIA V, Journe F, Wattier A, Leteurtre E, Renaud F, Gabius HJ, Remmelink M, Decaestecker C, Rodriguez A, Boutry S, Laurent S, Saussez S. **Galectin-1 is a diagnostic marker involved in thyroid cancer progression**. Int J Oncol. 10.3892/ijo.2017.4065, 2017.

ALETAHA D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, 3rd, et al. **Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative**. Ann Rheum Dis.;69(9):1580-8, 2010.

ARIKAWA T, Watanabe K, Seki M, Matsukawa A, Oomizu S, et al. **Galectin-9 ameliorates immune complex-induced arthritis by regulating Fc gamma R expression on macrophages**. Clin Immunol.; 133:382–392, 2009.

ARNETT FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. **The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis**. Arthritis Rheum.;31(3):315-24, 1988.

ASSASSI S, Del Junco D, Sutter K, et al. **Clinical and genetic factors predictive of mortality in early systemic sclerosis**. Arthritis Care Res.;61:1403-1411, 2009.

ATABAKI M, Hashemi M, Daneshvar H, Alijani E. **Lectin, galactoside-binding, soluble, 3 rs4652 A/C gene variation and the risk for rheumatoid arthritis**. Biomed Rep.;6(2):251-255. doi: 10.3892/br.2017.838, 2017.

BAX M, van Heemst J, Huizinga TW, Toes RE. **Genetics of rheumatoid arthritis: what have we learned?** Immunogenetics; 63(8):459–66, 2011.

BELLUCCI E, Terenzi R, LA Paglia GM et al.:**One year in review 2016: pathogenesis of rheumatoid arthritis.** Clin Exp Rheumatol; 34: 793-801, 2016.

BELO AI, van der Sar AM, Tefsen B, van Die I. **Galectin-4 reduces migration and metastasis formation of pancreatic cancer cells.** PLoS One.;8:e65957, 2013.

BERTSIAS G et al. **EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus (SLE).** Ann Rheum Dis [published online], 2007.

BLOIS SM, Gueuvoghlian-Silva BY, Tirado-González I, Torloni MR, Freitag N, Mattar R, Conrad ML, Unverdorben L, Barrientos G, Knabl J, Toldi G, Molvarec A, Rose M, Markert UR, Jeschke U, Daher S.**Getting too sweet: galectin-1 dysregulation in gestational diabetes mellitus.** Mol Hum Reprod;20(7):644-9. doi: 10.1093/molehr/gau021, 2014.

BUZÁS EI, György B, Pásztói M, Jelinek I, Falus A, Gabius HJ. **Carbohydrate recognition systems in autoimmunity.** Autoimmunity 39, 691–704, 2006.

CAI Z, Zeng Y, Xu B, Gao Y, Wang S, Zeng J, Chen L, Huang A, Liu XL, Liu JF. **Galectin-4 serves as a prognostic biomarker for the early recurrence/metastasis of hepatocellular carcinoma.** Cancer Sci.;105:1510–1517, 2014.

CABRAL-MARQUES O, Riemekasten G. **Vascular hypothesis revisited: Role of stimulating antibodies against angiotensin and endothelin receptors in the pathogenesis of systemic sclerosis.** Autoimmun Rev; 15(7): 690-4, 2016.

CAMBY, I.; Le Mercier, M.; Lefranc, F.; Kiss, R. **Galectin-1: A small protein with major functions.** Glycobiology, 16, 137R–157R, 2006.

CAMBY, I., Lefranc, F., and Kiss, R. **In vivo siRNA-induced decreases of galectin-1 expression in experimental models of human orthotopic glioblastoma xenografts contribute therapeutic benefits.** In 97th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research (AACR), no. 2186. Washington, DC, 2006.

CHANVILLARD, C., Jacolik, R. F., Infante-Duarte, C., Nayak, R. C. **The role of natural killer cells in multiple sclerosis and their therapeutic implications.** Front. Immunol. 4, 63, 2013.

CHEN HJ, Zheng ZC, Yuan BQ, Liu Z, Jing J, Wang SS. **The effect of galectin-3 genetic variants on the susceptibility and prognosis of gliomas in a Chinese population.** Neurosci Lett. 14;518(1):1-4. doi: 10.1016/j.neulet.2012, 2012.

CHEN L, Yao Y, Sun L, Zhou J, Liu J, Wang J, Li J, Tang J. **Clinical implication of the serum galectin-1 expression in epithelial ovarian cancer patients.** J Ovarian Res. 21;8:78, 2015.

CHEN Y, Zhou J, Cheng Z, Yang S, Chu H, Fan Y, Li C, Wong BH, Zheng S, Zhu Y, Yu F, Wang Y, Liu X, Gao H, Yu L, Tang L, Cui D, Hao K, Bossé Y, Obeidat M, Brandsma CA, Song YQ, To KK, Sham PC, Yuen KY, Li L. **Functional variants regulating LGALS1 (Galectin 1) expression affect human susceptibility to influenza A(H7N9).** Sci Rep. 17;5:8517. doi: 10.1038/srep08517, 2015.

CHUNG CD, Patel VP, Moran M, Lewis LA, Miceli MC. **Galectin-1 induces partial TCR-chain phosphorylation and antagonizes processive TCR signal transduction.** J Immunol ; 165: 3722–3729, 2000.

COUSIN JM, Cloninger MJ. **The Role of Galectin-1 in Cancer Progression, and Synthetic Multivalent Systems for the Study of Galectin-1.** Int J Mol Sci. 16;17(9). pii: E1566, 2016.

CUMMINGS, R. D., Pierce, J. M. **The challenge and promise of glycomics.** Chem. Biol. 21, 1–15, 2014.

CUMMINGS, R. D. **The repertoire of glycan determinants in the human glycome.** Mol. Biosyst. 5, 1087–1104, 2009.

DA MOTA LM, Cruz BA, Brenol CV, Pereira IA, Fronza LS, Bertolo MB, et al. **Consensus of the Brazilian Society of Rheumatology for diagnosis and early assessment of rheumatoid arthritis.** Rev Bras Reumatol. ;51(3):199-219, 2011.

DASURI K, Antonovici M, Chen K, Wong K, Standing K, Ens W, et al. **The synovial proteome: analysis of fibroblast-like synoviocytes.** Arthritis Res Ther ;6:R161–8, 2004.

DAVIS L, Dibner MD, Battey JF. **Basic Methods in Molecular Biology.** Elsevier. New York, 1986.

DENTON CP, Khanna D. **Systemic sclerosis.** Lancet. pii: S0140-6736(17)30933-9. doi: 10.1016/S0140-6736(17)30933-9, 2017.

DESBOIS AC, Cacoub P. **Systemic sclerosis: An update in 2016.** Autoimmun Rev ;15(5): 417-26, 2016.

DE LA FUENTE H, Cruz-Adalia A, Martinez del Hoyo G, et al. **The leukocyte activation receptor CD69 controls T cell differentiation through its interaction with galectin-1.** Mol Cell Biol; 34: 2479–2487, 2014.

