



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

**AYSA CÉSAR PINHEIRO**

**AVALIAÇÃO DAS GALECTINAS 1 E 3 SÉRICAS E SALIVARES EM  
PACIENTES COM SÍNDROME DE SJÖGREN PRIMÁRIA E SUA  
ASSOCIAÇÃO COM MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA DOENÇA**

Recife  
2021

AYSA CÉSAR PINHEIRO

**AVALIAÇÃO DAS GALECTINAS 1 E 3 SÉRICAS E SALIVARES EM  
PACIENTES COM SÍNDROME DE SJÖGREN PRIMÁRIA E SUA  
ASSOCIAÇÃO COM MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA DOENÇA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Inovação Terapêutica.

**Área de concentração:**

Fármacos, medicamentos e insumos essenciais para a saúde

**Orientador:**

Prof<sup>a</sup> Dra. Angela Luzia Branco Pinto Duarte

**Co-orientadores:**

Prof<sup>o</sup> Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo

Prof<sup>a</sup> Dra. Andrea Tavares Dantas

Recife  
2021

Catálogo na Fonte:  
Elaine C Barroso, CRB-4/1728

Pinheiro, Aysa César

Avaliação das galectinas 1 e 3 séricas e salivares em pacientes com Síndrome de Sjögren primária e sua associação com manifestações clínicas da doença / Aysa César Pinheiro – 2021.

96 f. : il., fig., tab.

Orientadora: Angela Luzia Branco Pinto Duarte

Coorientadores: Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo e Andrea Tavares Dantas

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Recife, 2021.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Lectinas 2. Sjögren, Síndrome de 3. Auto-imunidade I. Duarte, Angela Luzia Branco Pinto (orient.). II. Rêgo, Moacyr Jesus Barreto de Melo (coorient.) III. Dantas, Andrea Tavares (coorient.) IV. Título

AYSA CÉSAR PINHEIRO

**AVALIAÇÃO DAS GALECTINAS 1 E 3 SÉRICAS E SALIVARES EM  
PACIENTES COM SÍNDROME DE SJÖGREN PRIMÁRIA E SUA  
ASSOCIAÇÃO COM MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA DOENÇA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Inovação Terapêutica. Área de concentração: Fármacos, medicamentos e insumos essenciais para a saúde

Aprovada em: 06 / 08 / 2021

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profª Drª Angela Luzia Branco Pinto Duarte (Orientadora)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Profº Dr Henrique de Ataíde Mariz  
(Examinador Externo)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Profº Dr Luiz Alcino Monteiro Gueiros  
(Examinador Externo)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Profª Drª Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro  
(Examinadora Interna)  
Universidade Federal de Pernambuco

## AGRADECIMENTOS

A realização desta dissertação de mestrado contou com importantes apoios, sem os quais não se teria tornado uma realidade e aos quais sou eternamente grata.

A Deus pela força e saúde me ofertadas e iluminação nos momentos difíceis da minha vida.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dra. Angela Duarte, pelo apoio e constante disponibilidade na realização desse trabalho. Sempre referência na reumatologia, enriquecendo discussões e trazendo experiência na produção científica. Exemplo de dedicação na reumatologia e de motivação para conclusão de todas as etapas do mestrado, sempre presente desde o início do projeto e nas correções, meus sinceros agradecimentos.

Ao Prof. Dr. Moacyr Rego, meu co-orientador, que esteve sempre presente, mesmo distante fisicamente, em todas as etapas na realização desta dissertação e deu todo o suporte para a finalização deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup> Dra. Andrea Dantas, minha co-orientadora, sempre disponível desde o início do projeto, auxiliando nas correções e ajustes desta dissertação e que sempre nos ensina através de conhecimento na vida acadêmica.

Aos meus pais, Livia e Amauri, pelo amor incondicional, apoio e paciência em cada passo da minha formação.

À minha amiga Julia Carone pelo auxílio nesses anos do mestrado e por ter compartilhado os anos de residência na reumatologia.

À minha amiga Paula Toche, pelo apoio nos anos de mestrado e por compartilhar comigo o ambulatório de Síndrome de Sjögren durante todo o período do mestrado.

À Maria Clara e ao Anderson que me ajudaram bastante nos processos do Elisa e da imunohistoquímica para que este trabalho pudesse ser concluído.

À Prof<sup>a</sup> Dra. Mariana Lira, especialista em patologia, pela revisão de todas as lâminas de imunohistoquímica que foi essencial na conclusão desta pesquisa.

Ao serviço de reumatologia do HC-UFPE e aos pacientes, sem os quais este trabalho não teria propósito.

## RESUMO

A Síndrome de Sjögren Primária (SSP) é uma doença autoimune complexa e heterogênea caracterizada por infiltração linfocítica principalmente em glândulas salivares e lacrimais. Os objetivos do trabalho foram avaliar os níveis de galectinas 1 (Gal-1) e 3 (Gal-3) séricas e salivares em SSP e sua associação com manifestações clínicas da doença. Foi analisado o perfil clínico de 43 pacientes portadores de SSP do Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco. Para análise das variáveis, utilizamos os critérios classificatórios ESSDAI (*EULAR Sjögren's Syndrome Disease Activity Index*), índices de atividade de doença ESSPRI (*Eular Sjögren's Syndrome Patient Reported Index*) e o índice de dano SSDDI (*Sjogren's Syndrome Disease Damage Index*). Foram analisados os níveis de Gal-1 e Gal-3 séricas e salivares pelo ELISA e correlacionados com variáveis clínicas e laboratoriais. Além disso, as Gal -1 e -3 foram avaliadas por imunohistoquímica em 24 biópsias salivares menores. Das 43 pacientes selecionadas, todas foram do sexo feminino, com média de idade de 45,28 anos. O valor da mediana da Gal-1 no soro foi de 33338,30 pg/ml comparada com os controles 2002,86 pg/ml com  $p < 0,001$  e a mediana da Gal-3 no soro foi de 4452,50 pg/ml e dos controles foi de 2004,00 pg/ml com  $p < 0,001$ . O valor da mediana da Gal-1 salivar também foi mais elevada em relação ao grupo controle (7015,3 x0 pg/ml) com  $p = 0,038$ , porém maiores níveis não foram encontrados nos pacientes em relação aos controles para a Gal-3 salivar. Observou-se uma maior mediana nos níveis de Gal-3 salivar nos pacientes que desenvolveram manifestações glandulares da doença ( $p = 0,015$ ) e houve correlação direta moderada ( $r = 0,64$  com  $p = 0,025$ ) entre os níveis de Gal-3 salivar e o número de linfócitos. Observou-se maior marcação da Gal-3 nos ductos de tecido glandular das biópsias de glândulas salivares menores, comparado com a pouca expressão da Gal-1. Não houve associação estatisticamente significativa entre os níveis das galectinas (Gals) séricas e salivares com as provas de atividade inflamatória (PCR, VHS) e com dosagem de IgG sérica. Observou-se o aumento dos níveis de Gal-1 e Gal-3 séricas e de Gal-1 salivar em pacientes com SSP comparados com os indivíduos saudáveis, além de maiores níveis da Gal-3 salivar nos pacientes que pontuaram no domínio glandular do ESSDAI, como também maior expressão de Gal-3 nas biópsias de glândulas salivares menores. Esses

achados apontam para uma possível aplicabilidade dessas Gals como biomarcadores em SSP.

**Palavras- Chave:** lectinas; galectina 1; galectina 3; síndrome de Sjögren; doenças autoimunes.

## ABSTRACT

Primary Sjogren's Syndrome (SSP) is a complex and heterogeneous autoimmune disease characterized by lymphocytic infiltration mainly in salivary and lacrimal glands. The objectives were evaluate the serum and salivary levels of galectins 1(Gal-1) and 3 (Gal-3) in SSP and their association with clinical manifestations of the disease. The clinical profile of 43 patients with SSP from the Rheumatology Service of the Hospital das Clínicas of the Federal University of Pernambuco was analyzed. To analyze the variables, we used the ESSDAI classification criteria (EULAR Sjögren's Syndrome Disease Activity Index), disease activity index ESSPRI (EULAR Sjögren's Syndrome Patient Reported Index) and the SSDDI damage index (Sjogren's Syndrome Disease Damage Index).Serum and salivary Gal-1 and Gal-3 levels were analyzed by ELISA and correlated with clinical and laboratory variables. In addition, Gal-1 and Gal-3 were evaluated by immunohistochemistry on the 24 minor salivary biopsies. Of the 43 selected patients, all were female, with a mean age of 45.28 years. The median value of Gal-1 in serum was 33338,30 pg/ ml compared to controls 2002,86 pg/ ml with  $p < 0.001$  and the median of Gal-3 in serum was 4452,50 pg/ ml and of controls it was 2004,00 pg/ ml with  $p < 0.001$ . The median value of salivary Gal-1 was also higher compared to the control group (7015.3 x0 pg/ml) with  $p = 0.038$ , but higher levels were not found in patients compared to controls for salivary Gal-3. There was a higher median in salivary Gal-3 levels in patients who developed glandular manifestations of the disease ( $p = 0.015$ ) and there was a moderate direct correlation ( $r = 0.64$  with  $p = 0.025$ ) between salivary Gal-3 levels and the number of lymphocytes. Higher labeling of Gal-3 was observed in the glandular tissue ducts of minor salivary glands biopsies, compared with low expression of Gal-1. There was no statistically significant association between serum and salivary galectins (Gals) levels with inflammatory activity tests (CRP, ESR) and serum IgG dosage. Increased serum Gal-1 and Gal-3 and salivary Gal-1 levels were observed in patients with SSP compared to healthy individuals, in addition to higher levels of salivary Gal-3 in patients who scored in the glandular domain of ESSDAI, as well as increased expression of Gal-3 in minor salivary glands biopsies. These findings point to a possible applicability of these galectins as biomarkers in SSP.

**Keywords:** lectins; galectin 1; galectin 3; Sjogren's syndrome; autoimmune diseases.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	<b>Página</b>
<b>Quadro 1-</b> Critérios classificatórios da Síndrome de Sjögren (SSj) AECG 2002	<b>25</b>
<b>Figura 1-</b> Figura representativa da família das galectinas	<b>30</b>
<b>Figura 2-</b> Efeitos imunológicos das Gal-1 e -3	<b>33</b>
<b>Figura 3-</b> Casos de pacientes com SSP com expressão negativa (A) e marcação positiva no estroma glandular (B) para Gal-1, controle positivo (C) e negativo (D) de tecido renal respectivamente.	<b>61</b>
<b>Figura 4-</b> Caso de paciente com SSP com marcação positiva para Gal-3 (A1- marcação em região ductal e A2- marcação em região ductal com infiltrado inflamatório importante), controle positivo (B) e negativo (C) de tecido cólon respectivamente.	<b>63</b>

## **LISTA DE FLUXOGRAMAS**

		<b>Página</b>
<b>Fluxograma 1-</b>	Metodologia da pesquisa	<b>40</b>
<b>Fluxograma 2-</b>	Etapas do ELISA	<b>43</b>
<b>Fluxograma 3-</b>	Etapas da Imunohistoquímica	<b>46</b>

## LISTA DE GRÁFICOS

		<b>Página</b>
<b>Gráfico 1-</b>	Níveis séricos de Gals -1 e -3 nos grupos SSP e controles	<b>52</b>
<b>Gráfico 2-</b>	Níveis salivares de Gals -1 e -3 nos grupos SSP e controles	<b>53</b>
<b>Gráfico 3-</b>	Dispersão entre os níveis das Gals no grupo SSP	<b>54</b>
<b>Gráfico 4-</b>	Dispersão dos níveis de Gal- 1 salivar com ESSPRI no grupo SSP	<b>55</b>
<b>Gráfico 5-</b>	Níveis de Gal-3 sérica segundo positividade ou não do fator reumatoide no grupo SSP	<b>58</b>

## LISTA DE TABELAS

		Página
<b>Tabela 1-</b>	CrITÉrios classificatÓrios para SSP pelo ACR/EULAR 2016	<b>26</b>
<b>Tabela 2-</b>	CaracterizaÇão da amostra de pacientes com SSP do HC-UFPE e de controles (N=43)	<b>50</b>
<b>Tabela 3-</b>	Características patolÓgicas das 34 biÓpsias de glândulas salivares menores dos pacientes com SSP.	<b>51</b>
<b>Tabela 4-</b>	Médias do ESSDAI, ESSPRI e SSDDI e freqüência dos domínios do ESSDAI em pacientes com SSP, 2019-2020, HC-UFPE, (N=43).	<b>51</b>
<b>Tabela 5-</b>	Correlação entre as Gal-1 e -3 no soro e na saliva no grupo SSP	<b>54</b>
<b>Tabela 6-</b>	Correlação entre as Gal-1 e -3 no soro e na saliva com as médias ESSDAI, SSDDI e ESSPRI no grupo SSP	<b>55</b>
<b>Tabela 7-</b>	Correlação entre as Gal-1 e -3 no soro e na saliva com os níveis dos linfÓcitos e IgG séricas no grupo SSP	<b>55</b>
<b>Tabela 8-</b>	AssociaÇão entre os níveis séricos das Gal-1 e -3 com os domínios do ESSDAI no grupo SSP	<b>56</b>
<b>Tabela 9-</b>	AssociaÇão entre os níveis salivares das Gal-1 e -3 com os domínios do ESSDAI no grupo SSP	<b>57</b>
<b>Tabela 10-</b>	AssociaÇão entre os níveis séricos das Gal-1 e -3 com os autoanticorpos no grupo SSP	<b>58</b>
<b>Tabela 11-</b>	AssociaÇão entre os níveis salivares das Gal-1 e -3 com os autoanticorpos no grupo SSP	<b>59</b>
<b>Tabela 12-</b>	AssociaÇão entre os níveis séricos das Gal-1 e -3 com os testes de avaliaÇão ocular, oral e biÓpsia de glândula salivar no grupo SSP	<b>59</b>
<b>Tabela 13-</b>	AssociaÇão entre os níveis salivares das Gal-1 e -3 com os testes de avaliaÇão ocular, oral e biÓpsia de glândula salivar no grupo SSP	<b>60</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR: Artrite Reumatoide

ACR: Colégio Americano de Reumatologia do inglês *American College of Rheumatology*

AECG: do inglês *American-European Consensus Group*

AntiCarP: anticorpo relacionado a proteínas carbamiladas

Anti CCP: anticorpo peptídeo citrulinado cíclico

BSA: do inglês *Bovine serum albumin*

CA6: anidrase carbônica 6

CDs: células dendríticas

CD4 +: do inglês *cluster of differentiation 4*

CIDP: polineuropatia inflamatória desmielinizante crônica

CRD: domínio de reconhecimento de carboidrato

DAS: do inglês *Disease Activity score*

DAB: diaminobenzidina

DMARDS: drogas modificadoras do curso da doença

DP: Desvio Padrão

ELISA: do inglês *Enzyme-linked immunosorbent assay*

ESSDAI: do inglês *EULAR Sjögren's Syndrome Disease Activity Index*

ESSPRI: do inglês *Eular Sjögren's Syndrome Patient Reported Index*

EULAR: do inglês *European Alliance of Associations for Rheumatology*

FAN: anti-células HEp-2

FS: escore focal

FR: fator reumatoide

Galectinas: Gals

Gal -1: Galectina 1

Gal- 3: Galectina 3

GN: glomerulonefrite

HAQ: do inglês *Health Assessment Questionnaire*

HB: hemoglobina

HLA: do inglês *Human leukocyte antigen*

HRP: estreptavidina- biotina-peroxidase

HC-UFPE: Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco

IC: Insuficiência Cardíaca

IgG: imunoglobulina G

IL 17: Interleucina 17

IL17F: Interleucina 17F

IMC: Índice de Massa Corpórea

LINAT: Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas

LES: Lupus Eritematoso Sistêmico

NTI: nefrite tubulointersticial

NK: do inglês *Natural Killer*

OSS: do inglês *Ocular Staining Score*

PBS: tampão fosfato do inglês *Phosphate Buffered Saline*

PCR: proteína C reativa

PINE: pneumonia intersticial não específica

PIU: pneumonia intersticial usual

PSP: proteína secretora da parótida

P25: Percentil 25

P75: Percentil 75

RCT: Receptor de células T

SAME: Serviço de Arquivo Médico e Estatística

SSDDI: do inglês *Sjogren's Syndrome Disease Damage Index*

SSj: Síndrome de Sjögren

SSP: Síndrome de Sjögren Primária

SNC: sistema nervoso central

SNP: sistema nervoso periférico

SP1: anticorpos da proteína salivar 1

TA: temperatura ambiente

Th1: do inglês *T helper 1*

Th17: do inglês *T helper 17*

TMB: tetrametilbenzeno

TFG: taxa de filtração glomerular

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

VHS: velocidade de hemossedimentação

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>20</b>
2.1	Síndrome de Sjögren.....	20
2.1.1	Patogênese.....	20
2.1.2	Manifestações Clínicas.....	21
2.1.3	Exames de diagnóstico e complementares.....	22
2.1.4	Crítérios Classificatórios.....	24
2.1.5	Diagnóstico Diferencial.....	26
2.1.6	Índices de Atividade da Doença.....	26
2.1.7	Tratamento.....	27
2.1.8	Novos Biomarcadores.....	28
2.2	Galectinas.....	29
2.2.1	Definição.....	29
2.2.2	Galectina 1.....	30
2.2.3	Galectina 3.....	31
2.3	Síndrome de Sjögren e Galectinas.....	33
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>34</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>35</b>
4.1	Gerais.....	35
4.2	Específicos.....	35
<b>5</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>36</b>
5.1	Desenho da pesquisa.....	36
5.2	Local da pesquisa.....	36
5.3	Amostra da pesquisa.....	36
5.4	Critérios de inclusão e exclusão do grupo SSP.....	36
5.5	Critérios de inclusão e exclusão do grupo controle.....	37
5.6	Recrutamento dos participantes.....	37
5.7	Instrumentos de coleta de dados.....	37
5.8	Definições das variáveis clínicas estudadas.....	38
5.9	Procedimento para coleta de amostras.....	39

5.10	Análise das amostras de sangue e de saliva pelo ELISA.....	41
5.11	Análise de Imunohistoquímicas das biópsias salivares.....	43
5.12	Aspectos éticos.....	47
5.13	Análise e interpretação dos dados.....	48
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>49</b>
6.1	Comparação entre os grupos SSP e controles.....	52
6.2	Resultados do grupo SSP.....	54
6.3	Resultados das análises imunohistoquímicas das biópsias salivares.....	60
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>65</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>68</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>69</b>
	<b>APÊNDICES</b> .....	<b>73</b>
A	TCLE .....	73
B	Ficha Clínica .....	76
C	Trabalho publicado no mestrado.....	83
D	Trabalho enviado para a publicação no mestrado.....	84
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>85</b>
A	ESSDAI .....	85
B	ESSPRI .....	90
C	SSDDI.....	91
D	Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa.....	92
E	Financiamento da SBR.....	96

## 1. INTRODUÇÃO

A Síndrome de Sjögren (SSj) é uma exocrinopatia autoimune, multissistêmica, crônica caracterizada pela hipofunção das glândulas salivares e lacrimais devido à infiltração linfocítica (DHIRAPONG et al., 2009; SHIBOSKI et al., 2016). É classificada como primária, quando ocorre de forma isolada, sem outra doença autoimune sistêmica, podendo também estar associada a outras doenças reumatológicas autoimunes como lúpus eritematoso sistêmico (LES), artrite reumatoide (AR) e esclerose sistêmica (RISCHMUELLER et al., 2016).

A Síndrome de Sjögren Primária (SSP) é mais freqüente em mulheres, numa relação de mulher/homem (10:1) e com pico de incidência na quinta década de vida. A doença tem incidência estimada entre 3,9-6,0/100.000 habitantes e sua prevalência é de 0,17% em estudo populacional brasileiro, com prevalência mundial de 0,1 a 4,8%. É uma doença de evolução lenta e progressiva, que acomete principalmente as glândulas salivares, as lacrimais e as articulações, podendo afetar também os pulmões, o sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP) e os rins em cerca de 50% dos pacientes, além de apresentar alto risco de transformação para linfoma (VALIM et al., 2015).

Historicamente, a SSP foi relacionada à resposta Th1 devido à predominância de células T CD4+ e do seu produto, interferon gama, nos órgãos alvo e no sangue periférico dos pacientes (MATSUI; SANO, 2017). Há descrição que a resposta imune Th17, principalmente a IL-17F, também desempenha um papel vital na fisiopatologia da SSP (GAN, 2017). De fato, níveis mais altos de IL-17 sérica foram detectados em pacientes com SSP e estão correlacionados com os graus de inflamação nas glândulas salivares (ZHANG et al., 2014).

Nos últimos 40 anos, interleucinas têm sido estudadas como candidatos a biomarcadores em potencial em relação ao desenvolvimento da SSj. Contudo, estes não se tornaram marcadores de diagnóstico validados. Novos biomarcadores podem ser valiosos na descrição de subfenótipos de SSj e, portanto, sinalizar sinais de atividade de doença para esses subgrupos de pacientes. Outro aspecto muito importante é que os biomarcadores podem estar presentes muitos anos antes do aparecimento de sintomas clínicos. Dessa forma, o benefício potencial dos testes de diagnóstico de forma precoce ajudaria no acompanhamento dos pacientes assintomáticos (JONSSON et al., 2018).

No estudo dos biomarcadores, as galectinas (Gals) têm sido avaliadas em algumas doenças autoimunes como na AR e no LES, visto que elas desempenham várias funções no sistema imunológico, como regulação de células T, apoptose celular e tolerância imunológica, porém seu papel na SSP ainda não foi bem estabelecido (ISSA, et al., 2017; MATSUOKA, et al., 2020).