DE VRIES R. **Genetics of rheumatoid arthritis: time for a change!** Curr Opin Rheumatol; 23(3):227–32, 2011.

DE ZUBIRIA SALGADO, A., Herrera-Diaz, C. **Lupus nephritis: an overview of recent findings.** Autoimmune Dis. 2012, 849684, 2012.

DELACOUR D, Gouyer V, Zanetta JP, Drobecq H, Leteurtre E, Grard G, Moreau-Hannedouche O, Maes E, Pons A, Andre S, et al. **Galectin-4 and sulfatides in**

apical membrane trafficking in enterocyte-like cells. J Cell Biol.;169:491–501, 2005.

DI LELLA S, Sundblad V, Cerliani JP, et al. **When galectins recognize glycans: from biochemistry to physiology and back again.** Biochemistry. 50:7842–7857, 2011.

DJORDJEVIC A, Zivkovic M, Stankovic A, Zivotic I, Koncar I, Davidovic L, Alavantic D, Djuric T. **Genetic Variants in the Vicinity of LGALS-3 Gene and LGALS-3 mRNA Expression in Advanced Carotid Atherosclerosis: An Exploratory Study.** J Clin Lab Anal.;30(6):1150-1157. doi: 10.1002/jcla.21996, 2016.

FAJKA-BOJA R, Szemes M, Ion G, Le'grá' di A, Caron M, Monostori E. **Receptor tyrosine phosphatase, CD45 binds galectin-1 but does not mediate its apoptotic signal in T cell lines.** Immunol Lett ; 82: 149–154, 2002.

FARHAT SC, Silva CA, Orione MA, Campos LM, Sallum AM, Braga AL. **Air pollution in autoimmune rheumatic diseases: a review.** Autoimmun Rev.11(1):14-21, 2011.

FALUDI R, Nagy G, Tőkés-Füzesi M, Kovács K, Czirják L, Komócsi A. **Galectin-3 is an independent predictor of survival in systemic sclerosis.** Int J Cardiol. 15;233:118-124. doi: 10.1016/j.ijcard.2016.12.140, 2016.

FERRAZ MB, Oliveira LM, Araujo PM, Atra E, Tugwell P. **Crosscultural reability of the physical ability dimension of the Health Assessment Questionnaire.** J Rheumatol.;17:813–7, 1990.

FRISELL T, Saevarsdottir S, Askling J. **Family history of rheumatoid arthritis: an old concept with new developments.** Nat Rev Rheumatol. ; 12(6):335–343, 2016.

FUJIHARA S, Mori H, Kobara H, Rafiq K, Niki T, Hirashima M, Masaki T. **Galectin-9 in cancer therapy.** Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov.;7(2):130-7, 2013.

GARCIA-VALLEJO JJ, van Kooyk Y. **The physiological role of DC-SIGN: a tale of mice and men.** Trends Immunol. 34(10):482-6, 2013.

GARIN MI, Chu C-C, Golshayan D, Cernuda-Morollon E, Wait R, Lechler RI. **Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells.** Blood 109:2058–65, 2007.

GENDRONNEAU G, Sidhu SS, Delacour D, Dang T, Calonne C, Houzelstein D, Magnaldo T, Poirier F. **Galectin-7 in the control of epidermal homeostasis after injury.** Mol Biol Cell. ;19:5541–9. doi: 10.1091/mbc.E08-02-0166, 2008.

GLADMAN DD, Kung TN, Siannis F, Pellett F, Farewell VT, Lee P. **HLA markers for susceptibility and expression in scleroderma.** J Rheumatol.;32:1481-1487, 2005.

GOLDBLATT F, O'Neill SG. **Clinical aspects of autoimmune rheumatic diseases.** Lancet. 382(9894):797-808, 2013.

GOLDEN-MASON L, Rosen HR. **Galectin-9: Diverse roles in hepatic immune homeostasis and inflammation.** Hepatology.;66(1):271-279, 2017.

GUO J-P, Li X-G. **Galectin-7 promotes the invasiveness of human oral squamous cell carcinoma cells via activation of ERK and JNK signaling.** Oncology Letters. ;13(3):1919-1924, 2017.

HAMMAM N, Gheita TA. **Impact of secondhand smoking on disease activity in women with rheumatoid arthritis.** Clin Rheumatol. doi: 10.1007/s10067-017-3795-2, 2017.

HAUDEK KC, Patterson RJ, Wang JL. **SR proteins and galectins: what's in a name?** Glycobiology ;20:1199-207, 2010.

HAYASHI T, Saito T, Fujimura T, Hara K, Takamochi K, Mitani K, Mineki R, Kazuno S, Oh S, Ueno T, et al. **Galectin-4, a novel predictor for lymph node metastasis in lung adenocarcinoma.** PLoS One;8:e81883, 2013.

He Y, Cao J, Zhao C, Li X, Zhou C, Hirsch FR. **TIM-3, a promising target for cancer immunotherapy.** Onco Targets Ther. 2018 Oct 16;11:7005-7009. doi:10.2147/OTT.S170385. eCollection 2018. Review.

HENSOR EM, Emery P, Bingham SJ, Conaghan PG. **Discrepancies in categorizing rheumatoid arthritis patients by DAS-28 (ESR) and DAS28 (CRP): can they be reduced?** Rheumatology.;49:1521–9, 2010.

HEUSSCHEN R, Griffioen AW, Thijssen VL. **Galectin-9 in tumor biology: a jack of multiple trades.** Biochim Biophys Acta.;1836(1):177-85, 2013.

HO MK, Springer TA. **Mac-2, a novel 32,000 Mr mouse macrophage subpopulation-specific antigen defined by monoclonal antibodies.** J Immunol 128(3):1221–8, 1982.

HOCHBERG MC. **Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus.** Arthritis Rheum; 40: 1725, 1997.

HOKAMA A, Mizoguchi E, Mizoguchi A. **Roles of galectins in inflammatory bowel disease.** World J Gastroenterol 14:5133,2008.

HOKAMA A, Mizoguchi E, Sugimoto K, Shimomura Y, Tanaka Y, Yoshida M, Rietdijk ST, de Jong YP, Snapper SB, Terhorst C et al., **Induced reactivity of intestinal CD4+ T cells with na epithelial cell lectin, galectin-4, contributes to exacerbation of intestinal inflammation.** Immunity 20:681–693, 2004.

HONG SH, Shin JS, Chung H, Park CG. **Galectin-4 Interaction with CD14 Triggers the Differentiation of Monocytes into Macrophage-like Cells via the MAPK Signaling Pathway.** Immune Netw. 29;19(3):e17, 2019.

HORNUNG Á, Monostori É, Kovács L. **Systemic lupus erythematosus in the light of the regulatory effects of galectin-1 on T-cell function.** *Lupus*;26(4):339-347, 2017.

HORIMOTO AM, Matos EN, Costa MR, Takahashi F, Rezende MC, Kanomata LB, Locatelli EP, Finotti LT, Maegawa FK, Rondon RM, Machado NP, Couto FM, Figueiredo TP, Ovidio RA, Costa IP. **Incidence and prevalence of systemic sclerosis in Campo Grande, State of Mato Grosso do Sul, Brazil.** *Rev Bras Reumatol Engl Ed.*;57(2):107-114, 2017.

HSU DK, Yang R-Y, Fermin A, Liu F-T. **Galectins in immune and inflammatory diseases: Insights from experiments with galectin deficient mice.** In: Klyosov AA, Traber PG (eds), **Galectins and disease implications for targeted therapeutics.** Washington, DC: American Chemical Society,. pp. 343–358, 2012.

HSU YL, Hung JY, Chiang SY, Jian SF, Wu CY, Lin YS, Tsai YM, Chou SH, Tsai MJ, Kuo PL. **Lung cancer-derived galectin-1 contributes to cancer associated fibroblast-mediated cancer progression and immune suppression through TDO2/kynurenine axis.** *Oncotarget.* 10;7(19):27584-98, 2016.

HU CY, Chang SK, Wu CS, Tsai WI, Hsu PN. **Galectin-3 gene (LGALS3) +292C allele is a genetic predisposition factor for rheumatoid arthritis in Taiwan.** *Clin Rheumatol.*;30(9):1227-33. doi: 10.1007/s10067-011-1741-2, 2011.

HUANG YJ, Shiau AL, Chen SY, Chen YL, Wang CR, et al. **Multivalent structure of galectin-1-nanogold complex serves as potential therapeutics for rheumatoid arthritis by enhancing receptor clustering.** *Eur Cell Mater.* ;23:170–181, 2012.

HUFLEJT ME, Jordan ET, Gitt MA, Barondes SH, Leffler H. **Strikingly different localization of galectin-3 and galectin-4 in human colon adenocarcinoma T84 cells. Galectin-4 is localized at sites of cell adhesion.** *J Biol Chem* 272:14294–14303, 1997.

HUFLEJT ME, Leffler H. **Galectin-4 in normal tissues and cancer.** Glycoconj J 20:247–255, 2003.

HUGHES, R.C. **Galectins in kidney development.** Glycoconj. J., 19, 621–629, 2004.

INAGAKI Y, Higashi K, Kushida M, Hong YY, Nakao S, Higashiyama R, Moro T, Itoh J, Mikami T, Kimura T, Shiota G, Kuwabara I, Okazaki I. **Hepatocyte growth factor suppresses profibrogenic signal transduction via nuclear export of Smad3 with Galectin-7.** Gastroenterology 134:1180–1190, 2008.

IOANNIDIS JP, Vlachoyiannopoulos PG, Haidich AB, Medsger TA, Jr., Lucas M, Michet CJ, et al. **Mortality in systemic sclerosis: an international meta-analysis of individual patient data.** Am J Med.;118(1):2-10, 2005.

IQBAL AJ, Cooper D, Vugler A, Gittens BR, Moore A, et al. **Endogenous galectin-1 exerts tonic inhibition on experimental arthritis.** J Immunol. ;191:171–177, 2013.

ISENBERG DA et al. **An assessment of disease flare in patients with systemic lupus erythematosus: a comparison of BILAG 2004 and the flare version of SELENA.** Ann Rheum Dis ; 70: 54–9, 2011.

JIANG X, askling J, Saevarsdottir S et al. **A genetic risk score composed of rheumatoid arthritis risk alleles, HLA-DRB1 haplotypes, and response to TNFi therapy - results from a Swedish cohort study.** Arthritis Res Ther 2016; 18: 288, 2016.

JIAO Q, Qian Q, Zhao Z, Fang F, Hu X, An J, Wu J, Liu C. **Expression of human T cell immunoglobulin domain and mucin-3 (TIM-3) and TIM-3 ligands in peripheral blood from patients with systemic lupus erythematosus.** Arch Dermatol Res;308(8):553-61. doi: 10.1007/s00403-016-1665-4, 2016.

JOHN S, Mishra R. **Galectin-9: From cell biology to complex disease dynamics.** J Biosci. Sep;41(3):507-34. Review. PubMed PMID: 27581941, 2016.

JOOSTEN LA, Radstake TR, Lubberts E, van den Bersselaar LA, van Riel PL, van Lent PL, Barrera P, van den Berg WB. **Association of interleukin-18 expression with enhanced levels of both interleukin-1 β and tumor necrosis factor alpha in knee synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum*; 48: 339-347, 2003.

KERKMAN PF, Rombouts Y, van der Voort EI, et al. **Circulating plasmablasts/plasmacells as a source of anticitrullinated protein antibodies in patients with rheumatoid arthritis.** *Ann Rheum Dis*. 72(7):1259–1263, 2013.

KIM CW, Cho EH, Lee YJ, Kim YH, Hah YS, Kim DR. **Disease-specific proteins from rheumatoid arthritis patients.** *J Korean Med Sci*.;21(3):478-84, 2006.

KOCA SS, Akbas F, Ozgen M, Yolbas S, Ilhan N, Gundogdu B, Isik A. **Serum galectin-3 level in systemic sclerosis.** *Clin Rheumatol*.;33(2):215-20, 2014.

KONDA Mohan V, Ganesan N, Gopalakrishnan R, Venkatesan V. **HLA-DRB1 shared epitope alleles in patients with rheumatoid arthritis: relation to autoantibodies and disease severity in a south Indian population.** *Int J Rheum Dis*, 2016.

LEE J, Oh JM, Hwang JW, Ahn JK, Bae EK, et al. **Expression of human TIM-3 and its correlation with disease activity in rheumatoid arthritis.** *Scand J Rheumatol*.;40:334–340, 2011.

LEE J, Park EJ, Noh JW, Hwang JW, Bae EK, et al. **Underexpression of TIM-3 and blunted galectin-9-induced apoptosis of CD4⁺ T cells in rheumatoid arthritis.** *Inflammation*. ;35:633–637, 2012.

LEE YH et al. **Induction and maintenance therapy for lupus nephritis: a systematic review and meta-analysis.** *Lupus*; 19: 703–10, 2010.

LEFFLER H, Masiarz FR, Barondes SH. **Soluble lactose-binding vertebrate lectins: a growing family.** *Biochemistry*;28:9222–9229. 1989.

LEPUR A, Carlsson MC, Novak R, et al. **Galectin-3 endocytosis by carbohydrate independent and dependent pathways in different macrophage like cell types.** *Biochim Biophys Acta*;1820:804–18, 2012.

LEROY EC, Medsger TA Jr. **Criteria for the classification of early systemic sclerosis.** *J Rheumatol* 28:1573–1576, 2001.

LI, S., Yu, Y., Koehn, C. D., Zhang, Z., & Su, K. (2013). Galectins in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Journal of Clinical & Cellular Immunology*, 4(5), 1000164.

LI X, Zhao YQ, Li CW, Yuan FL. **T cell immunoglobulin-3 as a new therapeutic target for rheumatoid arthritis.** *Expert Opin Ther Targets*.;16(12):1145-9, 2012.