Segundo Mendez–Huergo e cols. (2019), no estudo sobre Gal-1 e -3 no soro de pacientes com AR, utilizando drogas modificadoras do curso da doença (DMARDS) e/ou corticoides, foi encontrado que Gal-1 estava aumentada e teve correlação com VHS ( $r = 0,39$ ,  $p = 0,0006$ ) e com índice de atividade de doença- DAS-28 (*disease activity score*) ( $r = 0,25$ ,  $p = 0,029$ ). Por outro lado, Gal-3 esteve reduzida em pacientes com AR em vigência de tratamento. Concluíram os autores que os níveis de Gal-1 e Gal-3 são importantes para diferenciar pessoas saudáveis de pacientes com AR (MENDEZ-HUERGO et al., 2019).

Em contrapartida ao estudo de Mendez-Huergo, Issa e cols. (2017) reportaram concentrações aumentadas de Gal-3 no soro de pacientes com AR virgens de tratamento, sugerindo que DMARDS e/ou corticoides poderiam inibir a regulação da Gal-3, um potencial mediador pro-inflamatório em AR (ISSA et al., 2017).

Além da importante pesquisa em busca de marcadores séricos como as Gals para as doenças autoimunes, também se tem procurado biomarcadores de diagnóstico para aplicação clínica utilizando a saliva, biofluido de correlação direta com a glândula salivar e que é coletado de forma não invasiva. Porém até o momento, a demanda por um teste analítico que permita a detecção de SSj em um estágio inicial usando saliva ainda não foi suficientemente abordado (JONSSON et al., 2018). Em um estudo analisando a saliva dos pacientes com SSj, observou-se que esses pacientes tinham níveis aumentados de IgG, antiRo/SSA e anti La/SSB na saliva (KYRIAKIDIS et al., 2013; TENGNER et al., 1998).

O primeiro estudo que dosou Gal-3 na saliva humana foi o de Zhang e cols. (2016) que avaliaram níveis de Gal-3 em saliva e no soro de pacientes com insuficiência cardíaca (IC). Os autores observaram que níveis de Gal-3 foram elevados na saliva e no soro dos pacientes com IC comparado com controles (ZHANG et al., 2016).

Portanto, a medição das Gals no soro e na saliva dos pacientes com SSP pode ter benefícios no diagnóstico e na abordagem clínica, pois se sabe que há diferentes fenótipos da doença. Diante da escassez de estudos sobre Gals em pacientes com SSP, nossa pesquisa avaliou as Gal- 1 e -3 séricas e, de maneira inédita, seu comportamento

na saliva desses pacientes e sua possível associação com manifestações clínicas. Além disso, avaliou-se também o perfil de expressão das Gal -1 e -3 nas biópsias salivares menores dos pacientes com SSP, já que a biópsia de glândula salivar menor se constitui o critério mais objetivo para diagnóstico dessa doença.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Síndrome de Sjögren

#### 2.1.1 Patogênese

A patogênese da SSj caracteriza-se por um processo em várias etapas, disparado por um gatilho ambiental, em um indivíduo predisposto geneticamente, que vai ativar as respostas imunes inatas e adaptativas, levando ao processo de autoimunidade e inflamação crônica. Os fatores genéticos estão associados ao desenvolvimento da SSj. Dentre os relacionados ao HLA (*Human leukocyte antigen*), encontraram-se os HLA-DR3, B8, DQ2 e C4 em 50% dos portadores da SSj caucasianos e o DRB1\*0803-DQA1\*0103-DQB1\*0601 nos chineses. Dentre os não relacionados ao HLA, as maiores associações incluem o IRF5 e o TNIP, que estão envolvidos com a imunidade inata e o BLK, STAT4, IL12-A e o CXCR5, que estão envolvidos com a imunidade adaptativa (RISCHMUELLER et al., 2016).

Além disso, os fatores ambientais, como infecções virais prévias com vírus sialotrópicos principalmente os vírus Epstein-Barr e Citomegalovírus, além de infecções por HTLV, Herpes Vírus Humano dos tipos 6 e 8, vírus da hepatite C, dentre outras ou bacterianas (*Helicobacter pylori*) já foram relacionadas como potenciais desencadeadores da resposta imune ao tecido glandular, devido à freqüente concomitância em pacientes com SSj (RISCHMUELLER et al., 2016).

Os fatores hormonais também foram descritos por fazerem parte da fisiopatologia da SSj, principalmente as deficiências de andrógenos, estrógeno e de progesterona. A deficiência de estrógeno pode justificar a sua prevalência aumentada em mulheres, especialmente no período pós menopausa porque existem receptores de estrógeno nas glândulas salivares, os quais, quando ativados, diminuem o recrutamento de linfócitos e previnem a morte celular. Esses fatores causam a ativação da célula epitelial, expressando ligantes, citocinas e quimiocinas os quais vão estimular as células do sistema imune como células dendríticas (CDs), *natural killers* (NK) e macrófagos. CDs interagem com células T *helper* e resultam em aumento de produção de interferon e dano tecidual. O interferon provoca a estimulação autorreativa das células B, produção de anticorpos e inflamação crônica das glândulas salivares e lacrimais e de outros tecidos acometidos. As manifestações extraglandulares podem ocorrer por mecanismos

semelhantes ao que ocorrem na glândula e, também por deposição de imunocomplexos (por exemplo, vasculite crioglobulinêmica) ou por linfoproliferação extranodal (por exemplo, pneumonite intersticial linfocítica). A estimulação crônica das células B nos tecidos alvo pode levar ao desenvolvimento de linfoma, novamente, por processo que ocorre em várias etapas e em indivíduos geneticamente predispostos (RISCHMUELLER et al., 2016).

### **2.1.2 Manifestações Clínicas**

Há dois subgrupos de pacientes com manifestações clínicas, padrões histológicos, perfil de citocinas e prognósticos diferentes. Um grupo com manifestações glandulares com sintomas de secura oral e ocular com grande impacto na qualidade de vida; e outro com manifestações extraglandulares, com envolvimento sistêmico e que se associam ao aumento de morbimortalidade. Cerca de 70% dos pacientes apresentam sintomas restritos à glândula, 30% desenvolvem alguma manifestação sistêmica e 5% evoluem com linfoma de células B. Sabe-se também que, na presença de púrpura, crioglobulinemia, aumento persistente de glândulas parótidas e infiltrado inflamatório intenso em glândula salivar menor, pacientes com SSj possuem um risco de 9 a 44 vezes maior de desenvolver linfoma (RAMOS CASALS et al., 2012).

O acometimento glandular leva a manifestações clínicas de secura oral (xerostomia), ocular (xerofthalmia), cutânea (xerodermia), das vias aéreas (xerotraqueia) e vaginal, além de parotidite recorrente. As manifestações orais relacionadas à secura são: sensação de boca seca, aumento de cáries, disfagia, diminuição do paladar, sensação de queimação em mucosa oral e halitose. Pacientes que apresentam olho seco podem desenvolver prurido, hiperemia, irritação, sensação de corpo estranho, turvação visual e diminuição da acuidade. A secura do trato respiratório superior e inferior ocasiona sintomas de rinite, secura nasal, orofaríngea e traqueal, com tosse seca persistente. A secura genital é representada pela vaginite seca, com irritação, prurido e dispareunia (SHIBOSKI et al., 2016).

As manifestações cutâneas ocorrem em 16% dos casos, sendo mais frequentes as vasculites do tipo púrpura, lesões urticariformes, eritema nodoso ou eritema poliformo. Além disso, podem existir ainda lesões de lúpus cutâneo subagudo e fotossensibilidade indistinguíveis do LES. Os sintomas musculoesqueléticos mais frequentes são mialgia e fadiga (50% dos pacientes). Miopatia inflamatória é descrita em apenas 2,5 a 10% dos

pacientes. A doença articular é comum e tipicamente uma poliartrite não erosiva e não deformante ou poliartralgia inflamatória em 30% dos casos (RAMOS CASALS et al., 2012).

O acometimento pulmonar na SSP varia de 9 a 27%. O padrão mais freqüente é a pneumonia intersticial não específica (PINE), além da presença de pneumonia intersticial usual (PIU), pneumonia organizante, pneumonia intersticial linfocítica e bronquiolite crônica. As manifestações renais ocorrem em um terço dos casos, cerca de 85% são a nefrite tubulointersticial (NTI) e 15% glomerulonefrite (GN). A NTI pode evoluir com acidose tubular renal distal (forma mais freqüente), paralisia periódica hipocalêmica, osteomalácia e nefrocalcinose. A GN é uma manifestação mais rara, sendo as formas histológicas mais comuns as membranoproliferativas e mesangiais (SHIBOSKI et al., 2016).

Em 20% dos pacientes com SSP, tanto o SNP como o SNC podem ser acometidos. As polineuropatias axonais sensitivas e sensitivomotoras representam mais de 50% dos casos. Entre as manifestações do SNC estão: (i) as focais/multifocais (convulsões, distúrbios do movimento, síndrome cerebelar, neurite óptica, esclerose múltipla símile, vasculite do SNC), (ii) as difusas (comprometimento cognitivo, encefalopatia, demência, distúrbios psiquiátricos) e (iii) as disfunções da medula espinhal (mielopatia progressiva aguda e crônica, bexiga neurogênica e mielite transversa aguda) (RAMOS CASALS et al., 2012).

As manifestações hematológicas se caracterizam por citopenias (leucopenia, linfopenia, neutropenia, anemia hemolítica e plaquetopenia) (RAMOS CASALS et al., 2012).

### **2.1.3 Exames de diagnóstico e complementares**

Para avaliação da secreta ocular, essa geralmente é realizada através do teste de Schirmer tipo 1, o *break up time* (BUT), o *Ocular Staining Score* (OSS) e *van Bijsterveld*. O teste de Schirmer (sem uso de anestésico) mede a quantidade de lágrima produzida em 5 minutos com uma fita de papel de filtro estéril (5 x 35 mm) no saco conjuntival inferior e se mede a extensão do papel que ficou úmida; valores  $\leq 5$ mm/5 min são sugestivos de olho seco. No *break up time* (BUT) mede-se o tempo de ruptura do filme lacrimal, que é definido como o tempo em segundos entre o último piscar e o aparecimento de áreas secas na superfície da córnea do paciente. O teste deve ser

repetido três vezes e o valor médio <10 segundos é considerado anormal. Mais recentemente têm sido preconizado o OSS  $\geq 5$  ou o *van Bijsterveld*  $\geq 4$  em pelo menos um olho. No OSS, realiza-se o exame ocular com fluoresceína para pontuar a córnea e o verde lissamina para pontuar a conjuntiva bulbar. Cada córnea é examinada à lâmpada de fenda e a erosão epitelial puntata aparece corada. O total do OSS de cada olho é a somatória da pontuação da fluoresceína e do verde lissamina. Os olhos são graduados separadamente com uma pontuação máxima de 12 para cada olho. A escala de *van Bijsterveld* é aplicada usando os mesmos corantes e divide a superfície ocular em três zonas: conjuntiva bulbar nasal, conjuntiva bulbar temporal e córnea. Cada zona é avaliada numa escala de 0 a 3 (0 indicando nenhuma coloração e 3 indicando coloração confluyente) e a pontuação máxima possível de cada olho é 9 (WHITCHER et al., 2010).

Para a quantificação do fluxo salivar, utiliza-se a sialometria que é a medida do fluxo salivar não estimulado. O teste consiste no escoamento passivo da saliva não estimulada durante 15 minutos, sendo positivo com fluxo  $\leq 0,1$  ml/min. Apesar de não fazer parte dos critérios classificatórios, pode-se também induzir o fluxo salivar através de sialogogos mecânicos ou químicos. Utiliza-se também a cintilografia de glândulas salivares que possibilita a avaliação de sua função, onde podem ser observados atraso na captação, redução na concentração e/ou atraso na secreção do traçador (TREVISANI et al., 2019).

Outro exame bastante útil na avaliação da SSP é a ultrassonografia de glândulas salivares maiores que pode revelar a presença de parênquima heterogêneo, múltiplas áreas hipocóicas ou anecoicas nas glândulas parótidas e submandibulares. Apesar de não fazer parte dos critérios classificatórios, é outra ferramenta para auxílio diagnóstico e exame muito utilizado, na prática clínica, por ser não invasivo e, também é recomendado para excluir casos que necessitem de biópsia salivar (TREVISANI et al., 2019).

A biópsia de glândula salivar menor é o exame mais importante para o diagnóstico e prognóstico dos pacientes com SSP. O aspecto mais característico é a infiltração linfocítica focal. Um foco consiste em um aglomerado de pelo menos 50 linfócitos em  $4\text{mm}^2$  (escore focal  $\geq 1$ ) e deverá ser realizada para todos os pacientes com antiRo/SSA negativo (DANIELS et al., 2011).

Um dos principais eventos imunopatológicos observados nas glândulas salivares menores dos pacientes com SSP é a destruição das células epiteliais pelos linfócitos infiltrados, com subsequente substituição do tecido glandular por células

mononucleares, tecido conjuntivo e tecido adiposo. Os linfócitos T são as principais células existentes, principalmente células T CD4<sup>+</sup>. Foi observado padrão predominante de citocinas Th1 em biópsias de glândulas salivares de pacientes com SSP e expressão diferencial de moléculas de adesão intercelular em tecido glandular desses pacientes, inclusive pelas células epiteliais. Foi documentada, também, participação das células epiteliais das glândulas salivares menores de pacientes com SSP no mecanismo de apresentação de antígeno e quimiotaxia (BARCELLOS et al., 2005).

Em relação aos anticorpos, os anticélulas HEp-2(FAN), anticorpos Anti-Ro/SSA, Anti-La/SSB e FR (fator reumatoide) devem ser solicitados para todos os pacientes com suspeita clínica de SSj. AntiRo/SSA e anti La/SSB são os anticorpos mais frequentes em pacientes com SSP (60-90% e 30-60%, respectivamente). Recentemente, o anti La/SSB isolado sem o antiRo/SSA foi retirado dos critérios classificatórios de 2016, por não se associar ao fenótipo SSP. O antiRo/SSA está associado à parotidite, infiltrado linfocítico mais intenso e alta frequência de manifestações extraglandulares. O FR é detectado em até 100% e o FAN é encontrado em cerca de 80% dos pacientes com SSP, com o padrão mais comum de nuclear pontilhado fino (TREVISANI et al., 2019).

Em relação a outros exames complementares, a hipergamaglobulinemia é frequente (80%) e geralmente policlonal, assim a eletroforese de proteínas (fração Gama), IgG, crioglobulinas e a dosagem de complemento (CH50, C3 e C4) devem ser realizadas na investigação em todos os pacientes. Como seguimento também se utiliza dos exames de hemograma, função renal, sumário de urina e provas de atividade inflamatória como PCR e VHS (TREVISANI et al., 2019).

#### **2.1.4 Critérios Classificatórios**

Os critérios classificatórios de 2002 consistem em 6 itens como apresentados no quadro 1.

Em 2012, os critérios foram modificados pelo ACR (*American College of Rheumatology*), sendo que os pacientes com sinais/sintomas de secura deveriam ter pelo menos 2 dos 3 itens abaixo: 1:(Anti-Ro) e/ou (Anti-La) ou (FR positivo e FAN>1:320), 2.biópsia de glândula salivar com um foco de sialoadenite em 4mm<sup>2</sup> e 3.ceratoconjuntivite seca com OSS score  $\geq 3$  – pontuação de coloração ocular em

indivíduos que não estão usando colírio para glaucoma e que não foram submetidos a cirurgia corneal ou palpebral em pelo menos 5 anos (SHIBOSKI et al., 2012).

**QUADRO 1 - Critérios classificatórios da SSj AECG (*American-European Consensus Group*) 2002** (VITALI et al., 2002)

<p><b>1. Sintomas oculares (pelo menos 1 resposta positiva)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Há secreta ocular por mais de 3 meses de duração?</li> <li>• Sensação recorrente de corpo estranho nos olhos?</li> <li>• Utiliza lágrima artificial mais de 3 vezes ao dia?</li> </ul> <p><b>2. Sintomas orais (pelo menos 1 resposta positiva)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Há queixa diária de secreta oral por mais de 3 meses?</li> <li>• Queixa recorrente ou persistente de tumefação da glândula salivar na idade adulta?</li> <li>• Ingere líquido durante as refeições?</li> </ul> <p><b>3. Sinais oculares: evidência objetiva de acometimento ocular</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Teste de Schirmer positivo (<math>\leq 5</math> mm em 5 minutos)</li> <li>• Prova da rosa-bengala <math>\geq 4</math> pontos na escala de Bijsterveld</li> </ul> <p><b>4. Acometimento da glândula salivar: evidência objetiva do acometimento das glândulas salivares</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fluxo salivar não estimulado menor que 1,5 mL em 15 minutos</li> <li>• Cintilografia salivar alterada com atraso na captação do concentrador</li> <li>• Sialografia de parótidas com a presença de sialectasias</li> </ul> <p><b>5. Dados histopatológicos</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Um ou mais focos na biópsia de glândula salivar menor. (Um infiltrado linfocitário contendo mais de 50 células mononucleares numa área de <math>4 \text{ mm}^2 = \text{focus score} \geq 1</math>)</li> </ul> <p><b>6. Autoanticorpos</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Anti-Ro ou Anti-La</b></li> </ul>
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

**DIAGNÓSTICO:**

- Primária: 4 dos 6 itens, desde que o item 5 ou 6 sejam positivos
- Secundária: resposta positiva para 1 ou 2 + duas respostas positivas entre o 3, 4 e 5. Desconsidera-se o item 6.

Fonte: VITALI et al., 2002.

Em 2016, esses critérios foram revisados pelo ACR/EULAR (*European Alliance of Associations for Rheumatology*), com Critério de Inclusão: sintomas de síndrome seca ocular ou oral ou 1 domínio afetado no índice de atividade de doença (ESSDAI), devendo excluir drogas anticolinérgicas e sendo positivo com Escore  $\geq 4$  para

diagnóstico de SSP (tabela 1). Este critério tem sensibilidade de 96% e especificidade de 95% (SHIBOSKI et al., 2016).

**Tabela 1- Critérios classificatórios para SSP pelo ACR/EULAR 2016.**

<b>Características</b>	<b>Escore</b>
<b>FS <math>\geq 1</math> e biópsia com sialoadenite linfocítica focal</b>	3
<b>SSA /anti Ro positivo</b>	3
<b>OSS <math>\geq 5</math> em pelo menos 1 olho ou van Bijsterveld Escore <math>\geq 4</math></b>	1
<b>Schirmer <math>\leq 5</math>mm/5min</b>	1
<b>Fluxo salivar não estimulado <math>\leq 0,1</math> ml/min</b>	1
<b>Total</b>	<b>9</b>

FS: escore focal; OSS: Ocular Staining Score

Fonte: SHIBOSKI et al., 2016

### 2.1.5 Diagnóstico Diferencial

É de extrema importância a exclusão de outras causas como o uso de fármacos que predisõem à secura como antidepressivos, anti-histamínicos e alguns anti-hipertensivos. Radioterapia de cabeça e pescoço também pode ocasionar sintomas secos. Algumas infecções como o vírus da hepatite C e HIV podem mimetizar a SSP. A doença relacionada à IgG4, a sarcoidose, a tuberculose, a amiloidose e a doença enxerto vs. hospedeiro também são diagnósticos diferenciais da SSP (RISCHMUELLER et al., 2016).

### 2.1.6 Índices de Atividade da Doença

Para melhor avaliação de atividade da SSP, são utilizados alguns instrumentos como ESSDAI (*EULAR Sjögren's Syndrome Disease Activity Index*) (SEROR et al., 2015) e SSDDI (*Sjogren's Syndrome Disease Damage Index*) (VITALI et al., 2007) e para avaliação funcional o ESSPRI (*Eular Sjögren's Syndrome Patient Reported Index*) (PAGANOTTI et al., 2015).

O ESSDAI é um instrumento composto para monitorar atividade de doença com 12 domínios (constitucional, linfadenopatia, articular, glandular, cutâneo, pulmonar, renal, muscular, sistema nervoso central, sistema nervoso periférico, hematológico e biológico) e validado para a língua portuguesa (SERRANO et al., 2013) com diferentes pesos e pontuados individualmente de 0= nenhuma atividade a 3 = alta atividade. O

escore total varia de 0 a 123. Foi determinado que até escore  $< 5$  é considerado baixa atividade, entre 5 e  $\leq 14$  atividade moderada e  $> 14$  atividade alta (SEROR et al., 2015).

O ESSPRI é um questionário autoaplicável de percepção de sintomas pelo paciente. Avalia três domínios: fadiga, dor e secura, em uma escala numérica de 0-10. O escore total representa a média aritmética dos três domínios, sendo aceitável um ESSPRI abaixo de 5 (PAGANOTTI et al., 2015).

O SSDDI é um índice de dano composto de domínios com danos oral, ocular, seqüelas neurológicas, pulmonares e renais, além de presença de doença linfoproliferativa, varia de 0-17 e é obtido pela soma dos domínios (VITALI et al., 2007).

### **2.1.7 Tratamento**

O tratamento da SSP é realizado por uma equipe multiprofissional, incluindo o reumatologista, o oftalmologista e o estomatologista. Os principais objetivos do tratamento são aliviar os sintomas da síndrome seca, prevenir complicações relacionadas à secura, detectar e tratar manifestações sistêmicas e doença linfoproliferativa (RISCHMUELLER et al., 2016).

O início do tratamento para boca seca é com medidas locais, como o uso de saliva artificial ou gomas de mascar que atuam como estimuladores gustatórios ou mecânicos, escovação com pastas com xylitol que ajuda na propriedade antibacteriana e de enxaguatórios com clorexidina e sem álcool. Pacientes que não respondem a essas medidas podem usar agonistas muscarínicos como pilocarpina e cevimeline (RISCHMUELLER et al., 2016).