LIGHTFOOT YL, Blanco LP, Kaplan MJ. **Metabolic abnormalities and oxidative stress in lupus.** *Curr Opin Rheumatol*, 2017.

LISNEVSKAIA L, Murphy G, Isenberg D. **Systemic lupus erythematosus.** *Lancet*. 22;384(9957):1878-88. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60128-8, 2014.

MADSEN P., Rasmussen H. H., Flint T., Gromov P., Kruse T. A., Honore B. et al. **Cloning, expression, and chromosome mapping of human galectin-7.** *J. Biol. Chem.* 270: 5823–5829, 1995.

MAFTOUH M, Belo AI, Avan A, Funel N, Peters GJ, Giovannetti E, van Die I. **Galectin-4 expression is associated with reduced lymph node metastasis and modulation of Wnt/ β -catenin signalling in pancreatic adenocarcinoma.** *Oncotarget* ;5:5335, 2014.

MASUYER G, Jabeen T, Öberg CT, Leffler H, Nilsson UJ, Acharya KR. **Inhibition mechanism of human galectin-7 by a novel galactose-benzylphosphate inhibitor.** *The Febs Journal*.;279(2):193-202, 2012.

MATHIEU A, Nagy N, Decaestecker C, Ferdinande L, Vandenbroucke K, Rottiers P, Cuvelier CA, Salmon I, Demetter P. **Expression of galectins-1, -3 and -4 varies**

with strain and type of experimental colitis in mice. Int J Exp Pathol 89:438–446, 2008.

MATSUSHITA T, Takehara K. **An update on biomarker discovery and use in systemic sclerosis.** Expert Rev Mol Diagn.;17(9):823-833. doi:10.1080/14737159.2017.1356722, 2017.

MATUCCI-CERINIC M, Kahaleh B, Wigley FM. **Review: evidence that systemic sclerosis is a vascular disease.** Arthritis Rheum; 65(8): 1953-62, 2013.

MCINNES IB, Schett G. **The pathogenesis of rheumatoid arthritis.** N Engl J Med.;365(23):2205–2219, 2011.

MCNICHOLAS S, Agirre J. **Glycoblocks: a schematic three-dimensional representation for glycans and their interactions.** Acta Crystallogr D Struct Biol. 187-194, 2017.

MENDEZ-HUERGO SP, Hockl PF, Stupirski JC, Maller SM, Morosi LG, Pinto NA, Berón AM, Musuruana JL, Nasswetter GG, Cavallasca JA, Rabinovich GA. **Clinical Relevance of Galectin-1 and Galectin-3 in Rheumatoid Arthritis Patients: Differential Regulation and Correlation With Disease Activity.** Front Immunol. 9;9:3057. doi: 10.3389/fimmu.2018.03057, 2019.

MENDONÇA BELMONT TF, do Ó KP, Soares da Silva A, de Melo Vilar K, Silva Medeiros F, Silva Vasconcelos LR, Mendonça Dos Anjos AC, Domingues Hatzlhofer BL, Pitta MG, Bezerra MA, Araújo Ada S, de Melo Rego MJ, Moura P, Cavalcanti Mdo S. **Single Nucleotide Polymorphisms at +191 and +292 of Galectin-3 Gene (LGALS3) Related to Lower GAL-3 Serum Levels Are Associated with Frequent Respiratory Tract Infection and Vaso-Occlusive Crisis in Children with Sickle Cell Anemia.** PLoS One.7;11(9):e0162297. doi:10.1371/journal.pone.0162297, 2016.

MERANI S, Chen W, Elahi S. **The bitter side of sweet: the role of Galectin-9 in immunopathogenesis of viral infections.** Rev Med Virol.;25(3):175-86, 2015.

MIYANISHI N, Nishi N, Abe H, Kashio Y, Shinonaga R, et al. **Carbohydrate-recognition domains of galectin-9 are involved in intermolecular interaction with galectin-9 itself and other members of the galectin family.** *Glycobiology*.;17:423–432, 2007.

MONTIEL JL, Monsiváis-Urenda A, Figueroa-Vega N, Moctezuma JF, Burgos-Vargas R, González-Amaro R, Rosenstein Y. **Anti-CD43 and anti-galectin-1 autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus.** *Scand J Rheumatol*.;39(1):50-7. doi: 10.3109/03009740903013213, 2010.

MORITOKI M, Kadowaki T, Niki T, Nakano D, Soma G, Mori H, Kobara H, Masaki T, et al. **Galectin-9 ameliorates clinical severity of MRL/lpr lupus-prone mice by inducing plasma cell apoptosis independently of Tim-3.** *PLoS One*. 8, e60807, 2013.

MORIYAMA K, Kukita A, Li YJ, Uehara N, Zhang JQ, Takahashi I, Kukita T. **Regulation of osteoclastogenesis through Tim-3: possible involvement of the Tim-3/galectin-9 system in the modulation of inflammatory bone destruction.** *Lab Invest*.;94(11):1200-11. doi: 10.1038/labinvest.2014.107, 2014.

MOULTON VR, Tsokos GC. **Abnormalities of T cell signaling in systemic lupus erythematosus.** *Arthritis Res Ther* ; 13: 207, 2011.

NAGAHAMA K, Ogawa A, Shirane K, Shimomura Y, Sugimoto K, Mizoguchi A. **Protein kinase C θ plays a fundamental role in different types of chronic colitis.** *Gastroenterology* 134:459– 469, 2008.

NAM K, Son SH, Oh S, Jeon D, Kim H, Noh DY, Kim S, Shin I. **Binding of galectin-1 to integrin β 1 potentiates drug resistance by promoting survivin expression in breast cancer cells.** *Oncotarget*. 2017 May 30;8(22):35804-35823, 2017.

NICKEL, W. **Unconventional secretory routes: direct protein export across the plasma membrane of mammalian cells.** *Traffic*, 6, 607–614, 2005.

NIELSEN CT, Lood C, Ostergaard O, Iversen LV, Voss A, Bengtsson A, Jacobsen S, Heegaard NH. **Plasma levels of galectin-3-binding protein reflect type I interferon activity and are increased in patients with systemic lupus erythematosus.** *Lupus Sci Med.*;1(1):e000026. doi:10.1136/lupus-2014-000026, 2014.

NIO-KOBAYASHI J. **Tissue- and cell-specific localization of galectins, β -galactose-binding animal lectins, and their potential functions in health and disease.** *Anat Sci Int.* 92(1):25-36, 2017.

NIELSEN CT, Østergaard O, Rekvig OP, Sturfelt G, Jacobsen S, Heegaard NH. **Galectin-3 binding protein links circulating microparticles with electron dense glomerular deposits in lupus nephritis.** *Lupus.*;24(11):1150-60. doi: 10.1177/0961203315580146, 2015.

O'SULLIVAN JA, Carroll DJ, Bochner BS. **Glycobiology of Eosinophilic Inflammation: Contributions of Siglecs, Glycans, and Other Glycan-Binding Proteins.** *Front Med (Lausanne).*2;4:116. doi: 10.3389/fmed.2017.00116, 2017.

ODA Y, Herrmann J, Gitt MA, Turck CW, Burlingame AL, Barondes SH, Leffler H. **Soluble lactose-binding lectin from rat intestine with two different carbohydrate-binding domains in the same peptide chain.** *J Biol Chem.*;268:5929–5939, 1993.

ODAKA M, Hasegawa M, Hamaguchi Y, Ishiura N, Kumada S, Matsushita T, Komura K, Sato S, Takehara K, Fujimoto M. **Autoantibody-mediated regulation of B cell responses by functional anti-CD22 autoantibodies in patients with systemic sclerosis.** *Clin Exp Immunol.*159(2):176-84, 2010.

OHSHIMA S, Kuchen S, Seemayer CA, Kyburz D, Hirt A, Klinzing S, Michel BA, Gay RE, Liu FT, Gay S, Neidhart M. **Galectin 3 and its binding protein in rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum.*;48:2788–2795, 2003.

OHTSUBO K, Marth JD. **Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease.** Cell. 126:855–866, 2006.

O'REILLY MK, Tian H, Paulson JC. **CD22 is a recycling receptor that can shuttle cargo between the cell surface and endosomal compartments of B cells.** J Immunol. 186:1554–1563, 2011.

PACLIK D, Danese S, Berndt U, Wiedenmann B, Dignass A, Sturm A. **Galectin-4 controls intestinal inflammation by selective regulation of peripheral and mucosal T cell apoptosis and cell cycle.** PLoS One.;3:e2629. doi: 10.1371/journal.pone.0002629, 2008.

PANJWANI N. **Role of galectins in re-epithelialization of wounds.** *Annals of Translational Medicine.*;2(9):89, 2014.

PACLIK D, Danese S, Berndt U, Wiedenmann B, Dignass A, Sturm A. **Galectin-4 controls intestinal inflammation by selective regulation of peripheral and mucosal T cell apoptosis and cell cycle.** PLoS One 3:e2629, 2008.

PÁL Z, Antal P, Srivastava SK, Hullám G, Semsei AF, Gál J, Svébis M, Soós G, Szalai C, André S, Gordeeva E, Nagy G, Kaltner H, Bovin NV, Molnár MJ, Falus A, Gabius HJ, Buzás EI. **Non-synonymous single nucleotide polymorphisms in genes for immunoregulatory galectins: association of galectin-8 (F19Y) occurrence with autoimmune diseases in a Caucasian population.** Biochim Biophys Acta;1820(10):1512-8. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.05.015, 2012.

PANOULAS VF, Douglas KM, Smith JP, Metsios GS, Elisaf MS, Nightingale P, Kitas GD. **Galectin-2 (LGALS2) 3279C/T polymorphism may be independently associated with diastolic blood pressure in patients with rheumatoid arthritis.** Clin Exp Hypertens.;31(2):93-104. doi: 10.1080/10641960802621267, 2009.

PATTANAIK, D., Brown, M., and Postlethwaite, A. E. **Vascular involvement in systemic sclerosis (scleroderma).** J. Inflamm. Res. 4, 105–125, 2011.

PILLAI S, Netravali IA, Cariappa A, Mattoo H. **Siglecs and immune regulation.** Annu Rev Immunol. 30:357-92, 2012.

PISETSKY, D. S., Rönblom, L. **Systemic lupus erythematosus: a matter of life and death.** Arthritis Rheum. 60, 1567–1570, 2009.

POPE JE. **Musculoskeletal involvement in scleroderma.** Rheum Dis Clin N Am; 29:391-408, 2003.

RABINOVICH, G. A., van Kooyk, Y., Cobb, B. A. **Glycobiology of immune responses.** Ann. N. Y. Acad. Sci. 1253, 1–15, 2012.

RABINOVICH GA, Daly G, Dreja H, Tailor H, Riera CM, Hirabayashi J, et al. **Recombinant Galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen-induced arthritis via T cell apoptosis.** J Exp Med;190:385–98, 1999.

RABINOVICH GA, Liu FT, Hirashima M, Anderson A. **An emerging role for Galectins in tuning the immune response: lessons from experimental models of inflammatory disease, autoimmunity and cancer.** Scand J Immunol ;66:143–58, 2007.

RABINOVICH GA, Toscano MA. **Turning ‘sweet’ on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation.** Nat Rev Immunol. 2009; 9:338–352, 2009.

RAMIREZ GA, Franchini S, Rovere-Querini P, Sabbadini MG, Manfredi AA, Maugeri N. **The role of platelets in the pathogenesis of systemic sclerosis.** Front Immunol. 18;3:160, 2012.

RAO SP, Ge XN, Sriramarao P. **Regulation of Eosinophil Recruitment and Activation by Galectins in Allergic Asthma.** Front Med (Lausanne).31;4:68. doi: 10.3389/fmed.2017.00068, 2017.

RAPOPORT EM, Bovin NV. **Specificity of human galectins on cell surfaces.** *Biochemistry (Mosc)*. 80(7):846-56, 2015.

REZAEI R, Aslani S, Dashti N, Jamshidi A, Gharibdoost F, Mahmoudi M. **Genetic implications in the pathogenesis of systemic sclerosis.** *Int J Rheum Dis*. 21(8):1478-1486. doi: 10.1111/1756-185X.13344, 2018.

RILLAHAN, C. D., Paulson, J. C. **Glycan microarrays for decoding the glycome.** *Annu. Rev. Biochem*. 80, 797–823, 2011.

ROSEN HR, Golden-Mason L, Daly AK, Yang I, Day CP. **Variants in the LGALS9 Gene Are Associated With Development of Liver Disease in Heavy Consumers of Alcohol.** *Clin Gastroenterol Hepatol*;14(5):762-8.e1. doi: 10.1016/j.cgh.2015.11.005, 2016.

RUIZ-IRASTORZA G, Khamashta MA. **Managing lupus patients during pregnancy.** *Best Pract Res Clin Rheumatol*; 23: 575–82. 6, 2009.

RUIZ-IRASTORZA G et al. **Antiphospholipid syndrome.** *Lancet*; 376: 1498–509, 2010.

SAIGUSA R, Asano Y, Nakamura K, Hirabayashi M, Miura S, Yamashita T, Taniguchi T, Ichimura Y, Takahashi T, Yoshizaki A, Miyagaki T, Sugaya M, Sato S. **Systemic sclerosis dermal fibroblasts suppress Th1 cytokine production via galectin-9 overproduction due to Fli1 deficiency.** *J Invest Dermatol*. 18. pii: S0022 202X(17)31540-3, 2017.

SANTIAGO RODRIGUEZ, Tom R. Gaunt and Ian N. M. Day. **Hardy-Weinberg Equilibrium Testing of Biological Ascertainment for Mendelian Randomization Studies.** *American Journal of Epidemiology* DOI 10.1093/aje/kwn359, 2006.