O tratamento para o olho seco consiste em orientações sobre meio ambiente, uso de óculos com proteção lateral e uso de colírios lubrificantes sem conservantes. Em algumas situações podem ser utilizados ciclosporina e tacrolimus tópicos. Pacientes que não respondem podem requerer tratamento cirúrgico como a oclusão do ponto lacrimal, pelo efeito que lágrimas não drenadas estimulam o lacrimejamento (RISCHMUELLER et al., 2016).

Em relação ao tratamento das manifestações sistêmicas, os pacientes podem ser tratados com imunossuppressores ou imunobiológicos. O tratamento deve ser direcionado para as manifestações clínicas apresentadas pelo paciente. Manifestações articulares podem ser tratadas com hidroxicloroquina, baixas doses de corticoides ou

metotrexato. Acometimento do trato respiratório pode requerer corticoide inalatório ou sistêmico, azatioprina, micofenolato de mofetila, em casos mais graves a ciclofosfamida e o rituximabe em casos refratários. O rituximabe também pode ser indicado em pacientes com risco de malignização para linfoma como parotidite recorrente, presença de púrpura, crioglobulinemia, inflamação articular refratária e envolvimento de SNP. Vasculites cutâneas podem ser tratadas com glicocorticoides isolado ou associado à azatioprina. Envolvimento renal com nefrite tubulointersticial requer reposição de potássio e bicarbonato com glicocorticoides e com glomerulonefrite com glicocorticoide associado à ciclofosfamida. O tratamento do SNP e SNC requer uso de glicocorticoides associado à ciclofosfamida e como manutenção azatioprina, micofenolato de mofetila ou metotrexato (RAMOS CASALS et al., 2012).

### **2.1.8 Novos Biomarcadores**

Alguns anticorpos como alfas fodrina IgG e IgA foram encontrados em pacientes com SSP com lesões em glândulas salivares. Novos esforços têm sido feitos para identificar biomarcadores viáveis que possam ser utilizados no diagnóstico precoce/estratificação, como os anticorpos da proteína salivar 1 (SP-1), proteína secretora da parótida (PSP) e anidrase carbônica 6 (CA6). Esses marcadores foram os estudados até o momento, porém com informações insuficientes para recomendações na prática clínica (RISCHMUELLER et al., 2016; CAFARO et al., 2019).

Karakus e cols. (2018) também investigaram esses novos anticorpos SP-1, CA6 e PSP para tentar diferenciar olho seco em pacientes com SSP de olho seco sem SSP. Os autores encontraram que o anti-CA6 foi o mais prevalente dos anticorpos em pacientes com olho seco com SSP e estava associado à idade mais jovem e à doença mais grave. Novos estudos estão tentando ser delineados com biomarcadores nas lágrimas e na saliva na SSP (KARAKUS et al., 2018).

O anti CarP-IgG (anticorpo relacionado a proteínas carbamiladas) foi encontrado em 27% dos pacientes noruegueses com SSP. A presença desse anticorpo teve uma alta correlação com intensa infiltração linfocítica focal, diminuição do fluxo salivar e formação de centro germinativos ectópicos, podendo estar relacionado à atividade de doença (RISCHMUELLER et al., 2016).

Versura e cols. (2018) encontraram altas concentrações de proteínas, chamadas LACTO e LIPOC-1, nas lágrimas dos pacientes com SSj com alta acurácia comparados

aos testes tradicionais de avaliação ocular, podendo ser candidatas a biomarcadores (VERSURA et al., 2018).

Jazzar e cols. (2018) descreveram diferenças significativas nos níveis de saliva de S100A8/A9 nos subgrupos de pacientes que tinham maior risco de desenvolvimento de linfoma (JAZZAR et al., 2018).

Kimura-Hayama e cols. (2018) encontraram um aumento de quimiocinas inflamatórias como CXCL13 e CXCL10 na saliva e mostraram correlação com ESSDAI, níveis de C4 e diminuição de fluxo salivar não estimulado (KIMURA-HAYAMA et al., 2018).

Portanto, esses foram alguns dos últimos estudos sobre autoanticorpos, citocinas e candidatos a biomarcadores na lágrima e na saliva, porém ainda sem base científica para recomendação na prática clínica. Dessa forma, novos estudos são necessários e o desenvolvimento dessa pesquisa possibilitou encontrar elementos que tornem as Gals um possível biomarcador na SSP.

## **2.2 Galectinas**

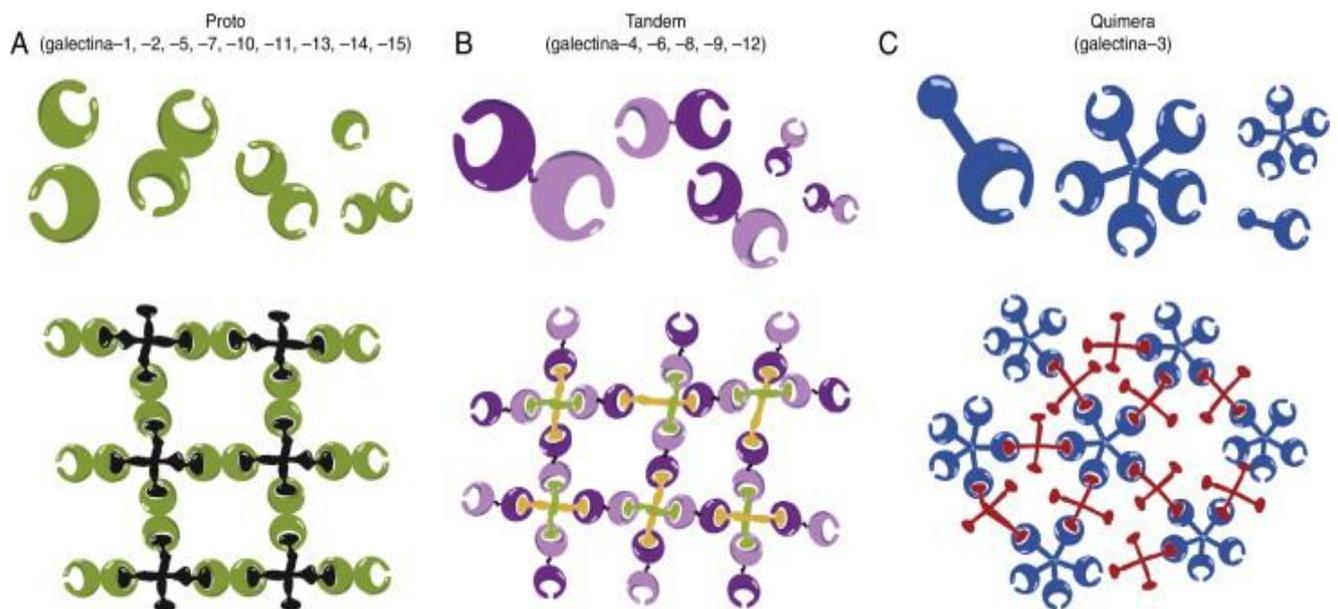
### **2.2.1 Definição**

As Gals são uma família de lectinas de ligação a  $\beta$ -galactosídeo (figura 1), composta por dois grupamentos terminais: o carboxila e o amino. São glicomoléculas que apresentam domínios de reconhecimento de carboidratos (CRD), constituído por 130 aminoácidos, e estão envolvidas em diversas funções como controle do ciclo celular, resposta imune, adesão celular, apoptose e metástase (KIM, 2013).

Foram descritos 15 tipos diferentes nesta família, os quais foram denominados de acordo com a ordem de descoberta, sendo classificadas em três subtipos. O primeiro reconhecido como protótipo representado pelas (Gal-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13), com apenas um CRD por subunidade que podem formar dímeros. O segundo subtipo com dois CRDs diferentes em paralelo conectados por peptídeo (Gal-4, -6, -8, -9, -12). O terceiro grupo é composto pela Gal-3, sendo chamado quimérico. A Gal-3 estruturalmente consiste de três domínios: a) um domínio terminal  $\text{NH}_2$  de 12 aminoácidos, representa um local de fosforilação sérica que é importante para a regulação da sinalização celular; b) uma seqüência repetida rica em glicina, prolina e tirosina; e c) um CRD (IKEMORI, 2014).

As Gals são expressas em células inflamatórias e não inflamatórias como os monócitos, macrófagos, células dendríticas, mastócitos, células T e B. As funções que as Gals desempenham dependem da ligação que estabelecem com receptores específicos. Sabe-se que foram encontradas em órgãos linfoides primários e secundários, sendo relevante seu estudo na SSj devido ao seu risco de malignização e sua relação com Linfoma não-Hodgkin. É descrito que as Gals podem estar envolvidas no crescimento celular, na indução de apoptose e na metástase devido ao seu envolvimento na angiogênese, na interação com a matriz extracelular e na disseminação hematogênica (DHIRAPONG et al., 2009).

**Figura 1- Figura representativa das famílias das galectinas**



Adaptado de Yang RY, Rabinovich GA, Liu FT. Galectins: structure, function and therapeutic potential. Expert Rev Mol Med. 2008; 13:e39

### 2.2.2 Galectina 1

A Gal-1 é um importante contribuinte na regulação da função imunológica e manutenção da homeostase das células T. É expressa em células estromais tímicas e células T ativadas. Na célula estromal tímica, a Gal-1 promove apoptose de potenciais células T autorreativas durante o desenvolvimento. Na periferia, a Gal-1 promove a apoptose de células T ativadas, o que elimina a possibilidade de resposta imunológica

exagerada ou inapropriada que pode resultar na destruição desnecessária do próprio tecido. Assim, a função apoptótica da Gal-1 com células T ativadas ajuda a manter a tolerância imunológica. Na periferia, a apoptose de células T e de outras células do sistema imunológico são importantes na regulação negativa à resposta imune. Foi demonstrado que a Gal-1 pode induzir apoptose especificamente através da ligação e sinalização de receptor de células T (RCT). Após a interação de Gal-1/RCT, a apoptose é induzida através da reorganização da superfície das células T, induzindo a transdução de sinal. Assim, a Gal-1 é necessária para a ligação física e multimerização de RCT para induzir sinais de apoptose. É conhecida também por induzir a produção de IL-10, e contribuir para a proliferação de células T reguladoras (Tregs). Também foi sugerido que a Gal-1 promove a infra-regulação de citocinas pró-inflamatórias (DHIRAPONG et al.,2009). Desafios para o futuro serão a utilização de Gal-1 para o tratamento de doenças inflamatórias e autoimunes e o uso de inibidores de Gals para terapia de câncer (SALATINO et al.,2008; HORNUNG et al., 2017).

No estudo de Martinez Allo e cols. (2020), demonstrou-se que camundongos idosos mutantes nulos de Gal-1 (*Lgals1*<sup>-/-</sup>) desenvolveram um processo inflamatório espontâneo nas glândulas salivares que se assemelha à SSj. A falta de Gal-1 resultou em células dendríticas (CDs) com maior potencial imunogênico, menor frequência de Tregs e aumento do número de células T CD8<sup>+</sup> com maior capacidade efetora. Corroborando com sua atividade tolerogênica, a expressão de Gal-1 diminuiu com a idade em camundongos diabéticos não obesos propensos à autoimunidade. O tratamento com Gal-1 recombinante restaurou mecanismos tolerogênicos e reduziu a inflamação da glândula salivar. Dessa forma, a Gal-1 endógena serve como um reostato na homeostase que induz a tolerância imunológica e evita o desenvolvimento dependente da idade da autoimunidade espontânea (MARTINEZ ALLO et al., 2020).

### 2.2.3 Galectina 3

A Gal-3, um membro único do tipo quimérico da família das Gals, é constitutivamente expressa por muitos tipos de células, incluindo células T e células T de memória CD4<sup>+</sup>. A Gal-3 é conhecida por ser expressa numa variedade de tecidos e células, incluindo monócitos, macrófagos, células dendríticas, mastócitos, eosinófilos e linfócitos T e B. A Gal-3 é capaz de atuar tanto intracelular como extracelularmente,

afetando processos como adesão celular, sinalização, proliferação, diferenciação e apoptose. Tem uma variedade de efeitos sobre processos biológicos e patológicos, incluindo inflamação, autoimunidade, fibrose e invasão tumoral (KOCA, et al., 2014).

A Gal-3 pode promover a migração celular, adesão, ativação e regulação da transdução de sinal do RCT. Esta galectina não é apenas crucial para mediação de respostas imunes de células T, mas também promove a ativação de células *natural killer* (NK) e de CDs, além de prevenir a polarização e a apoptose de macrófagos. Um estudo mostrou que Gal-3 aumenta a inflamação e a produção de citocinas pró-inflamatórias (ZHANG et al., 2014). A Gal-3 induz *in vitro* a apoptose de células T ativadas, de timócitos e de mastócitos e é essencial para fagocitose efetiva pelos macrófagos (DHIRAPONG et al., 2009).

Portanto, as Gals podem participar de processos imunes e inflamatórios, funcionando como resposta à autoantígenos. Uma alta frequência de autoanticorpos contra Gal-3 foi encontrada em pacientes com LES e poli/dermatomiosite em comparação com indivíduos saudáveis (SALATINO et al., 2008; RABINOVICH et al., 2007). Além disso, a expressão aumentada de Gal-3 em tecidos inflamados tem sido notada em algumas doenças inflamatórias. Por exemplo, a Gal-3 foi detectada em lágrimas de pacientes com doenças oculares inflamatórias, expressa nas regiões de córnea e epitélio conjuntival, mas não em glândulas lacrimais, e também em líquidos sinoviais de pacientes com AR, sendo associada à atividade de doença (RABINOVICH et al., 2007; OHSHIMA et al., 2003).

Sabe-se também que Gal-3 é essencial em diversos papéis na inflamação do SNC, combinação de funções pró-inflamatórias com capacidade de remodelagem em tecidos danificados do SNC (SHIN, 2013; OCHIENG, 2004) e contribui para a migração de neuroblastos durante o desenvolvimento cerebral e a diferenciação de oligodendrócitos. Dessa forma, pode-se determinar se há níveis séricos aumentados de Gal-3 em pacientes com SSP e envolvimento do SNC (PASQUINI et al., 2011).

Portanto, a Gal-3 parece estar envolvida em eventos celulares e teciduais nas doenças inflamatórias imunomediadas. Na SSP, o infiltrado inflamatório leva à atrofia acinar, que está correlacionada com ectopia de folículos (tecidos linfoides terciários) compostos por linfócitos, plasmócitos e fibrose estromal. Nos folículos, autoantígenos são apresentados às células T e B e existem centros germinativos onde podem ser gerados autoanticorpos. Zhang e cols. (2014) demonstraram que níveis séricos de Gal-3 estão significativamente aumentados em pacientes com SSP e

correlacionados com os níveis séricos de proteína C reativa (PCR), fibrinogênio, IgG e IL-17(ZHANG et al., 2014). As funções imunológicas das Gal-1 e -3 estão demonstradas na figura 2 abaixo.

**Figura 2 – Efeitos imunológicos das Gal- 1 e -3.**

	T cell activation	T cell apoptosis	Cytokine production	Cell adhesion and migration	Regulatory T cells
 Galectin-1	-	+ Extracellularly	- IL-2 (T cells) TNF $\alpha$ (T cells) IFN $\gamma$ (T cells) + IL-5 (T cells) IL-10 (T cells) TGF $\beta$ (T cells)	- Adhesion and transendothelial migration of T cells	+ Regulatory T cells
 Galectin-3	-	+ Extracellularly - Intracellularly	- IL-5 (Eosinophils and T cells) IL-12 (DCs) + IL-1 (Monocytes) IL-2 (T cells) IL-8 (Neutrophils)	+ Adhesion to ECM Chemoattraction of macrophages	? Regulatory T cells

Fonte : Rabinovich et al. Tuning the Inflammatory Response with Galectins. 2007

### 2.3 Síndrome de Sjögren e Galectinas

Até o momento, há poucos estudos que relacionem Gals em pacientes com SSj. Vale ressaltar que baseados nas funções das Gals na resposta imunológica, enquanto a Gal-1 exerce um papel na regulação de citocinas e genes anti-inflamatórios, a Gal-3 possui uma função na indução de citocinas e quimiocinas inflamatórias (RABINOVICH et al., 2007).

Zhang e cols. (2014) estudaram níveis séricos de Gal-3 em pacientes com SSP e encontraram níveis significativamente mais altos do que em controles saudáveis, e associação com doença pulmonar intersticial (ZHANG et al., 2014).

Martínez Allo e cols. (2020) estudaram a Gal-1 em biópsias labiais de pacientes com SSj e mostraram pouca expressão de Gal-1 nas biópsias comparados aos controles (MARTÍNEZ ALLO et al., 2020).

Entretanto, o papel das Gal-1 e -3 na fisiopatologia da SSj e seu potencial uso como biomarcador ainda não foram devidamente explorados (ZHANG et al., 2014; XU et al., 2021). Desse modo, acreditamos ser necessário estudar essas Gals na SSP para compreender melhor seu perfil e sua associação com manifestações clínicas da doença, podendo, assim a galectina ter a indicação de um possível biomarcador.

### 3. JUSTIFICATIVA

Uma família de proteínas de ligação a  $\beta$ -galactosídeos, chamadas Gals, surge como moléculas com funções imunorreguladoras. Estas proteínas são expressas em células inflamatórias e não inflamatórias, dando um amplo espectro de envolvimento na resposta imune (DHIRAPONG et al., 2009). Os mecanismos celulares das Gals ainda são pouco estudados na SSP e nesta doença ainda faltam biomarcadores que determinem um perfil dos pacientes com diferentes fenótipos. A SSP é uma doença que afeta mulheres economicamente ativas e com um perfil de sintomas que geram impacto na qualidade de vida, sendo necessários novos estudos nessa área.

Portanto, determinar a participação das Gals séricas e na saliva de pacientes com doenças autoimunes, em especial a SSP, pode contribuir para o delineamento de novas estratégias para diagnóstico e para auxiliar no tratamento dessa doença.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Gerais

- Avaliar o perfil das Gal- 1 e -3 no soro e na saliva de pacientes com SSP e de indivíduos do grupo controle e analisar sua possível associação com manifestações clínicas e laboratoriais da doença.

### 4.2 Específicos

- Determinar os níveis de Gal- 1 e -3 séricas e salivares nos pacientes com SSP;
- Correlacionar os níveis de Gal- 1 e -3 com os índices de atividade;
- Associar os níveis de Gal-1 e - 3 com as manifestações clínicas;
- Avaliar a expressão das Gal-1 e -3 nos tecidos das glândulas salivares menores.

## **5. METODOLOGIA**

### **5.1 Desenho da pesquisa**

Trata-se de um estudo de corte transversal analítico.

### **5.2 Local da pesquisa**

Ambulatório especializado em SSj do Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE) e Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT).

### **5.3 Amostra da pesquisa**

Os pacientes foram incluídos no estudo por amostra por conveniência no período de julho de 2019 a dezembro de 2020. Para comparação, foi utilizado um grupo autodeclarado saudável, pareados por sexo e idade (1:1), também recrutados no ambulatório. A amostra foi por conveniência devido à baixa prevalência dessa patologia. Após aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, a amostra final foi de 43 pacientes, e para definir se esse n amostral era suficiente para a análise comparativa entre os grupos doentes e controles, sendo calculado o poder de representação dessa amostra que foi de 99%.

### **5.4 Critérios de inclusão e exclusão do grupo SSP**

Critérios de inclusão

- Idade acima de 18 anos.
- Diagnóstico de SSP estabelecido pelos critérios do ACR/EULAR 2016 (SHIBOSKI et al., 2016).

### Critérios de exclusão

- Diagnóstico conhecido de síndrome da imunodeficiência adquirida, sarcoidose, amiloidose, doença do enxerto x hospedeiro, hepatite C, doença relacionada à IgG4 e neoplasias.
- Gestação.
- Uso de agentes anticolinérgicos nos últimos três meses.
- História de irradiação prévia da cabeça e do pescoço.
- Pacientes em vigência de processos infecciosos.
- SSj associada a outras doenças do tecido conjuntivo.

### **5.5 Critérios de inclusão e exclusão do grupo controle**

Os voluntários saudáveis foram selecionados por amostra por conveniência também no mesmo período do estudo, recrutados no mesmo ambulatório (acompanhantes dos pacientes e profissionais do serviço de saúde), com idade acima de 18 anos, sem conhecimento prévio de patologias tais como doenças autoimunes ou neoplasias, bem como o uso de fármacos nos últimos três meses os quais pudessem ocasionar síndrome seca. Excluímos também voluntários que estivessem gestantes e em processo de tratamento para infecções. O total de voluntários saudáveis foi de 43 participantes.

### **5.6 Recrutamento dos participantes**

Foram incluídos os pacientes portadores de SSP atendidos de forma consecutiva no ambulatório de SSj do Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE) através de amostragem por conveniência.

### **5.7 Instrumentos de coleta de dados**

Utilizou-se uma ficha clínica (APÊNDICE B) composta de dados epidemiológicos, manifestações clínicas da doença, critérios classificatórios de 2002, 2012 e 2016, índices de atividade de doença: ESSDAI (ANEXO A), ESSPRI(ANEXO

B) e de dano SSDDI(ANEXO C), além de comorbidades e medicamentos em uso. Os dados complementares foram coletados a partir dos prontuários disponibilizados pelo Serviço de Arquivo Médico e Estatística (SAME).

### **5.8 Definições das variáveis clínicas estudadas**

A presença das variáveis clínicas foi definida segundo as descrições estabelecidas no ESSDAI (SEROR et al., 2015)

- 1) Constitucional: presença de febre  $\geq 37,5^{\circ}$  C, suor frio noturno ou perda de peso involuntária a partir de 5% do peso;
- 2) Linfadenopatia: linfadenomegalia  $\geq 1$  cm em qualquer região ou  $\geq 2$  cm na região inguinal ou esplenomegalia palpável ou por exame de imagem ou doença proliferativa maligna recente de células B;
- 3) Glandular: parótida aumentada mesmo que discreta ( $\leq 3$ cm) ou qualquer aumento submandibular ou lacrimal;
- 4) Articular: artralgia nas mãos, punhos, tornozelos e pés acompanhados por rigidez matinal ( $>30$  min) ou presença de sinovite entre as 28 articulações do DAS 28- ombros, cotovelos, punhos, metacarpofalangeanas, interfalangeanas proximais e joelhos (VAN RIEL, RENSKERS, 2016);
- 5) Cutâneo: presença de eritema multiforme, vasculite cutânea limitada ou difusa, incluindo vasculite urticariforme ou púrpura ou lúpus cutâneo subagudo ou úlceras relacionadas à vasculite;
- 6) Respiratório: presença de tosse persistente ou dispneia ou envolvimento brônquico com evidência de doença pulmonar intersticial à radiografia simples ou tomografia computadorizada de tórax ou prova de função pulmonar alterada;
- 7) Renal: evidência de envolvimento da atividade renal, com acidose tubular com insuficiência renal (TFG $<60$ ml/min) ou sem insuficiência renal, envolvimento glomerular com proteinúria acima de 0,5g/d ou presença de hematúria ou evidência

histológica de glomerulonefrite ou infiltração intersticial linfóide importante ou presença de crioglobulinemia relacionada ao envolvimento renal;

8) Muscular: presença de fraqueza muscular evidenciada por exame físico ou miosite diagnosticada pela eletroneuromiografia ou biópsia ou alteração dos níveis de CPK;

9) Sistema Nervoso Periférico: evidência de envolvimento ativo do SNP: polineuropatia periférica axonal motora ou sensorial diagnosticada por eletroneuromiografia ou neuralgia do Trigêmio (V nervo craniano) ou envolvimento de outro nervo craniano de origem periférica ou neuropatia sensorial pura com a presença de vasculite crioglobulinêmica ou ganglionopatia ou polineuropatia inflamatória desmielinizante crônica (CIDP) ou mononeurite múltipla;

10) Sistema Nervoso Central: envolvimento de nervo craniano de origem central ou neurite óptica ou síndrome semelhante à esclerose múltipla ou deficiência cognitiva comprovada; vasculite cerebral com acidente vascular cerebral ou ataque isquêmico transitório ou convulsões ou mielite transversa ou meningite linfocítica;

11) Hematológico: citopenia de origem autoimune com: neutropenia < 1500/mm<sup>3</sup> ou anemia Hb < 10 g/dl ou trombocitopenia < 150.000/mm<sup>3</sup> ou linfopenia < 1000/mm<sup>3</sup>;

12) Biológico: pico clonal ou hipocomplementemia de C4 ou C3 ou CH50 ou hipergamaglobulinemia com nível de IgG acima de 16g/L ou presença de crioglobulinemia ou início recente de hipogamaglobulinemia ou diminuição recente de nível de IgG (<5g/L).

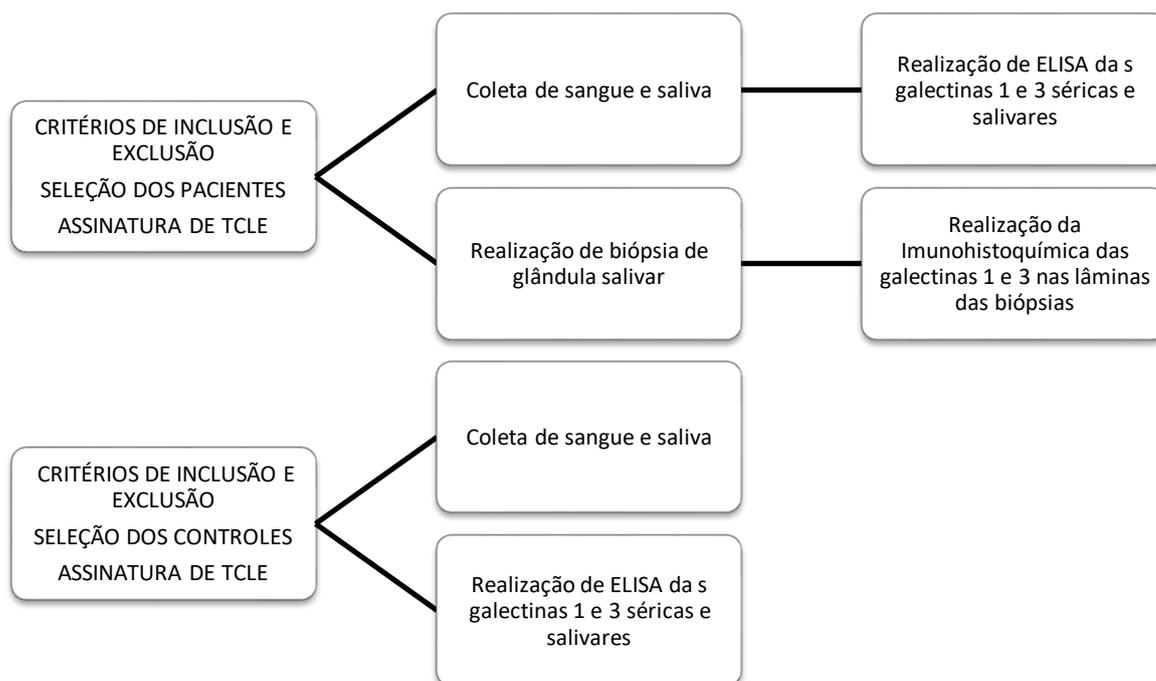
## **5.9 Procedimento para coleta de amostras**

Foram coletadas amostras de sangue e de saliva não estimulada em doentes e em controles para avaliação dos níveis séricos e salivares das Gal-1 e -3, para sua posterior correlação com as manifestações clínicas e sintomas extraglandulares. Além disso, foi avaliada a expressão dessas Gals nas biópsias de glândulas salivares menores no grupo dos doentes (fluxograma 1).

Foi realizada a coleta de 30 ml de sangue periférico em tubo seco e com heparina e após centrifugação (3000 RPM), o soro foi armazenado em tubos *ependorf* em *freezer* com temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$  no LINAT para posterior realização dos testes.

A coleta da saliva foi realizada nos pacientes e nos controles, que tiveram que se abster de comer e beber por 1 hora antes da coleta da amostra, através do método da drenagem ou escoamento passivo da saliva não estimulada (ZHANG et al., 2016). As amostras foram colocadas no gelo, depois transportado para o laboratório em gelo seco e armazenado a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Coletou-se a saliva pedindo que o paciente ficasse em silêncio por 5 minutos sem engolir saliva intencionalmente. A coleta do maior volume possível é feita em tubo *falcon* de 15 mL. Ao tubo foi adicionado coquetel inibidor de protease (Sigma Aldrich, MO, EUA) na razão de 1:100, como recomendado pelo fabricante. O tubo é centrifugado a 2000 RPM por 3 minutos à temperatura ambiente, para formação do sedimento. Logo após, o sobrenadante foi coletado e dividido em alíquotas de  $500\mu\text{L}$  e armazenado em *freezer* à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### Fluxograma 1- Metodologia da pesquisa



Fonte: Fluxograma elaborado pela autora, Aysa Pinheiro 2021.

## 5.10 Análise das amostras de sangue e de saliva pelo ELISA

A análise das Gals séricas e salivares 1 e 3 foram quantificadas por ELISA sanduíche (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), seguindo as informações recomendadas pelos fornecedores (R&D Systems).

Pelo protocolo do ELISA sanduíche (fluxograma 2) para a Gal-1 algumas etapas foram seguidas: separação do material (placa de 96 poços, PBS 1X (solução tampão), *Wash buffer* (utilizado para lavagem), solução substrato e solução inibidora e preparação dos reagentes. Após a realização dessas etapas, foi feita a preparação do anticorpo de captura com sua diluição (reconstituiu-se 120 $\mu$ g de anti-humano Gal-1 em 500 $\mu$ l de PBS 1X com concentração de 240 $\mu$ g/ml). Foram colocados 42 $\mu$ l em cada tubo *ependorf* de 0,5 ml e estocado a  $-80^{\circ}$  C, sendo utilizado o anticorpo de captura a uma concentração de 800ng/ml. Para cada placa de ELISA de 96 poços, foram inseridos cinco ml de PBS 1X + 40 $\mu$ l do anticorpo de captura, sendo colocados 50 $\mu$ L em cada poço de placa. Posteriormente, procedeu-se à incubação e realizado lavagem por três vezes da placa com *Wash buffer*. Procedeu-se então à saturação da placa com BSA/PBS, sendo colocados 150  $\mu$  L de BSA/ PBS1X em cada poço da placa, sendo deixada 1 hora em temperatura ambiente. Foi realizada novamente a lavagem da placa com *Wash buffer* por três vezes e procedeu-se a preparação do *standard* reconstituído em 300 $\mu$ L de PBS 1X BSA 1%. Após a diluição do *standard*, foi colocado 4 $\mu$ L em 12 *ependorfs* de 0,5 ml e estocado a  $-80^{\circ}$ C.

No tubo inicial, tem-se uma concentração de 260ng/ml ( $260 \cdot 10^{-9}$ g/ml) do antígeno Gal-1. O primeiro ponto do *standard* deve estar a uma concentração de 20ng/ml ( $20 \cdot 10^{-9}$ g/ml). No primeiro tubo, foi colocado 23,07 $\mu$ L de antígeno a 260ng/ml em 300 $\mu$ l de BSA1% PBS 1X, em seguida adicionou-se 150 $\mu$ L de BSA 1% PBS 1X nos tubos 2 a 8, onde foi feita uma diluição seriada homogeneizando antes de adicionar 150 $\mu$ L de cada tubo.

Na placa ELISA, foi colocado 50 $\mu$ L em cada ponto do *standard* no poço correspondente, posteriormente foi mantida em incubação por 2 horas em capela de biossegurança biológica à temperatura ambiente. Procedeu-se novamente à lavagem por três vezes da placa com *wash buffer*, foi feita a diluição do anticorpo de detecção, utilizando-se o anticorpo de captura a uma concentração de 100 ng/ml. Para cada placa

de 96 poços, colocou-se 5 ml do BSA 1% PBS1 X + 83,3µl do anticorpo de captura. Posteriormente, foi preparada a HRP-streptavidina, com sua diluição de 1/40 em BSA 1% PBS 1X. Adicionou-se 5 ml do BSA/PBS + 125µL da streptavidina, colocou-se então 50 µl em cada poço da placa, que foi deixada por 20 min no escuro à temperatura ambiente. Lavou-se novamente três vezes a placa, posteriormente procedeu-se à preparação do substrato – tetrametilbenzeno (TMB). Para uma placa, foram colocados 2,5 ml do reativo A e 2,5 ml do reativo B (R&D DY999), colocou-se então 50µL do substrato em cada poço de cultura sendo deixado por 20 minutos no escuro à temperatura ambiente, sendo em seguida a reação interrompida com 25 µL da solução STOP (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>2N). Posteriormente, foi feita a leitura da placa em um leitor de ELISA a 450 -570 nm. O teste foi feito em duplicata que serviu de controle para os erros de manuseio. O limite mínimo de detecção para Gal-1 (pg/ml) foi de 0,0039 e o máximo foi de 70.000.

Pelo protocolo do ELISA sanduíche para a Gal- 3 também foram as mesmas etapas seguidas com a diferença em algumas concentrações segundo o fabricante: na diluição do anticorpo de captura – reconstituído com 360µg/ml de anti -humano Gal-3 em 1 ml de PBS 1X, sendo colocado 31,25 µl em cada tubo *ependorf* de 0,5 ml, utilizando o anticorpo de captura a uma concentração de 2,0 µg/ml. Para cada placa ELISA de 96 poços, foram colocados cinco ml de PBS 1X + 27,77 µl do anticorpo de captura. Na preparação do *standard* reconstituído em 500µL de PBS 1X BSA 1%, após a diluição do *standard*, foi feito alíquotas em *ependorfs* com 15,6µL.

No tubo inicial, preparou-se uma concentração de 300ng/ml ( $300 \cdot 10^{-9}$  g/ml) do antígeno Gal-3. O primeiro ponto do *standard* esteve em uma concentração de 4000pg/ml ( $4000 \cdot 10^{-12}$  g/ml). No primeiro tubo, colocou-se 4µL de antígeno a 300ng/ml em 300µl de BSA1% PBS 1X. Na etapa de diluição do anticorpo de detecção, utilizou-se o anticorpo de captura a uma concentração de 25ng/ml. Para cada placa de 96 poços, foram colocados cinco ml do BSA 1% PBS1 X + 27,77 µl do anticorpo de detecção. Na etapa de preparo de RHP-streptavidina, com sua diluição de 1/200 em BSA 1% PBS1X, sendo então colocado 5 ml do BSA 1 % -PBS1X+ 25µL da streptavidina. Posteriormente, também foi feita a leitura da placa em um leitor de ELISA a 450 – 570 nm. Utilizamos a leitura de 450 nm. O limite mínimo de detecção para Gal-3 (pg/ml) foi de 31,25 e o máximo foi de 4000 para o primeiro experimento e para o segundo experimento o limite mínimo foi de 0,69 e o máximo 58829,50.

## Fluxograma 2 - Etapas do ELISA



Fonte: Fluxograma elaborado pela autora, Aysa Pinheiro 2021.

### 5.11 Análise de Imunohistoquímicas das biópsias salivares

A imunomarcção das Gal- 1 e -3 foram avaliadas através de imunohistoquímica (fluxograma 3) nas biópsias realizadas para diagnóstico dos pacientes com SSP. Para esta análise, as lâminas foram provenientes de dois momentos diferentes: foram

utilizadas lâminas estocadas de biópsias realizadas previamente e durante o estudo para confirmação diagnóstica.

A princípio foram separadas as lâminas que tiveram expressão positiva (identificação de cor acastanhada no parênquima ou região de estroma das glândulas salivares) ou negativa das Gals (não visualização da marcação em cor acastanhada na região glandular), sendo posteriormente quantificados por um patologista experiente os casos com marcação focal (<50%) e difusa ( $\geq 50\%$ ).

Os pacientes (durante este estudo) também realizaram a biópsia de glândula salivar menor com profissionais habilitados a realizarem os exames para finalidade de diagnóstico. A análise da imunohistoquímica foi feita nas amostras desses exames, que se encontram no Serviço de Patologia do HC-UFPE, já realizados para o diagnóstico da SSP e nos novos pacientes que tiveram indicação de biópsia com finalidade diagnóstica.

A biópsia de glândulas salivares menores é um exame invasivo e foi realizada pela equipe de estomatologia no Departamento de Odontologia da UFPE, que já executa estes procedimentos de rotina para fins diagnósticos para o HC-UFPE. O exame foi realizado após técnica de anestesia local com uma pequena incisão de 0,5 a 1 cm com retirada de 4 a 6 glândulas salivares menores, seguida de sutura simples.

Para os pacientes com biópsia para diagnóstico estabelecido previamente, colocamos um ponto de corte de um ano para analisarmos as lâminas de tecido de glândulas salivares menores, uma vez que por questão ética importante evitamos rebiopsiar estes pacientes por ser a biópsia um método invasivo. Segundo FISHER e cols. (2016) nesse período de um ano, podemos analisar com qualidade aceitável o material da biópsia salivar sem mudanças significativas. Logo, com base nessa premissa, as biópsias realizadas no período maior que um ano foram excluídas do estudo, possibilitando deste modo uma análise segura das biópsias utilizadas.

No protocolo da imunohistoquímica, cada bloco de biópsia foi cortado com espessura de três micrômetros, estas foram desparafinizadas em xileno e reidratadas em concentrações decrescentes de etanol (100, 95, 75 e 50 %). Em seguida, foi realizada a recuperação antigênica em tampão de incubação: *Target Retrieval Solution, High pH 9* 1:50 (kit Dako), incubada em banho Maria a 96 ° por 20 minutos, depois feito enxágue com *Wash buffer* por 5 minutos. Após o resfriamento, as lâminas foram incubadas com bloqueador de peroxidase endógena, colocado *DUAL ENDOGENOUS ENZYME BLOCK* (kit Dako *Envision duo flex*) em cada lâmina e incubadas por 10 minutos, depois foi feito lavagem com PBS por duas vezes. Foi realizado o bloqueio com

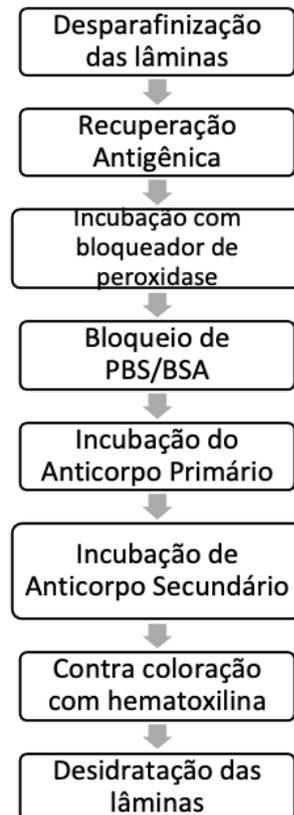
PBS/BSA 5% por 60 min em temperatura ambiente. Procedeu-se à incubação com anticorpo primário (Gal- 1 SC 166618 1:100 e da Gal-3 SC 23938 1:100 ambos com concentração 200µg/ml e da Empresa Santa Cruz) por 60 min à temperatura ambiente, depois feito lavagem com PBS. Para o anticorpo secundário (DAKO K4061), foi realizada a incubação Dako *EnVision* + HRP por 60 min à temperatura ambiente e aplicou-se 50 µl por lâmina seguindo a recomendação do fabricante. Posteriormente, foi feita a lavagem com PBS. Seguindo as etapas, colocou-se 1 gota de 3-3'-diaminobenzidina (DAB) em 1 ml de tampão, incubação por 10 min em temperatura ambiente. Foi realizada a contra coloração com hematoxilina por 10 a 15 minutos. Após, foi feita a desidratação das lâminas com etanol e xileno, montagem das lâminas com uma gota de *entlan* e secou-se à temperatura ambiente. Os controles da imunohistoquímica foram os tecidos do rim para Gal- 1 e tecidos do cólon para Gal- 3, tecidos que têm alta expressão dessas Gals.

A leitura das lâminas foi realizada por dois examinadores experientes ambos do HC/UFPE. Um dos examinadores pertence ao Serviço de Patologia e foi o responsável pela revisão das lâminas com ênfase na marcação e definição das fotografias a serem realizadas. Algumas fotografias foram realizadas utilizando Microscópio *Zeiss* com o sistema de captura de imagem ZEN 2011 (*blue edition*) e outras fotos foram feitas através do scanner de lâminas *Pannoramic MIDI* e com o auxílio do programa *Pannoramic Viewer*.

O grupo controle fez apenas coleta de sangue e saliva para fins de comparação.

Para a realização deste estudo, a Sociedade Brasileira de Reumatologia através dos fundos de apoio à pesquisa financiou o estudo com o valor de R\$ 10.304,49 (ANEXO E).

### Fluxograma 3 - Etapas da Imunohistoquímica



Fonte: Fluxograma elaborado pela autora, Aysa Pinheiro 2021

## 5.12 Aspectos Éticos

Este projeto foi submetido à avaliação e aprovado pelo Comitê de Ética (ANEXO D) em Pesquisas em Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da UFPE, de acordo com a resolução nº 466/2012, N ° 3.420.239.

Todos os indivíduos participantes do estudo assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A) conforme exigência da referida resolução. Nenhuma coleta foi realizada sem a autorização prévia dos voluntários.

Os pesquisadores declaram que os dados coletados das fichas clínicas para esta pesquisa ficarão armazenados em armários, sob a responsabilidade da pesquisadora Aysa César Pinheiro, no endereço Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE, 50670-901, sala 136 do Ambulatório de Reumatologia pelo período mínimo de cinco anos, as coletas do soro e da saliva foram armazenadas em *freezer* no LINAT e as lâminas no serviço de Patologia do HC-UFPE.

### 5.13 Análise e interpretação dos dados

Os dados foram analisados descritivamente por meio de frequências absolutas e percentuais para as variáveis categóricas e das medidas: média, desvio padrão (média  $\pm$  DP), mediana e os percentis 25 e 75 (mediana (P25; P75)) para as variáveis numéricas. Para a comparação entre os dois grupos foi utilizado teste t-Student pareado ou Wilcoxon pareado. O grau da relação entre duas variáveis numéricas foi avaliado pelo coeficiente de correlação de Pearson ou de Spearman com o uso do teste t-Student específico para a hipótese de correlação nula. A comparação entre as duas categorias em relação às Gals foi realizada através do teste t-Student com variâncias iguais para amostras independentes ou teste Mann-Whitney.

A escolha dos testes t-Student pareado, t-Student para amostras independentes e coeficiente de correlação de Pearson ocorreram nas situações em que os dados apresentaram distribuição normal e os testes Wilcoxon pareado, Mann-Whitney e correlação de Spearman foi devido à ausência de normalidade ou tamanho da amostra inferior a 6 casos. A verificação da normalidade foi realizada pelo teste de Shapiro-Wilk e a igualdade de variâncias pelo teste F de Levene.

A margem de erro utilizada na decisão dos testes estatísticos foi de 5%. Os dados foram digitados na planilha EXCEL e o programa utilizado para obtenção dos cálculos estatísticos foi o IMB SPSS na versão 25.

A partir dos dados da amostra e considerando: a comparação entre os dois grupos (doentes e controles) em relação aos valores das Gals- 1 e -3 no soro e na saliva; a margem de erro de 5% e foi calculado o poder de 99% de representação da amostra. Os cálculos foram realizados no programa G\*Power 3.1 pelo teste não paramétrico bilateral Wilcoxon pareado (*Wilcoxon signed test (matchedpairs)*), com distribuição min ARE.