SARTER K, Janko C, André S, Muñoz LE, Schorn C, Winkler S, Rech J, Kaltner H, Lorenz HM, Schiller M, Andreoli L, Manfredi AA, Isenberg DA, Schett G, Herrmann M, Gabius HJ. **Autoantibodies against galectins are associated with**

antiphospholipid syndrome in patients with systemic lupus erythematosus.

Glycobiology.;23(1):12-22, 2013.

SAUSSEZ S, Kiss R. **Galectin-7.** Cell Mol Life Sci.;63(6):686-97, 2006.

SCHNAAR RL. **Glycobiology simplified: diverse roles of glycan recognition in inflammation.** J Leukoc Biol. 99(6):825-38, 2016.

SCHNAAR RL. **Glycans and glycan-binding proteins in immune regulation: A concise introduction to glycobiology for the allergist.** J Allergy Clin Immunol. 135(3):609-15, 2015.

SCHNAAR, R. L., Gerardy-Schahn, R., Hildebrandt, H. **Sialic acids in the brain: gangliosides and polysialic acid in nervous system development, stability, disease, and regeneration.** Physiol. Rev. 94, 461–518, 2014.

SEKI M, Sakata KM, Oomizu S, Arikawa T, Sakata A, Ueno M, Nobumoto A, Niki T, Saita N, Ito K, Dai SY, Katoh S, Nishi N, Tsukano M, Ishikawa K, Yamauchi A, Kuchroo V, Hirashima M. **Beneficial effect of galectin 9 on rheumatoid arthritis by induction of apoptosis of synovial fibroblasts.** Arthritis Rheum.;56(12):3968-76, 2007.

SELLNER J, Kraus J, Awad A, Milo R, Hemmer B, Stüve O. **The increasing incidence and prevalence of female multiple sclerosis—a critical analysis of potential environmental factors.** Autoimmun 10:495–502, 2011.

SIME K, Choy EH, Williams AS. **Alterations to adipose tissue morphology during inflammatory arthritis is indicative of vasculopathology in DBA/1 mice.** Adipocyte.3;6(2):87-101. doi: 10.1080/21623945.2017.1295174, 2017.

SMITH PP, Gordon C. **Systemic lupus erythematosus: clinical presentations.** Autoimmun; 10: 43–5, 2010.

STOWELL SR, Arthur CM, Mehta P, et al. **Galectin-1, -2, and -3 exhibit differential recognition of sialylated glycans and blood group antigens.** J. Biol. Chem.;283:10109–23, 2008.

SUAREZ-FUEYO, A., Rojas, J. M., Cariaga, A. E., García, E., Steiner, B. H., Barber, D. F., Puri, K. D., Carrera, A. C. **Inhibition of PI3Kd reduces kidney infiltration by macrophages and ameliorates systemic lupus in the mouse.** J. Immunol. 193, 544–554, 2014.

SUNDBLAD V, Morosi LG, Geffner JR, Rabinovich GA. **Galectin-1: A Jack-of-All-Trades in the Resolution of Acute and Chronic Inflammation.** J Immunol. 1;199(11):3721-3730, 2017.

SUZUKI A, YAMAMOTO K. **From genetics to functional insights into rheumatoid arthritis.** Clin Exp Rheumatol; 33 (Suppl. 92): S40-3, 2015.

TAN EM et al. **The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus.** Arthritis Rheum ; 25: 1271–7, 1982.

Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. **IL-6 in inflammation, immunity, and disease.** Cold Spring Harb Perspect Biol. 6(10):a016295, 2014.

THIJSSSEN VL, Griffioen AW. **Galectin-1 and -9 in angiogenesis: a sweet couple.** Glycobiology.;24(10):915-20, 2014.

TAKAYAMA, T., Kamada, N., Chinen, H., Okamoto, S., Kitazume, M. T., Chang, J., Matuzaki, Y., Suzuki, S., Sugita, A., Koganei, K., Hisamatsu, T., Kanai, T., Hibi, T. **Imbalance of NKp44(+)NKp46(-) and NKp44 (-)NKp46(+) natural killer cells in the intestinal mucosa of patients with Crohn's disease.** Gastroenterology 139, 882–892, 892.e1–3, 2010.

TOSCANO MA, Campagna L, Molinero LL, Cerliani JP, Croci DO, Illarregui JM, Fuertes MB, Nojek IM, Fededa JP, Zwirner NW, Costas MA, Rabinovich GA. **Nuclear factor (NF)-κB controls expression of the immunoregulatory glycan-binding**

protein galectin-1. Mol Immunol.;48(15-16):1940-9. doi: 10.1016/j.molimm.2011.05.021. PubMed PMID: 21689853, 2011.

TSOKOS GC, Lo MS, Costa Reis P, Sullivan KE. **New insights into the immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus.** Nat Rev Rheumatol; 12:716–730, 2016.

TAYLOR, M. E., Drickamer, K. **Convergent and divergent mechanisms of sugar recognition across kingdoms.** Curr. Opin. Struct. Biol. 28, 14–22, 2014.

VAN BEIJNUM JR, Thijssen VL, Läppchen T, Wong TJ, Verel I, Engbersen M, Schulkens IA, Rossin R, Grüll H, Griffioen AW, Nowak-Sliwinska P. **A key role for galectin-1 in sprouting angiogenesis revealed by novel rationally designed antibodies.** Int J Cancer. 15;139(4):824-35, 2016.

VAN DEN BERG R, de Hooge M, van Gaalen F, Reijnders M, Huizinga T, van der Heijde D. **Percentage of patients with spondyloarthritis in patients referred because of chronic back pain and performance of classification criteria: experience from the Spondyloarthritis Caught Early (SPACE) cohort.** Rheumatology (Oxford);52(8):1492-9, 2013.

VAN DEN HOOGEN F, Khanna D, Fransen J, Johnson SR, Baron M, Tyndall A, Matucci-Cerinic M, Naden RP, Medsger TA Jr, Carreira PE, Riemekasten G, Clements PJ, Denton CP, Distler O, Allanore Y, Furst DE, Gabrielli A, Mayes MD, van Laar JM, Seibold JR, Czirjak L, Steen VD, Inanc M, Kowal-Bielecka O, Müller-Ladner U, Valentini G, Veale DJ, Vonk MC, Walker UA, Chung L, Collier DH, Csuka ME, Fessler BJ, Guiducci S, Herrick A, Hsu VM, Jimenez S, Kahaleh B, Merkel PA, Sierakowski S, Silver RM, Simms RW, Varga J, Pope JE. **2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American College of Rheumatology/European League against Rheumatism collaborative initiative.** Arthritis Rheum.doi: 10.1002/art.38098, 2013.

VAN DER LEIJ, J., van den Berg, A., Blokzijl, T., Harms, G., van Goor, H., Zwiers, P., van Weeghel, R., Poppema, S., and Visser, L. **Dimeric galectin-1 induces IL-10**

production in T-lymphocytes: an important tool in the regulation of the immune response. J. Pathol., 204, 511–518, 2004.