A variabilidade expressa pelos valores dos desvios padrão, em relação aos valores das médias correspondentes, foi reduzida nas variáveis relativas às idades, desde que os valores dos desvios padrão foram inferiores a 1/3 das médias correspondentes, já em relação às variáveis Gals oscilaram de razoavelmente elevadas a bastante elevadas considerando que os valores dos desvios oscilaram entre mais da metade das médias a valores superiores às médias correspondentes. Dessa forma, representamos em médias as idades e em medianas as Gals, uma vez que a variabilidade das Gals foi alta com grandes desvios padrões.

## 6. RESULTADOS

A amostra desse estudo foi composta por 43 pacientes após avaliação de 87 pacientes com SSj cadastrados no Serviço de Reumatologia do HC-UFPE. Quarenta e três preencheram os critérios de inclusão para o estudo, sendo 44 excluídos, pois 18 apresentavam associações com outras doenças autoimunes, 2 gestantes, 6 na vigência de infecção viral ou bacteriana e 18 haviam feito uso de medicações anticolinérgicas nos últimos 3 meses.

As características da amostra dos pacientes, assim como os testes objetivos para avaliação da secra ocular e oral utilizados para o diagnóstico estão descritos na tabela 2.

As frequências dos autoanticorpos estão descritas na tabela 2, ressaltamos que nos pacientes com FAN positivo, o padrão mais freqüente foi o nuclear pontilhado fino em 26/36 (72,2%). Também estão descritos a média da IgG sérica. No que se refere aos outros parâmetros laboratoriais, a prevalência de consumo de C3 foi de 5/43 (11,6%) e de consumo de C4 em 6/43 (13,9%). A presença de linfopenia foi observada em 8/43 (18,6%) dos pacientes, de anemia em 6/43 (13%) e o aumento de VSH em 21/43 (48,8%). A média de pontos no critério classificatório de 2016 foi de 5,8 com DP de 1,68.

Em relação à biópsia de glândulas salivares, 34/43 (79%) realizaram este exame, sendo que 32/34 (94,1%) apresentaram um resultado positivo com escore focal  $\geq 1$  (média do escore focal foi de 1,12 com DP de 0,59) com padrão de sialoadenite linfocítica focal e, 2/34 (5,8%) apresentaram sialoadenite crônica inespecífica. Não realizaram a biópsia 9/43 (29,9%) por apresentar outros critérios classificatórios da doença. A maioria das pacientes 29/32 (90,6%) apresentaram escore focal  $\geq 1$  e  $< 2$ , com uma paciente que apresentou escore focal de 2,8 e duas pacientes com escore focal de 3,0. As características das biópsias estão na tabela 3.

Em relação ao ESSDAI, a sua média foi de 2,58 (índice baixo), sendo as categorias baixas ( $< 5$ ), moderadas ( $\geq 5$  e  $\leq 14$ ) e altas ( $\geq 15$ ) com os referidos percentuais de avaliação: 83,7%, 14,0% e 2,3% respectivamente. A média do índice de dano SSDDI foi de 2,02 e do ESSPRI foi de 6,1 (tabela 4). As porcentagens dos domínios envolvidos no ESSDAI estão demonstradas na tabela 4.

**Tabela 2- Caracterização da amostra de pacientes com SSP do HC-UFPE e controles (N=43)**

	<b>Pacientes</b>	<b>Controles</b>
<b>Idade (anos)</b>		
Média ± DP (variação)	<b>45,2±10,7 (20-61)</b>	<b>45,42±11,4(22-64)</b>
Mediana (P25; P75)	<b>48 (37;52)</b>	<b>47(35;56)</b>
<b>Sexo</b>	<b>N (%)</b>	<b>N(%)</b>
Feminino	<b>43 (100)</b>	<b>43 (100)</b>
<b>Duração de doença(meses)</b>		
Média ± DP (variação)	<b>43±31,3(12-124)</b>	
<b>Exames para diagnóstico Positivos</b>	<b>N (%)</b>	
Teste de Schirmer (N=43)	30 (69,7)	
Média Schirmer (mm) ± DP	4.6± 3,01	
Fluxo salivar não estimulado (N= 43)	36 (83,7)	
Fluxo salivar não estimulado (média ml/min) ± DP	0.07±0.12	
Biópsia de Glândula salivar menor (N =34)	32 (94,1)	
<b>Autoanticorpos Positivos</b>	<b>N (%)</b>	
FAN (N=41)	36 (87,8)	
Anti Ro/SSA (N=42)	32 (76,2)	
Anti La /SSB (N=40)	20 (50)	
Fator reumatoide (N= 43)	15 (34,8)	
<b>Exames (média±DP)</b>		
Hb(g/dl)	12,83 (±1,09)	
Linfócitos (n/mm <sup>3</sup> )	1728 (±804)	
IgG (mg/dL)	1875 (±1709)	
<b>Comorbidades (N=43)</b>	<b>N (%)</b>	
Sobrepeso (IMC ≥25 e ≤29,9)	17 (39,5)	
Menopausa	14 (32,5)	
Fibromialgia	13 (30,2)	
Ansiedade	13 (30,2)	
Hipovitaminose D	11 (25,5)	
Hipertensão	10 (23,2)	
Diabetes	10 (23,2)	
<b>Medicações (N=43)</b>	<b>N (%)</b>	
Colírios Substitutos de lágrimas	29 (67,4)	
Vitamina D	26 (60,4)	
Hidroxicloroquina	23 (53,5)	
Antidepressivos	19 (44,2)	
Metotrexato	11 (25,6)	
Corticoide (≤ 20 mg de prednisona)	10 (23,2)	
Pilocarpina	07 (16,3)	
Azatioprina	07 (16,3)	
Rituximabe	04 (9,30)	
Ciclofosfamida	01 (2,30)	
Leflunomida	01 (2,30)	

IMC=índice de massa corpórea, FAN=fator antinuclear,Hb=hemoglobina.

**Tabela 3- Características patológicas das 34 biópsias de Glândulas salivares menores dos pacientes com SSP**

<b>Características</b>	<b>Presença N (%)</b>
Centros germinativos	2 (5,9)
Dilatação ductal leve	7 (20,5)
Dilatação ductal moderada	2 (5,9)
Atrofia Acinar leve	5 (14,7)
Atrofia Acinar Acentuada	2 (5,9)
Fibrose leve	8 (23,5)
Fibrose acentuada	2 (5,9)
Lipossustituição leve	10 (29,4)
Lipossustituição moderada	1 (2,9)
Lipossustituição acentuada	2 (5,9)

**Tabela 4- Médias do ESSDAI, ESSPRI e SSDDI e frequência dos domínios do ESSDAI em pacientes com SSP, 2019-2020, HC –UFPE (N=43).**

<b>ESSDAI (Média ± DP)</b>	<b>2,58 ±3,3</b>
<b>ESSPRI (Média ± DP)</b>	<b>6,1 ± 2,4</b>
<b>SSDDI (Média ± DP)</b>	<b>2,02 ± 0,05</b>
<b>Domínios do ESSDAI</b>	<b>N (%)</b>
<b>Articular</b>	<b>21 (48,8)</b>
<b>Biológico</b>	<b>18 (41,8)</b>
<b>Hematológico</b>	<b>14 (32,5)</b>
<b>Glandular</b>	<b>13 (30,2)</b>
<b>Constitucional</b>	<b>12 (27,9)</b>
<b>SNC</b>	<b>5 (11,6)</b>
<b>Respiratório</b>	<b>4 (9,3)</b>
<b>SNP</b>	<b>4 (9,3)</b>
<b>Linfadenopatia</b>	<b>3 (6,9)</b>
<b>Cutâneo</b>	<b>3 (6,9)</b>
<b>Renal</b>	<b>1 (2,3)</b>
<b>Muscular</b>	<b>1 (2,3)</b>

ESSDAI= EULAR Sjögren's syndrome disease activity index;

ESSPRI=Eular Sjögren's Syndrome Patient Reported Index,

SSDDI= Sjogren's Syndrome Disease Damage Index;

SNC= Sistema Nervoso Central;

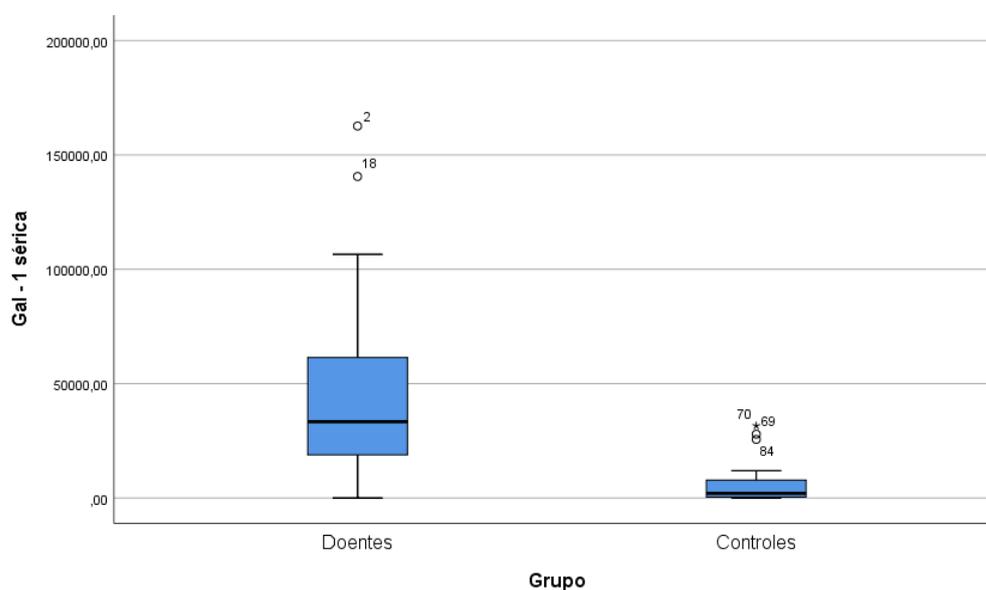
SNP= Sistema Nervoso Periférico.

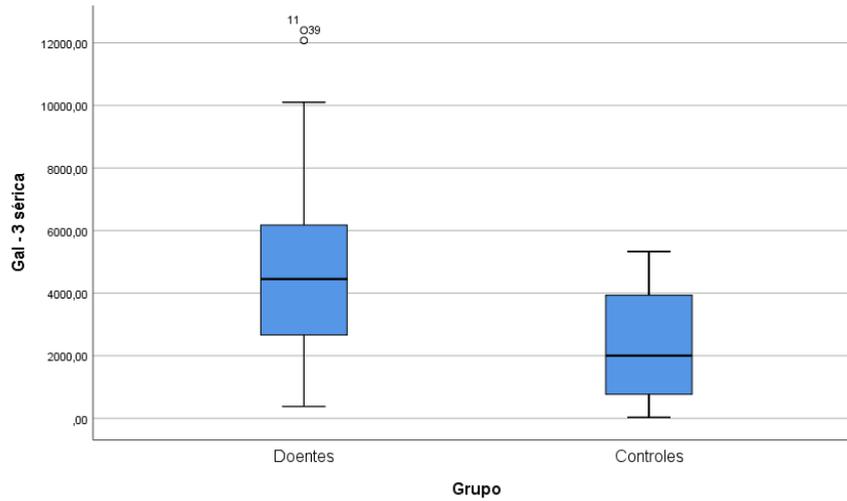
## 6.1 Comparação entre os grupos SSP e controles

Foram analisados os resultados das médias das idades nos dois grupos, sendo os mesmos semelhantes e equiparáveis. Para o grupo controle, a média foi de 45,42 anos com DP  $\pm$  11,14 e mediana de 47 anos e para o grupo SSP as médias foram 45,28 anos com DP de 10,75 e mediana de 48 anos. Em relação ao sexo, todos os indivíduos eram do sexo feminino em ambos os grupos.

A mediana (P25; P75) da Gal-1 sérica realizada nos 43 pacientes do grupo SSP foi maior que no grupo controle, com valores de 33338,30 (17450,00; 61655,00) versus 2002,86 (312,50; 8145,71) ( $p < 0,001$ ). O mesmo comportamento foi observado em relação à Gal-3 sérica realizada nos 43 pacientes com mediana de 4452,50 (2627,50; 6327,50) versus 2004,00 (750,67; 3991,00) ( $p < 0,001$ ). Quanto ao valor mediano da Gal-1 salivar, realizada em 33 pacientes no grupo SSP em relação aos 16 do grupo controle, foi maior com 7015,30 (1378,67; 16028,70) e 0,00 (0,00; 0,00) ( $p=0,038$ ), respectivamente. Assim, todas as medianas foram mais elevadas no grupo SSP do que nos controles, diferenças estas que se mostraram significativas a 5% ( $p < 0,05$ ), com exceção da Gal-3 na saliva. Esta foi realizada em 27 pacientes do grupo SSP e 34 no controle cujos valores foram de 4631,00 (0,69; 58867,50) versus 10597,00 (0,69; 50319,50) ( $p=0,511$ ). Houve menor número de pacientes com dosagem de Gals na saliva porque alguns pacientes não tinham saliva para análise pela gravidade da doença. Esses resultados estão demonstrados nos gráficos boxplot 1 e 2.

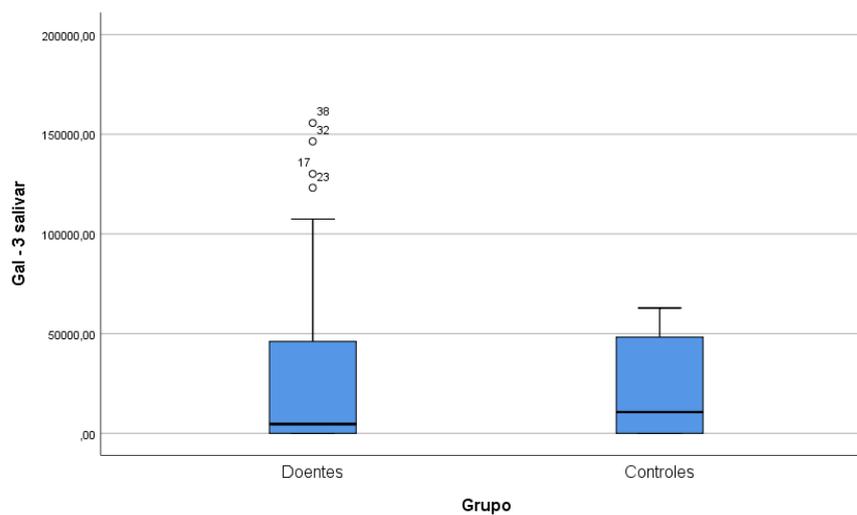
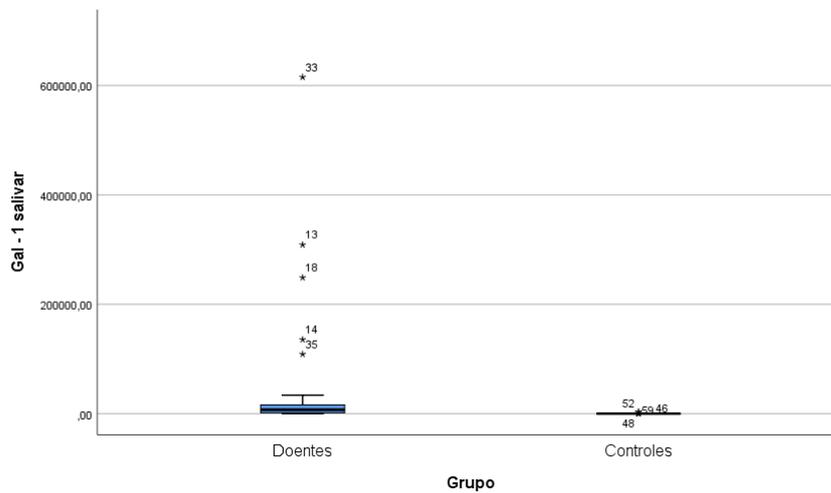
**Gráfico 1 - Níveis séricos de Gals -1 e -3 nos grupos SSP e controles**





\* pontos fora da escala: valores discrepantes ou outliers

**Gráfico 2- Níveis salivares de Gals-1 e -3 nos grupos SSP e em controles**



\* pontos fora da escala: valores discrepantes ou outliers

## 6.2 Resultados do grupo SSP

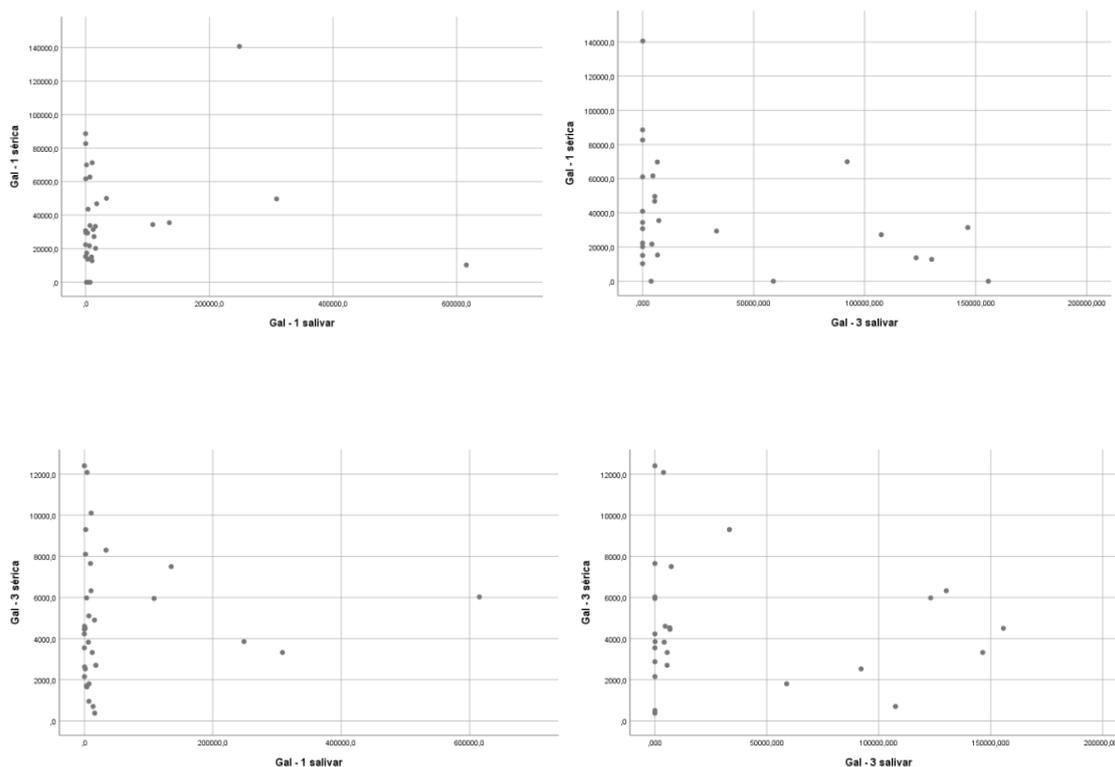
A Tabela 5 apresenta a correlação entre os níveis das Gals- 1 e -3 no soro e na saliva. Não foi observado nenhuma associação estatisticamente significativa, sendo sua dispersão demonstrada no gráfico 3.

**Tabela 5 – Correlação entre as Gal-1 e -3 no soro e na saliva no grupo SSP**

Gals no soro	Gals na saliva	
	Gal-1 r (p)	Gal-3 r (p)
Gal-1	0,070 (0,697)	- 0,316 (0,108)
Gal-3	0,018 (0,922)	0,066 (0,744)

r= Correlação de Spearman

**Gráfico 3 – Dispersão entre os níveis das Gals no grupo SSP**



A Tabela 6 apresenta as correlações entre os níveis das Gal- 1 e - 3 no soro e na saliva e as médias dos índices ESSDAI, ESSPRI e SSDDI. Observou-se correlação inversa e estatisticamente significativa com a média do ESSPRI e o nível de Gal-1 salivar, dispersão também demonstrada no gráfico 4.

**Tabela 6 – Correlação entre as Gal-1 e -3 no soro e na saliva com as médias ESSDAI, SSDDI e ESSPRI no grupo SSP**

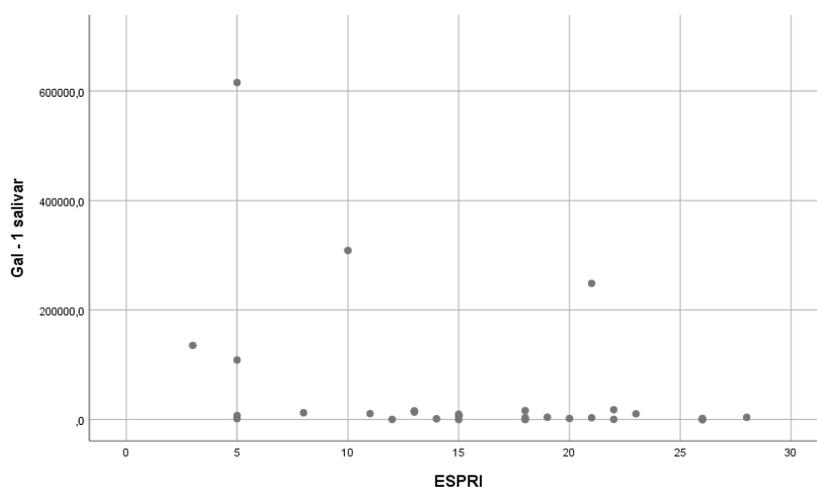
Variável	Galectina no soro		Galectina na saliva	
	Gal -1 r (p)	Gal -3 r (p)	Gal -1 r (p)	Gal -3 r (p)
<b>ESSDAI</b>	-0,113 (0,482)	0,019 (0,905)	0,050 (0,785)	-0,048 (0,815)
<b>SSDDI</b>	-0,222 (0,194)	0,175 (0,308)	0,010 (0,956)	0,224 (0,283)
<b>ESSPRI</b>	0,145 (0,378)	-0,155 (0,346)	<b>-0,434 (0,013)*</b>	-0,229 (0,250)

r= Correlação de Spearman, \*estatisticamente diferente de zero

ESSDAI (EULAR Sjögren's syndrome disease activity index);

SSDDI(Sjogren's Syndrome Disease Damage Index);ESSPRI (Eular Sjögren's Syndrome Patient Reported Índice).