VAN KOOYK Y, Geijtenbeek TB. **DC-SIGN: escape mechanism for pathogens.** Nat Rev Immunol. 3:697–709, 2003.

VAN KOOYK, Y. & Rabinovich, G. A. **Protein–glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses.** *Nature Immunol.* **9**, 593–601, 2008.

VEENSTRA RG, Taylor PA, Zhou Q, et al. **Contrasting acute graft-versus-host disease effects of Tim-3/galectin-9 pathway blockade dependent upon the presence of donor regulatory T cells.** Blood;120:682-90, 2012.

VIGUIER, M., Advedissian, T., Delacour, D., Poirier, F., and Deshayes, F. **Galectins in epithelial functions** .Tissue Barriers, doi: 10.4161/tisb.29103, 2014.

VOKHMYANINA OA, Rapoport EM, André S, Severov VV, Ryzhov I, Pazynina GV, Korchagina E, Gabius HJ, Bovin NV. **Comparative study of the glycan specificities of cell-bound human tandem-repeat-type galectin-4, -8 and -9.** Glycobiology.;22:1207–1217;2012.

XIBILLÉ-FRIEDMANN D, Bustos Rivera-Bahena C, Rojas-Serrano J, Burgos-Vargas R, Montiel-Hernández JL. **A decrease in galectin-1 (Gal-1) levels correlates with an increase in anti-Gal-1 antibodies at the synovial level in patients with rheumatoid arthritis.** Scand J Rheumatol.;42(2):102-7. doi: 10.3109/03009742.2012.725769, 2013.

WALKER JG, Pope J, Baron M, Leclercq S, Hudson M, Taillefer S, Edworthy SM, Nadashkevich O, Fritzler MJ.**The development of systemic sclerosis classification criteria.** Clin Rheumatol.;26(9):1401-9, 2007.

WANG B, Ma Z, Wang M, Sun X, Tang Y, Li M, Zhang Y, Li F, Li X. **IL-34 Upregulated Th17 Production through Increased IL-6 Expression by**

Rheumatoid Fibroblast-Like Synoviocytes. *Mediators Inflamm.*;2017:1567120, 2017.

WANG J, Xia J, Zhang F, Shi Y, Wu Y, Pu H, Liou AK, Leak RK, Yu X, Chen L, Chen J. **Galectin-1-secreting neural stem cells elicit long-term neuroprotection against ischemic brain injury.** *Sci Rep.* 10;5:9621, 2015.

YANABA K, Asano Y, Akamata K, Noda S, Aozasa N, Taniguchi T, Takahashi T, Toyama T, Ichimura Y, Sumida H, Kuwano Y, Miyazaki M, Sato S. (2016) Circulating galectin-1 concentrations in systemic sclerosis: potential contribution to digital vasculopathy. *Int J Rheum Dis.*;19(6):622-7.

Yang, R. Y., Rabinovich, G. A. & Liu, F. T. (2008). Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert Rev. Mol. Med.* **10**, e17.

ZHANG PF, Li KS, Shen YH, Gao PT, Dong ZR, Cai JB, Zhang C, Huang XY, Tian MX, Hu ZQ, Gao DM, Fan J, Ke AW, Shi GM. **Galectin-1 induces hepatocellular carcinoma EMT and sorafenib resistance by activating FAK/PI3K/AKT signaling.** *Cell Death Dis.* 21;7:e2201, 2016.

ZHU X, Wang K, Zhang K, Xu F, Yin Y, Zhu L, Zhou F. **Galectin-1 knockdown in carcinoma-associated fibroblasts inhibits migration and invasion of human MDA-MB-231 breast cancer cells by modulating MMP-9 expression.** *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).*;48(5):462-7, 2016.

ZIMMERMANN AF, Pizzichini MM. **Update on etiopathogenesis of systemic sclerosis.** *Rev Bras Reumatol* 53(6):516-24, 2013.

APÊNDICE A – CRITÉRIOS DE CLASSIFICAÇÃO ACR-EULAR 2010 PARA AR

População alvo	Score
Pacientes que:	
1. ter pelo menos 1 articulação com sinovite clínica definida (inchaço) *	
2. com a sinovite não melhor explicada por outra doença	
A. Envolvimento conjunto	
1 grande articulação	0
2-10 grandes articulações	1
1-3 pequenas articulações (com ou sem envolvimento de grandes articulação	2
4-10 pequenas articulações (com ou sem envolvimento de grandes articulações)	3
> 10 juntas (pelo menos 1 pequena articulação)	5
B. Sorologia (pelo menos 1 resultado do teste é necessário para classificação	
FR negativo e negativo ACPA	0
FR positivo baixo ou ACPA baixo positivo	2
FR positivo alto ou ACPA positivo alto	3
C. Reagentes da fase aguda (pelo menos 1 resultado do teste é necessário par classificação)	
PCR normal e VHS normal	0
PCR anormal ou VHS anormal	1
D. Duração dos sintomas	
<6 semanas	0
≥ 6 semanas	1

APÊNDICE B– CRITÉRIOS DE CLASSIFICAÇÃO ACR-EULAR 2010 PARA ES

Item	Sub-item	Score
Espessamento da pele dos dedos de ambas as mãos que se estendem próximo às articulações metacarpofalângicas (critério suficiente)	-	9
Espessamento da pele dos dedos (apenas contar a pontuação mais alta)	Dedos inchados	2
	Esclerodactilia dos dedos (distal a articulações metacarpofalângicas, mais proximal ao proximal articulações interfalângicas)	4
Lesões na ponta dos dedos (só contam a pontuação mais alta)	Úlceras de ponta digital	2
	Cicatrizes na ponta dos dedos	3
Telangiectasia	-	2
Capilares anormais	-	2
Hipertensão Arterial Pulmonar e / ou Doença Pulmonar Intersticial (pontuação máxima é 2)	Hipertensão Arterial Pulmonar	2
	Doença pulmonar intersticial	2
Fenômeno de Raynaud	-	3
Autoanticorpos relacionados à ES (anticentrômero, anti-topoisomerase I [anti-Scl-70], anti-RNA polimerase III) (pontuação máxima é 3)	Anticentrômero 3 Anti-topoisomerase I Anti-RNA polimerase III	3

APÊNDICE C- TERMO CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
NÚCLEO DE PESQUISA EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA – SUELY GALDINO
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS - Resolução 466/12)

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa **Associação de polimorfismos nos genes das galectinas com os níveis séricos e parâmetros clínicos das doenças auto-imunes**, que está sob a responsabilidade da pesquisadora Kamila de Melo Vilar, residente no endereço Rua Amambai, Conjunto Privê das Candeias, Bloco-F, apto 302, CEP 54.430-160, Piedade- PE, E-mail: kamilamelo_vilar@hotmail.com, Telefone: (81) 9.95090507. Também participam desta pesquisa os pesquisadores: Profa. Dra. Angela Luzia Branco Pinto Duarte, E-mail: Angelabduarte@hotmail.com, Profa. Dra. Andréa Tavares Dantas, E-mail: andreatdantas@gmail.com, Dr. Laurindo Ferreira da Rocha Júnior, E-mail: laurindorochajr@gmail.com, Dr. Henrique de Ataíde Mariz, E-mail: henriqueamariz@yahoo.com.br, disponíveis no telefone: (81) 2126-8346. Está sob a orientação da Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta, E-mail: mgrpitta@gmail.com.