**Gráfico 4- Dispersão dos níveis de Gal- 1 salivar com ESSPRI no grupo SSP**



A Tabela 7 mostra associação significativa entre Gal- 3 salivar e o número de linfócitos, sendo esta correlação positiva e direta. O valor da correlação é razoável/moderada (0,64).

**Tabela 7 – Correlação entre as Gal-1 e -3 no soro e na saliva com os níveis dos linfócitos e IgG séricas no grupo SSP**

Variável	Gals soro		Gals saliva	
	Gal -1 r (p)	Gal -3 r (p)	Gal -1 r (p)	Gal -3 r (p)
<b>Linfócitos</b>	-0,136 (0,416)	0,098 (0,559)	-0,115 (0,546)	<b>0,64 (0,025*)</b>
<b>IgG (g/L)</b>	0,237 (0,152)	-0,235 (0,155)	-0,036 (0,851)	0,204 (0,339)

r = Correlação de Spearman \* estatisticamente significante

Foram avaliados os níveis das Gals no soro e na saliva e se havia associação entre os domínios do ESSDAI. Os domínios renal, cutâneo, muscular e linfadenopatia não puderam ser avaliados através de associações pelo número da amostra ter sido inferior a quatro casos. Verificou-se que não houve associação entre os domínios com os níveis de Gals no soro conforme tabela 8.

**Tabela 8- Associação entre os níveis séricos das Gal-1 e -3 com os domínios do ESSDAI no grupo SSP**

Domínios	Gal-1 Mediana (P25;P75) Valor de p	Gal- 3 Mediana (P25; P75) Valor de p
SNP <b>Sim</b> <b>Não</b>	15585,85 (3430,43; 69793,75) 33805,00 (21755,00; 61655,00) $p^{(1)} = 0,299$	5240,00 (4015,00; 7215,00) 4227,50 (2527,50; 6327,50) $p^{(1)} = 0,428$
SNC <b>Sim</b> <b>Não</b>	27221,70 (19602,50; 65715,00) 33571,65 (16913,30; 61517,53) $p^{(1)} = 0,956$	4527,50 (2265,00; 6115,00) 4340,00 (2602,50; 6621,25) $p^{(1)} = 0,866$
Pulmonar <b>Sim</b> <b>Não</b>	24455,00 (12717,53; 34242,48) 33338,30 (20221,70; 62705,00) $p^{(1)} = 0,261$	5677,50 (2065,00; 7227,50) 4227,50 (2627,50; 6327,50) $p^{(1)} = 0,669$
Glandular <b>Sim</b> <b>Não</b>	29605,00 (16388,30; 38238,35) 37113,30 (19528,78; 69271,68) $p^{(1)} = 0,175$	4452,50 (1727,50; 7802,50) 4365,00 (3171,25; 6102,50) $p^{(2)} = 0,988$
Articular <b>Sim</b> <b>Não</b>	33338,30 (17444,15; 61388,35) 32563,30 (20092,50; 69820,00) $p^{(1)} = 0,952$	4502,50 (2790,00; 6740,00) 3915,00 (2108,75; 6658,75) $p^{(2)} = 0,970$
Biológico <b>Sim</b> <b>Não</b>	31088,30 (23454,98; 63685,00) 34388,30 (17444,15; 56355,00) $p^{(1)} = 0,893$	3702,50 (2421,25; 4933,75) 4902,50 (2927,50; 7865,00) $p^{(2)} = 0,109$
Hematológico <b>Sim</b> <b>Não</b>	35638,30 (14759,18; 68986,68) 33338,30 (18835,85; 55563,35) $p^{(1)} = 0,673$	4565,00 (3033,75; 6065,00) 4227,50 (2577,50; 7565,00) $p^{(2)} = 0,732$
Constitucional <b>Sim</b> <b>Não</b>	29488,35 (14067,53; 43713,35) 35505,00 (20221,70; 69775,00) $p^{(1)} = 0,221$	5677,50 (2746,25; 8890,00) 4002,50 (2152,50; 6027,50) $p^{(2)} = 0,153$

SNP: sistema nervoso periférico, SNC: sistema nervoso central

(1) Teste Mann-Whitney; (2) Teste t-Student com variâncias iguais

Na Tabela 9, verificou-se diferença significativa entre a presença ou ausência da manifestação glandular. Em relação à Gal-3 salivar, destaca-se que a mediana foi correspondentemente mais elevada entre os que tinham presença do que ausência da manifestação glandular. Nas análises dos percentis 75 das Gals salivares nos domínios SNC, SNP e pulmonar, incluímos o valor de zero porque não foi possível seu cálculo devido à baixa frequência de casos (apenas quatro a cinco casos nos grupos).

**Tabela 9- Associação entre os níveis salivares das Gal-1 e -3 com os domínios do ESSDAI no grupo SSP**

Domínios	Gal-1 Mediana (P25;P75) Valor de p	Gal-3 Mediana (P25; P75) Valor de p
<b>SNP</b>		
Sim	3528,67 (1295,33; **)	56167,5(91,00; **)
Não	7038,65 (1215,33; 15938,70) $p^{(1)}=0,970$	4396,00 (0,69; 26794,63) $p^{(1)}=0,137$
<b>SNC</b>		
Sim	6248,67 (222,00; **)	5636,50 (4278,50; 82261,13)
Não	7038,65 (1420,33; 16637,03) $p^{(1)}=0,784$	3851,00 (0,69; 58829,50) $p^{(1)}=0,476$
<b>Pulmonar</b>		
Sim	9608,67 (7062,00; **)	**
Não	5248,69 (1090,32; 15938,70) $p^{(1)}=0,343$	5461,00 (0,69; 75492,50) $p^{(1)}=0,160$
<b>Glandular</b>		
Sim	3052,00 (356,48; 9423,68)	6721,00 (0,69; 33292,50)
Não	9608,67 (1462,00; 17922,00) $p^{(1)}=0,232$	4396,00 (0,69; 15630,00) <b><math>p^{(1)}=0,015^*</math></b>
<b>Articular</b>		
Sim	4132,02 (1090,32; 15938,70)	5461,00 (45,84; 78230,00)
Não	9608,67 (1462,00; 33775,30) $p^{(1)}=0,480$	2080,84 (0,69; 57180,00) $p^{(1)}=0,450$
<b>Biológico</b>		
Sim	7282,00 (1831,99; 13005,30)	5461,00 (0,69; 57467,50)
Não	5248,69 (1337,00; 29383,65) $p^{(1)}=0,906$	4006,00 (0,69; 26794,63) $p^{(1)}=0,817$
<b>Hematológico</b>		
Sim	3528,67 (182,00; 10435,30)	4631,00 (0,69; 56655,00)
Não	7038,65 (1732,00; 21885,33) $p^{(1)}=0,218$	4811,00 (0,69; 39686,25) $p^{(1)}=0,069$
<b>Constitucional</b>		
Sim	5295,34 (1090,32; 12471,98)	2730,84 (0,69; 49698,75)
Não	7015,30 (1462,00; 16208,70) $p^{(1)}=0,637$	4631,00 (0,69; 58829,50) $p^{(1)}=0,845$

SNP: sistema nervoso periférico, SNC: sistema nervoso central

(1) Teste Mann-Whitney; (\*) Diferença significativa a 5%

\*\*Não foi possível o cálculo devido ao pequeno número de casos.

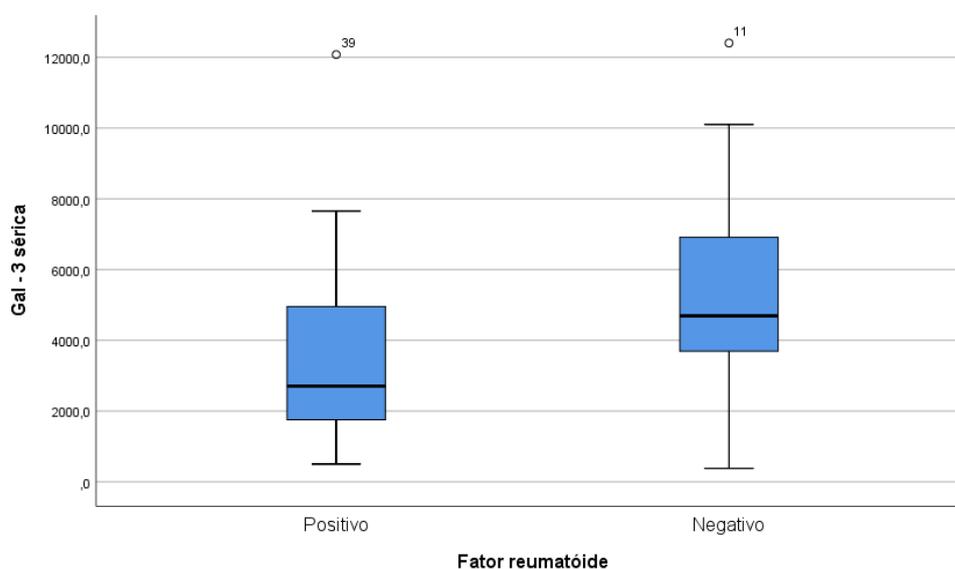
A Tabela 10 expõe os dados de associação entre os níveis de Gals-1 e -3 no soro e a positividade dos autoanticorpos (anti Ro, anti La e FR), sendo observado que os pacientes com FR negativo apresentavam níveis de mediana mais elevados de Gal-3 no soro com significância estatística, resultado este demonstrados no gráfico boxplot 5.

**Tabela 10- Associação entre os níveis séricos das Gal-1 e -3 com os autoanticorpos no grupo SSP**

Autoanticorpos	Gal-1 Mediana (P25;P75) Valor de p	Gal- 3 Mediana (P25; P75) Valor de p
<b>Anti Ro</b>		
<b>Positivo</b>	31438,30 (16388,30; 62180,00)	4452,50 (2665,00; 6177,50)
<b>Negativo</b>	33805,00 (25855,00; 52730,00) $p^{(1)} = 0,952$	4902,50 (2115,00; 9790,00) $p^{(2)} = 0,334$
<b>Anti La</b>		
<b>Positivo</b>	31438,30 (16271,65; 61388,35)	3827,50 (2665,00; 6215,00)
<b>Negativo</b>	33571,65 (19528,78; 64472,50) $p^{(1)} = 0,807$	4715,00 (2958,75; 6621,25) $p^{(1)} = 0,519$
<b>FR</b>		
<b>Positivo</b>	31438,30 (11921,70; 46821,70)	2702,50 (1702,50; 5402,50)
<b>Negativo</b>	33863,30 (21905,00; 68007,50) $p^{(1)} = 0,271$	4690,00 (3621,25; 7208,75) $p^{(1)} = 0,033 *$

FR = fator reumatoide; (1) Teste Mann-Whitney; (2) Teste t-Student com variâncias iguais; \* diferença estatística

**Gráfico 5 - Níveis de Gal-3 sérica segundo positividade ou não do fator reumatoide no grupo SSP.**



Na Tabela 11 avaliou-se associação entre os níveis de Gal-1 e -3 na saliva e positividade de autoanticorpos (Anti Ro, Anti La e FR). Não foi demonstrada associação estatisticamente significativa entre essas variáveis.

**Tabela 11- Associação entre os níveis salivares das Gal-1 e -3 com os autoanticorpos no grupo SSP**

<b>Autoanticorpos</b>	<b>Gal-1 Mediana (P25;P75) Valor de p</b>	<b>Gal- 3 Mediana (P25; P75) Valor de p</b>
<b>Anti Ro</b>		
<b>Positivo</b>	7015,30 (885,32; 14942,00)	5046,00 (0,69; 58017,50)
<b>Negativo</b>	5655,35 (1893,67; 65462,43) $p^{(1)} = 0,862$	3851,00 (0,69; 49709,25) $p^{(1)} = 0,987$
<b>Anti La</b>		
<b>Positivo</b>	6248,67 (475,30; 13675,30)	4631,00 (0,69; 53167,50)
<b>Negativo</b>	7062,00 (3188,67; 16208,70) $p^{(1)} = 0,720$	3366,50 (0,69; 36267,63) $p^{(1)} = 0,891$
<b>FR</b>		
<b>Positivo</b>	5655,35 (2757,00; 10290,33)	5461,00 (312,5; 49267,50)
<b>Negativo</b>	7015,30 (222,00; 33775,30) $p^{(1)} = 0,854$	4396,00 (0,69; 13798,88) $p^{(1)} = 0,658$

FR = fator reumatoide; (1) Teste Mann-Whitney

A Tabela 12 não mostra diferenças significativas quando realizada associação entre os que apresentavam ou não alteração nos exames Schirmer, fluxo salivar e nos que realizaram ou não a biópsia salivar em relação às medianas das Gals -1 e -3 no soro.

**Tabela 12- Associação entre os níveis séricos das Gal-1 e -3 com os testes de avaliação ocular, oral e biópsia de glândula salivar no grupo SSP**

<b>Testes de Avaliação</b>	<b>Gal-1 Mediana (P25;P75) Valor de p</b>	<b>Gal- 3 Mediana (P25; P75) Valor de p</b>
<b>Schirmer</b>		
<b>Alterado</b>	34096,65 (21821,68; 52784,18)	4177,50 (2465,00; 7540,00)
<b>Normal</b>	26238,30 (14530,00; 69921,70) $p^{(1)} = 0,764$	4452,50 (3177,50; 6002,50) $p^{(2)} = 0,981$
<b>Fluxo salivar</b>		
<b>Alterado</b>	31438,30 (17444,15; 61388,35)	4227,50 (2577,50; 6152,50)
<b>Normal</b>	52805,00 (24913,33; 68771,70) $p^{(1)} = 0,359$	4890,00 (2571,25; 9065,00) $p^{(1)} = 0,623$
<b>Biópsia</b>		
<b>Sim</b>	33571,65 (20605,03; 62442,50)	4115,00 (2646,25; 5971,25)
<b>Não</b>	29371,70 (15338,30; 50005,00) $p^{(1)} = 0,573$	4502,50 (2527,50; 8302,50) $p^{(1)} = 0,635$

(1) Teste Mann-Whitney; (2) Teste t-Student com variâncias iguais

A tabela 13 não mostra diferenças significativas quando realizado associação entre os que apresentavam ou não alteração nos exames Schirmer, fluxo salivar e nos que realizaram ou não a biópsia salivar em relação às medianas das Gals -1 e -3 na saliva. Não houve também diferença estatística entre os níveis de Gals séricos e salivares em relação ao valor do escore focal.

**Tabela 13- Associação entre os níveis salivares das Gal-1 e -3 com os testes de avaliação ocular, oral e biópsia de glândula salivar no grupo SSP**

Testes de Avaliação	Gal-1 Mediana (P25;P75) Valor de p	Gal- 3 Mediana (P25; P75) Valor de p
<b>Schirmer</b>		
<b>Alterado</b>	7062,00 (1822,00; 17922,00)	4631,00 (0,69; 33292,50)
<b>Normal</b>	4888,67 (136,50; 11953,65) p <sup>(1)</sup> = 0,379	5441,00 (0,69; 38805,00) p <sup>(1)</sup> = 0,990
<b>Fluxo salivar</b>		
<b>Alterado</b>	4248,70 (1295,33; 13675,30)	5491,00 (0,69; 52117,50)
<b>Normal</b>	8451,99 (1698,67; 64164,08) p <sup>(1)</sup> = 0,703	0,69 (0,69; 0,00) p <sup>(1)</sup> = 0,160
<b>Biópsia</b>		
<b>Sim</b>	6631,99 (811,98; 14970,35)	3851,00 (0,69; 7301,00)
<b>Não</b>	10655,30 (1378,67; 68221,15) p <sup>(1)</sup> = 0,518	20006,75 (1373,27; 53630,00) p <sup>(1)</sup> = 0,127

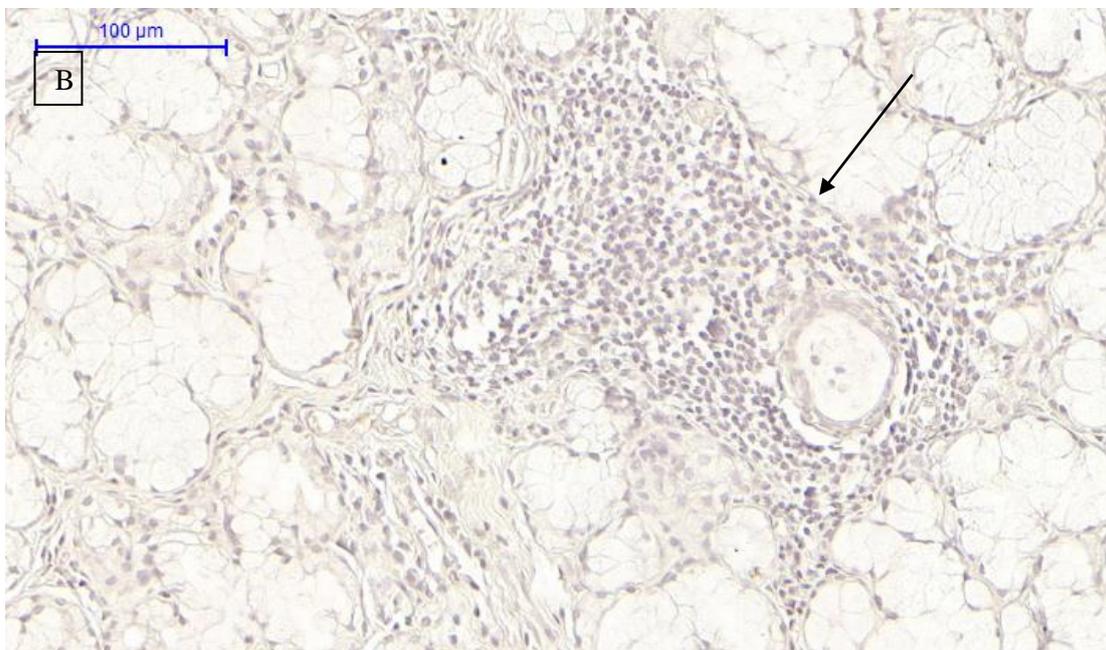
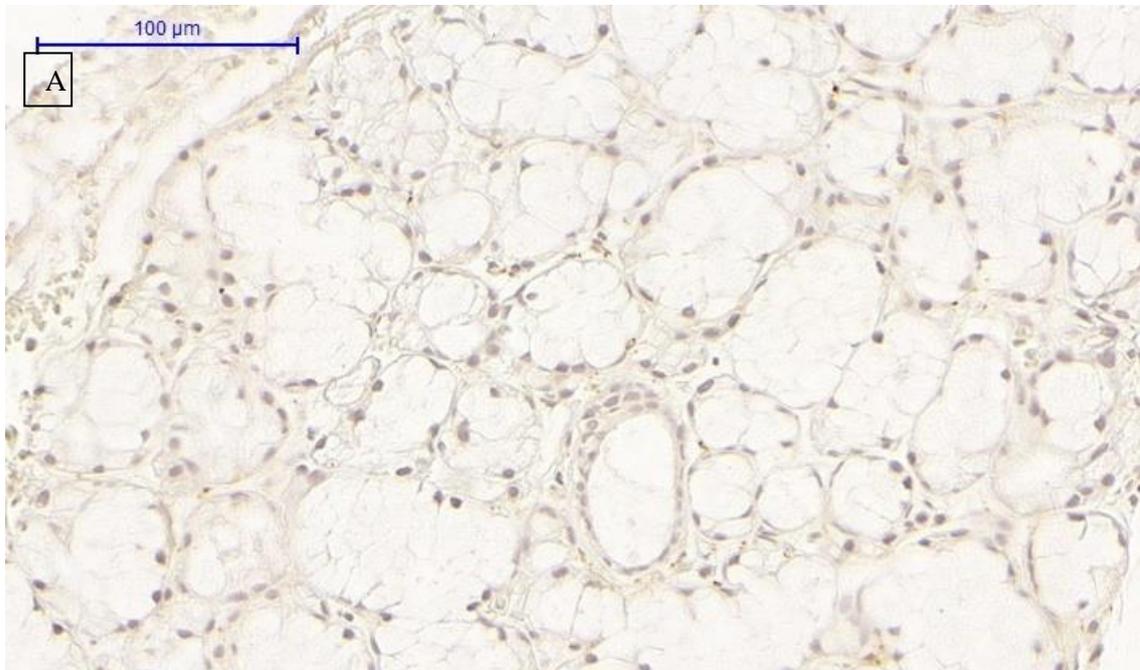
(1) Teste Mann-Whitney

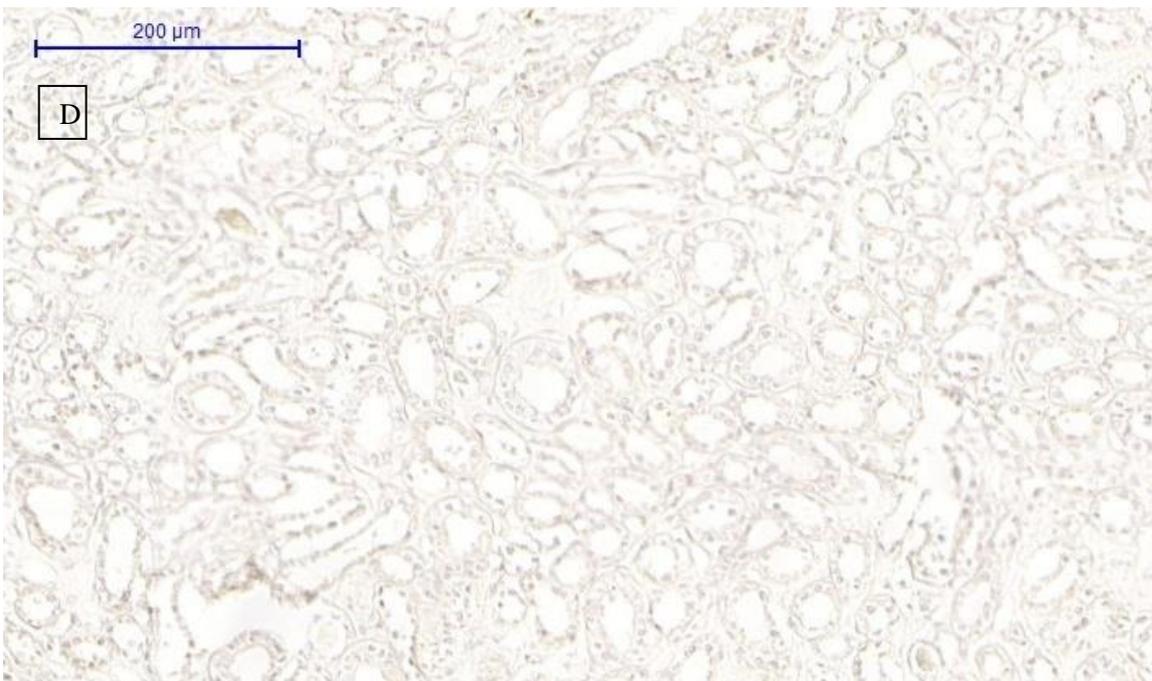
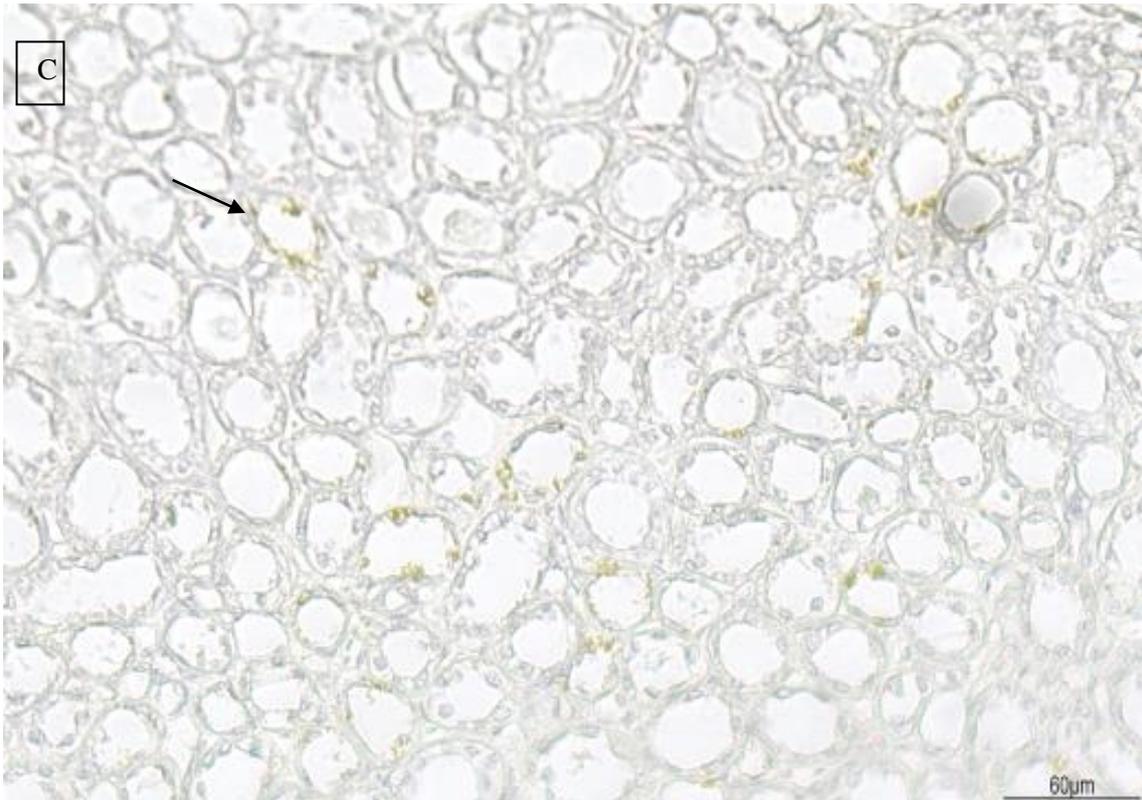
### 6.3 Resultados das análises imunohistoquímicas das biópsias salivares

Em relação aos resultados da expressão das Gal-1 e -3 por imunohistoquímica, foram analisadas 24 biópsias de glândulas salivares menores das 32 consideradas positivas pelo padrão da SSP por dois avaliadores experientes. Excluímos oito biópsias pelo tempo de realização do procedimento ter sido maior que um ano.

No estudo dos 24 casos de expressão de Gal-1, apenas 6/24 (25%) tiveram positividade de infiltrado inflamatório marcado por Gal-1 no estroma glandular de modo focal (<50 % de acometimento da área glandular) e sem marcação na região dos ductos, sendo a maioria 18/24 (75%) com expressão negativa. Observamos abaixo na figura 2, a presença da expressão negativa e positiva de Gal-1 em casos de SSP com o controle positivo e negativo de tecido renal.

**Figura 3 - Casos de pacientes com SSP com expressão negativa (A) e marcação positiva (B) para Gal-1 no estroma glandular, controle positivo (C) e negativo(D) de tecido renal respectivamente. As marcações positivas foram demonstradas com o auxílio das setas.**

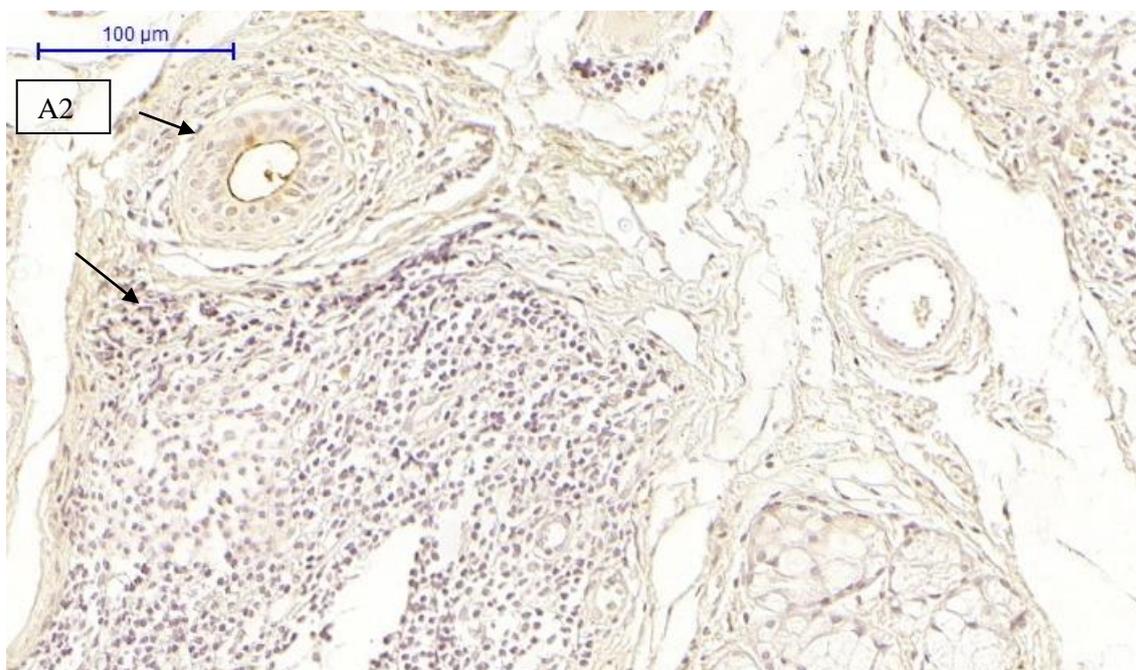
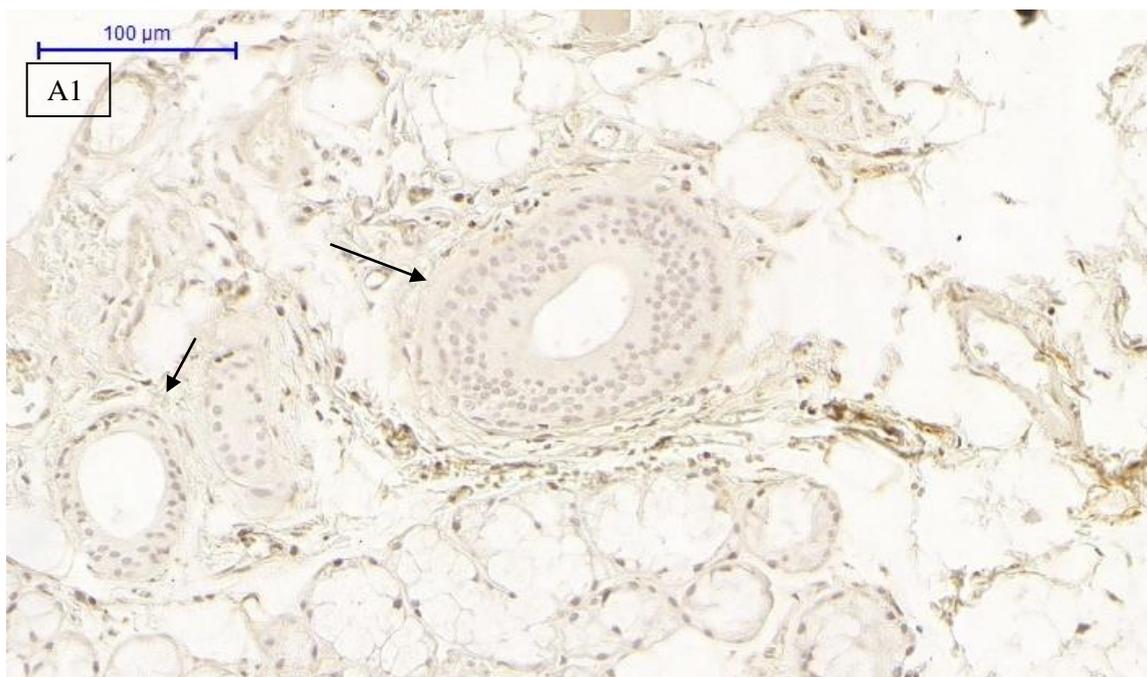


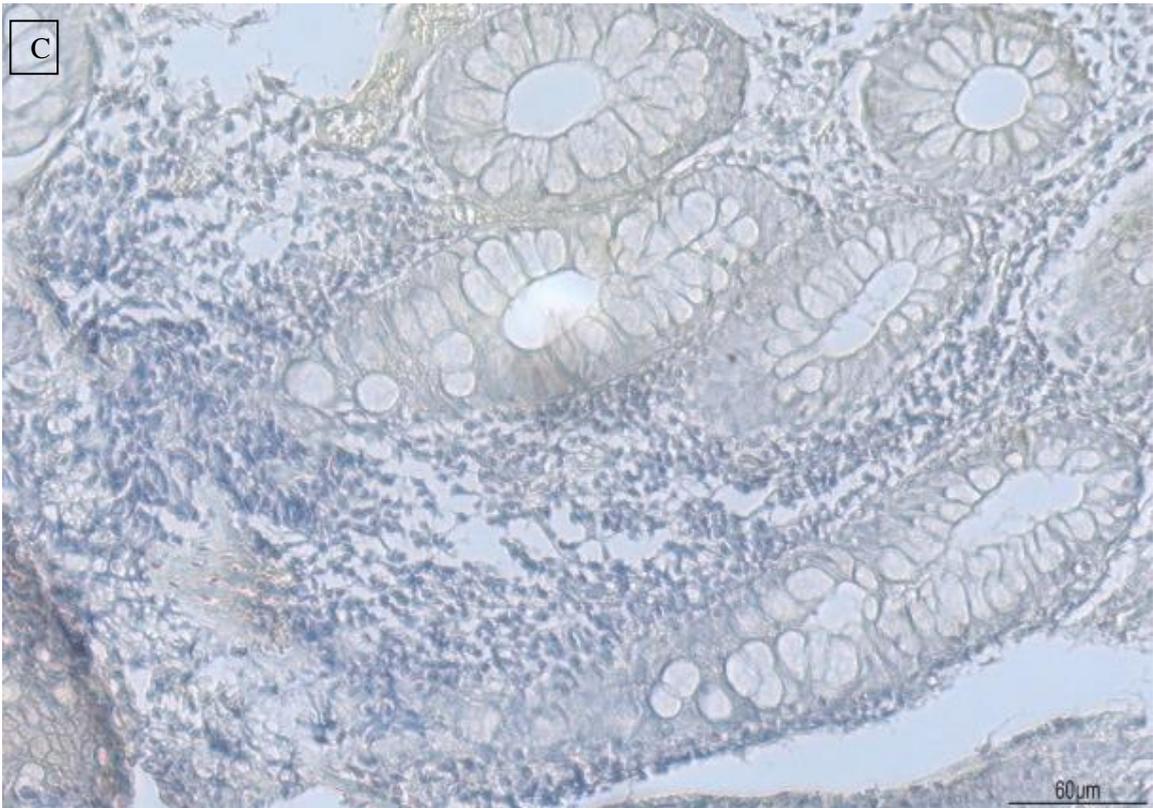
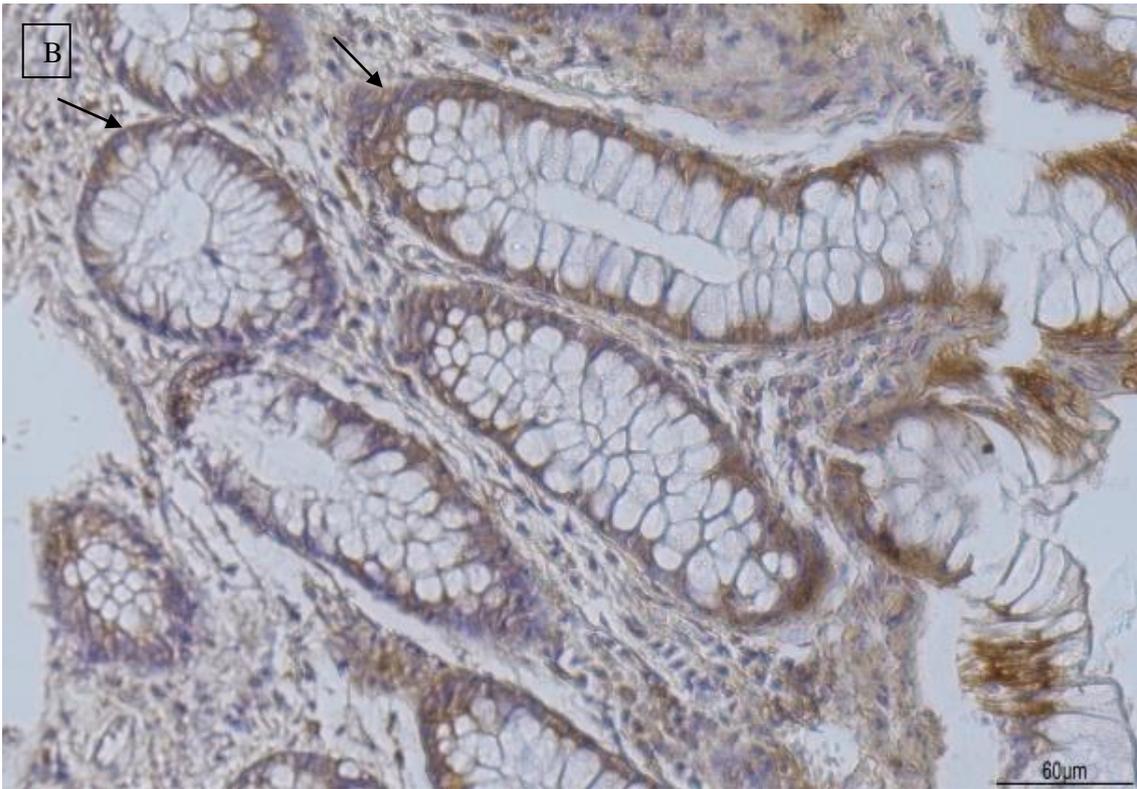


Das 24 biópsias estudadas, analisamos a expressão de Gal-3, com 17/24 (70,83%) que apresentaram marcação positiva para Gal-3 com um padrão de infiltrado inflamatório e marcação nos ductos, sendo 14/17(82,35%) de padrão focal (< de 50% de acometimento da área glandular) e 3/17(17,64%) de padrão difuso ( $\geq 50\%$  de acometimento da área glandular). Observamos abaixo na figura 3, a presença da

marcação positiva de Gal-3 em casos de SSP com o controle positivo e negativo de tecido de cólon.

**Figura 4- Caso de paciente com SSP com marcação positiva para Gal-3 (A1- marcação em região ductal e A2- marcação em região ductal com infiltrado inflamatório importante), controle positivo (B) e negativo(C) de tecido cólon respectivamente. As marcações positivas foram demonstradas com o auxílio das setas.**





## 7. DISCUSSÃO

No nosso estudo avaliamos, de modo inédito, os níveis de Gal-1 e -3 séricas e salivares em pacientes com SSP e correlacionamos com potenciais associações entre os níveis de Gals com índices de atividade de doença, manifestações clínicas e parâmetros laboratoriais. Além disso, descrevemos o perfil da expressão de Gal-1 e 3 nas biópsias das glândulas salivares menores.

Observamos que os níveis séricos de Gal-1 (33338,30 pg/ml) e Gal-3 (4452,5 pg/ml) foram significativamente maiores nos pacientes com SSP comparados com controles com  $p < 0,001$ . Não houve associação com os domínios avaliados, índices de atividade e nem associação com parâmetros laboratoriais (PCR e VHS). Encontramos associação entre níveis maiores de Gal-3 sérica no grupo com FR negativo (4690,0 pg/ml) com  $p = 0,033$ .

No estudo de Zhang e cols.(2014) que avaliaram níveis de Gal-3 séricos em pacientes com SSP, os níveis séricos de Gal- 3 foram significativamente mais altos do que nos controles (749,3 vs. 431,0 pg/ml,  $p < 0,001$ ). Houve associação com domínio pulmonar e biológico (IgG e C3) e com PCR, VHS, fibrinogênio e menor taxa de albumina (ZHANG et al.,2014).

A falta de associação entre o domínio pulmonar e níveis de Gal-3 sérica no nosso estudo pode ter sido atribuído à baixa frequência de acometimento desse domínio nos nossos pacientes que foram de quatro casos. Além disso, observa-se ainda que o estudo de Zhang e cols.(2014) avaliou também um maior número de pacientes (87) e com maior média de duração de doença 63.8 (4–154) meses, o que pode ter contribuído para esta maior frequência.

Os dados de Gal-1 sérica em SSP não puderam ser comparados devido à falta de estudos na literatura, desse modo este é o primeiro estudo que mostra níveis de mediana mais elevada desta galectina dos pacientes com SSP.

Os níveis salivares de Gal-1 foram significativamente maiores nos pacientes com SSP comparados com controles (7015,30 x 0 pg/ml) com  $p = 0,038$ , porém maiores níveis não foram encontrados em relação à Gal-3 salivar comparados aos controles. Não encontramos associação entre os níveis séricos e salivares de Gals em pacientes com SSP.

Houve associação entre níveis de Gal-3 salivar e presença do domínio glandular, corroborando a idéia de que maior envolvimento glandular pudesse produzir maiores

níveis de Gals. Sabe-se que a Gal-3 pode estar envolvida em uma variedade de eventos celulares, podendo ser encontrada nas células ductais salivares em processos inflamatórios ou neoplásicos de glândulas salivares (XU et al, 2000).

Encontramos correlação moderada direta entre níveis de linfócitos e Gal-3 salivar com  $r=0,64$  e  $p=0,025$ . De fato, sabe-se que a Gal-3 tem como uma de suas funções de estimular o crescimento e a diferenciação dos linfócitos (TIMOSHENKO et al., 2015).

Observamos uma correlação inversa entre ESSPRI e níveis de Gal- 1 salivar com  $r=-0,434$  e  $p=0,013$ . Não encontramos outras correlações estatisticamente significantes com os outros parâmetros do ESSDAI. Esses dados não puderam ser avaliados por falta de dados na literatura e escassez de estudos para fins de comparação com níveis salivares de Gals em SSP. Este é mais um resultado descrito pela primeira vez na literatura.

Na nossa pesquisa, observamos maior marcação de Gal-3 nas biópsias de glândulas salivares menores nos pacientes com SSP e pouca expressão para Gal- 1. Até o momento não há na literatura descrição de um perfil de marcação de Gal-1 e -3 por imunohistoquímica em biópsias de pacientes com SSP. Martinez Allo e cols., em 2020, demonstraram que camundongos idosos mutantes nulos de Gal-1 ( $Lgals1^{-/-}$ ) desenvolveram um processo inflamatório espontâneo nas glândulas salivares que se assemelha à SSj, além de positividade de AntiRo/SSA. Nas biópsias labiais de pacientes com SSP (14 casos) mostraram expressão de Gal-1 reduzida concomitante com maior número de células T CD8 + infiltradas, resultado concordante ao da nossa pesquisa em relação à Gal-1 (MARTÍNEZ ALLO et al., 2020).

Apesar de não haver ainda estudos com um perfil de marcação para Gal-3 em pacientes com SSP, observamos que as marcações foram em região de ducto glandular e de modo focal, sendo necessários mais estudos para confirmar esses achados.

Algumas associações podem não ter sido observadas porque a maioria dos pacientes se encontrava em baixa atividade de doença. Pelo perfil das Gal- 1 (anti – inflamatória) e Gal-3 (inflamatória), esperávamos encontrar Gal-1 diminuída e Gal-3 aumentada no soro e na saliva dos pacientes, porém esses achados podem não ter sido encontrados porque os pacientes estavam com a doença controlada e sob uso de tratamento medicamentoso (corticoides e DMARDs), os quais podem influenciar na dosagem das galectinas.