Caso este Termo de Consentimento contenha informações que não lhe sejam compreensíveis, as dúvidas podem ser tiradas 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 está em duas vias, 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 nenhuma penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

- Esta pesquisa busca entender como as mudanças das células do nosso organismo podem causar algumas doenças como: artrite reumatóide, esclerose sistêmica, lúpus eritematoso sistêmico. Esta pesquisa busca entender se alguma mudança nas informações das nossas células do nosso organismo pode causar alguma das doenças citadas. Iremos estudar o seu sangue e investigar se os componentes dele podem contribuir para o aparecimento dos sintomas ou a piora destas doenças. Nesta pesquisa serão realizados experimentos com as células presentes no seu sangue que será coletado da sua veia, como uma coleta de sangue para exames laboratoriais. Deste modo, nenhum medicamento será administrado em você por ninguém em momento algum.
- Caso concorde, você participará desta pesquisa apenas com uma coleta de sangue e algumas informações do prontuário, no dia da consulta médica, sem a necessidade de deslocamento em dia adicional. Caso seja necessária a sua vinda em um dia adicional por motivo exclusivo da pesquisa, você e seu acompanhante serão ressarcidos financeiramente com o valor correspondente ao transporte e eventual alimentação.

- Para este estudo, precisamos coletar algumas células de sangue. A coleta de sangue é feita no braço e a quantidade coletada é equivalente a duas colheres de sopa (8 ml). Nenhuma coleta será realizada sem a autorização prévia dos voluntários. As coletas serão feitas por profissionais treinados e competentes e orientados para reduzir os possíveis riscos como: tromboflebite na veia puncionada, celulite local, punção acidental de outras estruturas anatômicas circunvizinhas como artéria e nervo. A coleta de sangue pode ser desconfortável e o braço pode ficar um pouco dolorido e apresentar hematoma que é uma área arroxeadada no local da coleta. Antes de iniciar a coleta, nós limparemos o braço do voluntário com álcool. Em caso de danos ocasionados por quaisquer procedimentos envolvendo a pesquisa o participante da pesquisa terá direito a assistência integral e gratuita.
- O material coletado será processado para separação do soro e extração do material genético (DNA) que será armazenado adequadamente em freezers -80°C e poderá ser utilizado em pesquisas futuras, com prévia autorização do Comitê de Ética em Pesquisa, e/ou da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, e pelo participante da pesquisa. As amostras serão manipuladas no Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT), pertencente ao Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco. As amostras de sangue serão destinadas à quantificação de proteínas contidas no soro pelo ensaio imunoenzimático ELISA, e à pesquisa de polimorfismos no gene LGALS1, 3,7 e 9 através da técnica de PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) em tempo real. O participante da pesquisa e o voluntário sadio não irão fazer exames ou testes genéticos diretamente.
- O participante da pesquisa e o médico que o acompanha possui total acesso aos seus dados, bem como resultados de exames, os quais ficarão armazenados sob total sigilo e confidencialidade. Caso solicitado, o participante da pesquisa poderá retirar o consentimento de guarda das amostras biológicas humanas e dos dados genéticos humanos armazenados no estudo. Esta solicitação deverá ser realizada por escrito e assinada, e que dar-se-á a qualquer tempo, sem prejuízo ao participante da pesquisa, com validade a partir da data da comunicação da decisão, sendo necessária a devolução/ destruição de todas as amostras biológicas coletadas durante o estudo, bem como a retirada dos dados genéticos do banco onde se encontrem armazenadas.
- Somente serão realizados os testes com amostras biológicas que estiverem descritos no TCLE e autorizados pelo participante da pesquisa ao assiná-lo. Os benefícios deste estudo consistem em entender o desenvolvimento dessas doenças e assim melhorar a qualidade de vida dos participantes da pesquisa.

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 (prontuários), ficarão armazenados em computador pessoal, sob a responsabilidade da pesquisadora, no endereço acima informado, pelo período de mínimo 5 anos para o desenvolvimento de

projetos paralelos de alunos de graduação e pós-graduação, sendo necessário a anuência do participante da pesquisa para o acesso e uso dos seus dados de prontuário. O participante da pesquisa será informado sobre a perda ou destruição de suas amostras biológicas, bem como sobre o encerramento do Biorrepositório.

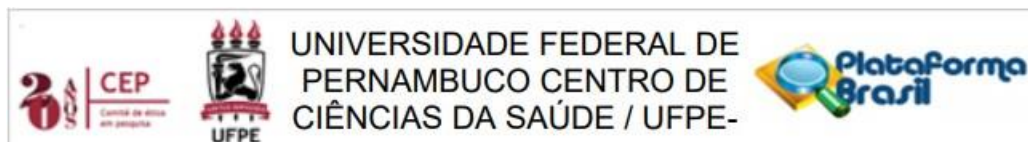
Nada lhe será pago e nem será cobrado para participar desta pesquisa, pois a aceitação é voluntária, mas fica também garantida a indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão completamente assumidas pelos pesquisadores, como por exemplo: ressarcimento de transporte e alimentação, através do pagamento das despesas.

A pesquisadora responsável dará acesso aos resultados de exames ao médico do participante ou ao próprio participante sempre que solicitado e/ou indicado. Caso seja descoberto qualquer problema de saúde não identificado previamente, haverá acompanhamento e encaminhamento médico especialista. A pesquisadora e o patrocinador da pesquisa não se responsabiliza por outros serviços de saúde (tais como planos de saúde e o SUS) ou o próprio participante da pesquisa.

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: **(Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).**

(assinatura do pesquisador)

ANEXO A- APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.978.712

Outros	KamiladeMeloVilar.pdf	22/11/2016 22:36:10	Kamila de Melo Vilar	Aceito
Outros	HenriquedeAtaideMariz.pdf	22/11/2016 22:35:48	Kamila de Melo Vilar	Aceito
Outros	AngelaLuziaBrancoPintoDuarte.pdf	22/11/2016 22:35:14	Kamila de Melo Vilar	Aceito
Outros	AndreaTavaresDantas.pdf	22/11/2016 22:33:00	Kamila de Melo Vilar	Aceito
Outros	anuenedados.docx	22/11/2016 22:28:20	Kamila de Melo Vilar	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	carta_anuencia_nipit_kamila.pdf	22/11/2016 22:26:38	Kamila de Melo Vilar	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	carta_anuencia_hc_kamila.pdf	22/11/2016 22:26:02	Kamila de Melo Vilar	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Sim

RECIFE, 23 de Março de 2017

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
(Coordenador)