A verificação das Gal-1 e -3 aumentadas no soro, além do aumento de Gal-1 salivar reforça que as mesmas podem contribuir como biomarcadores da doença, já que foram encontradas com elevação expressiva no grupo SSP comparada com o grupo controle.

Sabe-se que a biópsia de glândula salivar menor é a forma mais objetiva de diagnóstico da doença e encontramos pouca expressão de Gal-1 e imunomarcção de Gal -3 em células ductais de modo focal, corroborando a premissa de pouca expressão de Gal-1 (antiinflamatória) e marcação positiva de Gal-3 (inflamatória) nas células envolvidas na etiopatogenia da doença.

Além disso, a associação de maiores níveis de Gal-3 salivares em pacientes com desenvolvimento glandular como aumento de parótidas reforça a teoria de maiores níveis quando há envolvimento direto da glândula envolvida no processo da doença, além da correlação com o número de linfócitos, já que a doença se caracteriza por uma infiltração linfocitária. Reforça-se a necessidade de novos estudos na área para avaliarmos com uma amostra maior de pacientes se há aumento de níveis salivares de Gal-3 nos pacientes com SSP estatisticamente significativo comparado com os controles saudáveis. Reforça-se também a necessidade de estudos posteriores de marcação linfocitária nas biópsias, já que se trata da característica histopatológica da doença.

Para a correlação inversa de média de ESSPRI com nível salivar de Gal-1 corrobora a teoria de esta galectina ter um perfil de envolvimento anti-inflamatorio. Para o aumento dos níveis de Gal-3 séricas com negatividade de fator reumatoide não encontramos condição clínica que justifique essa associação.

Como limitações do trabalho, houve dificuldade na quantidade de amostras de salivas em algumas pacientes uma vez que o método utilizado foi o fluxo salivar não estimulado (teste padrão). Não há estudos com Gal salivares em SSj e não há dados se a estimulação do fluxo salivar pudesse alterar os resultados. Também outra limitação foi nossa amostra pequena da pesquisa, após verificação de todos os critérios de exclusão.

Ressaltamos ser este um estudo inédito sobre avaliação da dosagem de Gals salivares em SSP e alguns resultados desse trabalho precisam ser confirmados por outras pesquisas e comparados para que se possa verificar que seus resultados e suas análises tenham validade na prática clínica.

## 8. CONCLUSÃO

Os principais resultados encontrados foram:

- Indivíduos com SSP apresentaram maiores níveis séricos de Gals-1 e -3 e de Gal- 1 salivar;
- Níveis salivares de Gal- 3 estão associados às manifestações glandulares da doença;
- As biópsias de glândulas salivares menores apresentaram imunomarcção de Gal- 3 em região de ducto glandular e de modo focal.

Esses resultados têm grande relevância clínica numa possível aplicabilidade de uso dessas proteínas como biomarcadores séricos e salivares de diagnóstico precoce de SSP, doença com uma variedade de manifestações clínicas. Sabe-se que essa doença impacta mulheres em idade economicamente ativa e que pode trazer piora de qualidade de vida e aumento de morbimortalidade.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARCELLOS, K. S. A.; ANDRADE, L. E. C. Histopatologia e imunopatologia de glândulas salivares menores de pacientes com síndrome de Sjögren (SSj) **Rev. bras. reumatol**, v. 45, n. 4, p. 215–223, 2005.
- BARONDES, S. H. et al. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 33, p. 20807–20810, 1994.
- CAFARO, G. et al. One year in review 2019: Sjögren's syndrome. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 37, p. S3–S15, 2019.
- DANIELS, TROY E. et al. Associations between salivary gland histopathologic diagnoses and phenotypic features of Sjögren's Syndrome (SS) among 1726 registry participants. **Arthritis Rheum.** v .63, n 7, p 2021–2030,2011.
- DHIRAPONG, A et al. The immunological potential of galectin-1 and -3 **Autoimmunity Reviews** v.8 , p. 360–363, 2009.
- FISHER, B.A. et al. Standardisation of labial salivary gland histopathology in clinical trials in primary Sjögren's syndrome. **Ann RheumDis.** v.76, n 7, p 1161-1168, 2017.
- GAN Y, ZHAO X, HE J, et al. Increased Interleukin-17F is Associated with Elevated Autoantibody Levels and More Clinically Relevant Than Interleukin-17A in Primary Sjögren's Syndrome. **Journal of Immunology Research.**,4768408, 2017.
- HORNUNG , A, MONOSTORI É, KOVÁCS, L. Systemic lupus erythematosus in the light of the regulatory effects of galectin-1 on T-cell function. **Lupus.** v.26, n4, p 339-347 , 2017.
- IKEMORI, R. Y.et al. Galectin-3 Up-Regulation in Hypoxic and Nutrient Deprived Microenvironments Promotes Cell Survival. **PLOS one.** v. 9, n. 11, p. 1–12, 2014.
- ISSA, S. F. et al. Galectin-3 is Persistently Increased in Early Rheumatoid Arthritis (RA) and Associates with Anti-CCP Seropositivity and MRI Bone Lesions, While Early Fibrosis Markers Correlate with Disease Activity. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 86, n. 6, p. 471–478, 2017.
- ISSA,S. F et al. Increased galectin-3 may serve as a serologic signature of pré rheumatoid arthritis while markers of synovitis and cartilage do not differ between early undifferentiated arthritis subsets. **Arthritis Res Ther.** v.19, n. 80, 2017.
- JAZZAR, A.A, SHIRLAW, P.J, CARPENTER, G.H, CHALLACOMBE, S.J, PROCTOR, G.B. Salivary S100A8/A9 in Sjögren's syndrome accompanied by lymphoma. **J Oral Pathol e Med** , v.47, n 9, p 900-906, 2018.

- JONSSON, R. et al. "Current concepts on Sjögren's syndrome - classification criteria and biomarkers." **European journal of oral sciences** ,v. 126, n 1, p 37-48, 2018.
- KIM, S. J. et al Galectin-7 is epigenetically-regulated tumor suppressor in gastric câncer. **Oncotarget**. v.4, n 9, p 1461-71, 2013.
- KIMURA-HAYAMA E, CRIALES-VERA S, AZPEITIA-ESPINOSA L et al.: Elastographic ultrasound: an additional image tool in Sjögren's syndrome. **Int J Rheum Dis** v.21, n 6, p. 1293-1300, 2018.
- KOCA S. et al. Serum galectin-3 level in systemic sclerosis. **Clin Rheumatol** v. 3, p. 215–220 , 2014.
- KYRIAKIDIS, N. C.; KAPSOGEOURGOU, E. K.; TZIOUFAS, A. G. A comprehensive review of autoantibodies in primary Sjögren's syndrome: Clinical phenotypes and regulatory mechanisms. **Journal of Autoimmunity**, v. 51, p. 67–74, 2014.
- MARTÍNEZ ALLO, V. C. et al. Suppression of age-related salivary gland autoimmunity by glycosylation-dependent galectin-1 driven immune inhibitory circuits. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 117, n. 12, p. 6630–6639, 2020.
- MATSUI K, SANO H.T Helper 17 Cells in Primary Sjögren's Syndrome. **J Clin Med**. v. 5;6, n.7, p.65, 2017.
- MATSUOKA N, et al. Galectin-9 as a biomarker for disease activity in systemic lupus erythematosus. **PLoS One**. v.15, n.1, 2020.
- MENDEZ-HUERGO, S. P. et al. Clinical relevance of galectin-1 and galectin-3 in rheumatoid arthritis patients: Differential regulation and correlation with disease activity. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. JAN, p. 1–9, 2019.
- OCHIENG J, FURTAK V, LUKYANOV P. Extracellular functions of galectin-3 **Glycoconjugate Journal** v.19, p.527–535, 2004.
- OLIVEIRA F, et al. Galectin-3 in autoimmunity and autoimmune diseases. **Experimental Biology and Medicine**. v.240, p. 1019–1028, 2015.
- OHSHIMA, S. et al. Galectin 3 and Its Binding Protein in Rheumatoid Arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 48, n. 10, p. 2788–2795, 2003.
- PAGANOTTI, M A et al . Validação e propriedades psicométricas do Euler Sjögren's Syndrome Patient Reported Index (ESSPRI) para a língua portuguesa . **Rev. Bras. Reum**. v.55, n.5, p.439–445, 2015.
- PASQUINI, L. A. et al. Galectin-3 drives oligodendrocyte differentiation to control myelin integrity and function. **Cell Death Differ**, v.18, p.1746–56, 2011.

RABINOVICH, G.A., et al. An Emerging Role for Galectins in Tuning the Immune Response: Lessons from Experimental Models of Inflammatory Disease, Autoimmunity and Cancer..**Scandinavian Journal of Immunology**. v.66, p.143–158 , 2007.

RAMOS-CASALS, M., et al. Primary Sjogren syndrome. **BMJ**. v. 344, 2012.

RISCHMUELLER M, TIEU J, LESTER S. Primary's Sjögren Syndrome. **Best Practice and Research Clinical. Rheumatology** v.30, p.189 -220 , 2016.

SALATINO M, et al.Galectin-1 as a potential therapeutic target in autoimmune disorders and câncer. **Expert Opin. Biol. Ther.** v.8, n.1, 2008.

SERRANO E V, et al . Adaptação transcultural do "EULAR Sjögren's Syndrome Disease Activity Index (ESSDAI)" para a língua portuguesa. **Rev. Bras. Reumatol.**, São Paulo , v. 53, n. 6, p. 483-493, 2013 .

SEROR R, et al., EULAR Sjögren's syndrome disease activity index (ESSDAI): a user guide. **RMD Open** 1, 2015.

SHIBOSKI, S. C. et al. American College of rheumatology classification criteria for Sjögren's syndrome: A data-driven, expert consensus approach in the Sjögren's International Collaborative Clinical Alliance cohort. **Arthritis Care and Research**, v. 64, n. 4, p. 475–487, 2012.

SHIBOSKI C H, et al. The International Sjögren's Syndrome Criteria Working Group 2016 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism. Classification criteria for primary Sjögren's syndrome .A consensus and data-driven methodology involving three international patient cohorts. **Ann Rheum Dis** v.0, p.1–8, 2016.

SHIN T.The pleiotropic effects of galectin-3 in neuroinflammation: A review **Acta Histochemica** v.115 ,p. 407– 411, 2013.

TENGER, P. et al. Detection of anti-Ro/SSA and anti-La/SSB autoantibody-producing cells in salivary glands from patients with Sjogren's syndrome. **Arthritis Rheum**v.41,p 2238-2248, 1998.

TIMOSHENKO, A. V. Towards molecular mechanisms regulating the expression of galectins in cancer cells under microenvironmental stress conditions. **Cell. Mol. Life Sci**, v. 72, p.4327–4340, 2015.

TREVISANI, V. F. M. et al. Recommendations from the Brazilian society of rheumatology for the diagnosis of Sjögren's syndrome (Part I): Glandular manifestations (systematic review). **Advances in Rheumatology**, v. 59, n. 1, p. 1–17, 2019.

VALIM,V et al. Prevalência da síndrome de Sjögren primária em importante área metropolitana no Brasil. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 53, n. 1, p. 29-34, 2013 .

VALIM V, et al.. Recomendações para o tratamento da síndrome de Sjögren. **Rev Bras Reumatol.** v.55, n 5, p.446–457, 2015.

VAN RIEL PL, RENSKERS L. The Disease Activity Score (DAS) and the Disease Activity Score using 28 joint counts (DAS28) in the management of rheumatoid arthritis. **Clin Exp Rheumatol.** v.34, n.5 Suppl. 101, p. S40-S44, 2016.

VERSURA P, GIANNACCARE G, VUKATANA G et al.: Predictive role of tear protein expression in the early diagnosis of Sjögren's syndrome. **Ann Clin Biochem,** v.55, p.561-70, 2018.

VITALI C. et al. Sjogren's Syndrome Disease Damage Index and Disease Activity Index. **Arthritis & Rheumatism,** v. 56, n7, p. 2223-31, 2007.

VITALI, C. et al. Classification criteria for Sjögren's syndrome: A revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. **Annals of the Rheumatic Diseases,** v. 61, n. 6, p. 554–558, 2002.

WHITCHER, J.P., et al. A simplified quantitative method for assessing kerato conjunctivitis sicca from the Sjogren's Syndrome International Registry. **Am J Ophthalmol** v.149, n.405, 2010.

XU, W. D.; HUANG, Q.; HUANG, A. F. Emerging role of galectin family in inflammatory autoimmune diseases. **Autoimmunity Reviews,** v. 20, n. 7, p. 102847, 2021.

Xu, X.C. et al., Differential expression of galectin-1 and galectin-3 in benign and malignant salivary gland neoplasms. **Int J Oncol,** v.17,p. 271-7,2000.

ZHANG, R. et al. Increased levels of serum galectin-3 in patients with primary Sjögren's syndrome: Associated with interstitial lung disease. **Cytokine,** v. 69, n. 2, p. 289–293, 2014.

ZHANG X, et al. A pilot study to demonstrate diagnostic potential of galectin-3 levels in saliva. **J Clin Pathol** v. 69, p.1100–1104, 2016.

## APÊNDICES

### APÊNDICE A

#### 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 **“AVALIAÇÃO DAS GALECTINAS 1 E 3 SÉRICAS E SALIVARES EM PACIENTES COM SÍNDROME DE SJÖGREN PRIMÁRIA E SUA ASSOCIAÇÃO COM MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA DOENÇA”**, que está sob a responsabilidade da pesquisadora Aysa César Pinheiro, médica reumatologista, disponível no endereço: Hospital das Clínicas – Universidade Federal de Pernambuco, Av Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Recife – PE, disponível pelo telefone (81) 999046690 no e-mail: [aysapinheiro@hotmail.com](mailto:aysapinheiro@hotmail.com); que está sob orientação da Profa. Ângela Luzia Branco Pinto Duarte (Email: [angelabduarte@hotmail.com](mailto:angelabduarte@hotmail.com), Tel: (81) 999288550). Também participam dessa pesquisa os investigadores: Andrea Tavares Dantas (telefone 91721582) e Moacyr Rego (telefone 997943799).

Todas as suas dúvidas podem ser esclarecidas com o responsável por esta pesquisa. Apenas quando todos os esclarecimentos forem dados e você 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.

Você estará livre para decidir participar ou recusar-se. Caso não aceite participar, não haverá nenhum problema, desistir é um direito seu, bem como será possível retirar o consentimento em qualquer fase da pesquisa, também sem nenhuma penalidade.

#### **INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:**

A pesquisa tem como objetivo determinar os níveis das galectinas 1 e 3 no soro e na saliva de pacientes com Síndrome de Sjögren Primária (SSP) e sua associação com manifestações clínicas da doença.

Ao aceitar participar da pesquisa, você será submetido a um questionário clínico com perguntas de fácil entendimento e complementado com as informações extraídas do prontuário médico. Você tem o direito de recusar-se a responder as perguntas que ocasionem constrangimentos de qualquer natureza. Lembramos que não identificamos o usuário, desta maneira, não será revelada qualquer informação ao seu respeito ou que possa identificar você publicamente. Se você se sentir desconfortável ou constrangido ao responder às perguntas, pode interromper a sua participação, caso queira, sem que isso lhe traga algum prejuízo no seu atendimento. Você poderá ser incluído no grupo de pacientes com Síndrome de Sjögren ou no grupo controle.

Em seguida, será coletado uma amostra de sangue para a pesquisa das galectinas 1 e 3. A punção para a coleta de sangue (30 mL o que corresponde a duas colheres de sopa) em veia de antebraço com a agulha e seringa estéreis (procedimento igual ao que é realizado para a coleta de exames de rotina). Será realizada por um profissional experiente, minimizando assim o número de tentativas para coleta e complicações como hematoma (área arroxeadada na pele) no local, que desaparece totalmente após alguns dias sem necessidade de tratamento e sob técnica de assepsia (limpeza) adequada para evitar flebite (inflamação dos vasos), contaminação ou infecção. Se mesmo assim, alguma dessas complicações ocorrer, você terá amplo acesso

à equipe da pesquisa. Será recomendado por gelo no local e avaliação do médico para considerar necessidade de antibiótico ou tratamento tópico (com pomada local).

A coleta da saliva também será realizada, nos pacientes que terão que se abster de comer e beber por 1 hora antes da coleta da amostra, através do método de escoamento passivo da saliva não estimulada. Esse procedimento é não invasivo e não impõe nenhum risco ao paciente.

Os pacientes com suspeita de diagnóstico de Síndrome de Sjögren e, que não tiverem realizado a biópsia anteriormente, também poderão ser convidados à realização de biópsia de glândula salivar menor com profissionais habilitados a realizarem os exames para finalidade de diagnóstico. A biópsia de glândulas salivares menores é um exame invasivo e realizado por equipe especializada e habilitada para o procedimento após técnica de anestesia local. Os possíveis riscos decorrentes da realização da biópsia são pequenos e caracterizados por: sangramento local, infecção e parestesias (dormência) após o exame. Os procedimentos adotados serão hemostasia com compressão local e antibioticoterapia, e reavaliação clínica caso seja necessário. As parestesias serão tratadas com laserterapia e corticoterapia. Cerca de 95 % dos casos de parestesias são reversíveis e o pronto atendimento é útil para prevenção de parestesia permanente. Qualquer paciente que apresente complicação pós-biópsia terá pronto acesso ao serviço de Estomatologia-UFPE.

Os pacientes também poderão ser incluídos no grupo controle com coleta apenas de exame laboratorial (sangue e saliva).

Em relação aos benefícios do estudo, os pacientes serão cadastrados no ambulatório especializado e posteriormente poderão ser incluídos num Registro Nacional de pacientes com Síndrome de Sjögren, onde serão estudadas as características desses pacientes, sendo fonte posterior de estudo para desenvolvimento de novos tratamentos. Além disso, avaliaremos se o paciente tem alguma dificuldade na realização de algum exame complementar e encaminharemos para as unidades especializadas de oftalmologia, de estomatologia e de anatomia patológica.

Com o resultado desse estudo poderá ser encontrado um perfil de biomarcadores para o diagnóstico e acompanhamento dos pacientes com Síndrome de Sjögren e, portanto, auxiliará a descobrir novas aplicabilidades terapêuticas para a doença.

Durante o estudo você continuará em seguimento normal no ambulatório de Reumatologia do Hospital das Clínicas de Pernambuco (HC-PE) e o senhor (a) terá plena liberdade de recusar a participar ou retirar o seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer forma de penalização ou prejuízo ao seu tratamento.

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 ficarão armazenados em computador pessoal e em fichas, sob a responsabilidade do pesquisador, pelo período de mínimo 5 anos. Os dados coletados serão utilizados para compor um banco de dados e que o mesmo irá fomentar outras pesquisas futuras como Dissertação de Mestrado e Doutorado.

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. A coleta dos dados e da amostra de sangue e de saliva será realizada durante as consultas previamente agendadas, bem como a realização das biópsias de glândulas salivares menores, excepcionalmente a critério do pesquisador de se houver

necessidade de consultas extras referentes apenas a esse projeto, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores.

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 Prof. Moraes Rego s/n – 3º Andar- Cidade Universitária, Recife-PE, Brasil CEP: 50670-420, Tel.: (81) 2126.3743 – e-mail: [cephcufpe@gmail.com](mailto:cephcufpe@gmail.com))**. O participante da pesquisa poderá fazer ligação a cobrar para os pesquisadores caso tenham dúvidas sobre a pesquisa. Os telefones estão assinalados acima ao lado de cada participante.

(assinatura do pesquisador)

### CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO

Eu, \_\_\_\_\_,  
CPF, \_\_\_\_\_, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo **“AVALIAÇÃO DAS GALECTINAS 1 E 3 SÉRICAS E SALIVARES EM PACIENTES COM SÍNDROME DE SJÖGREN PRIMÁRIA E SUA ASSOCIAÇÃO COM MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA DOENÇA”** como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo (a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento.

Recife, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

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



Impressão digital

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

<b>Nome:</b>	<b>Nome:</b>
<b>Assinatura:</b>	<b>Assinatura:</b>

## APÊNDICE B – FICHA CLÍNICA DE PACIENTES COM SÍNDROME DE SJÖGREN

### I. IDENTIFICAÇÃO

data : \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Nº PRONTUÁRIO	
CODIGO ID PAC	
SEXO:	F ( ) M ( )
DN:	IDADE:
NATURALIDADE:	PROCEDÊNCIA:
RAÇA-COR AUTOREFERIDA: 1( ) Preta 2( ) Parda 3( ) Branca 4( ) Amarela 5( ) Indígena 6( ) Não sabe/Não quer responder	
PROFISSÃO:	ESTADO CIVIL:
PESO: _____	ALTURA: _____
DATA DO PRIMEIRO SINTOMA: ____/____/____	
DATA DO DIAGNÓSTICO: ____/____/____	
Telefone :	
Controle : sim _____ não _____	

### II. CRITÉRIO DE INCLUSÃO

- ( ) Preencheu Consenso do Grupo Americano-Europeu 2002 e/ou de 2012;  
 ( ) Preencheu Consenso Americano-Europeu 2016 e  
 ( ) Maior de 18 anos;

#### CRITÉRIO EUROPEU-AMERICANO 2002

<b>I. Sintomas oculares</b>	<i>Sim</i>	<i>Não</i>	<i>Não Realizado</i>
Resposta afirmativa para pelo menos 1 das questões abaixo			
Você tem sensação de olho seco diariamente por mais de três meses?			
Você tem sensação de areia nos olhos?			
Você usa lubrificante ocular mais de três vezes por dia?			
<b>II. Sintomas orais</b>	<i>Sim</i>	<i>Não</i>	
Resposta afirmativa para pelo menos 1 das questões abaixo			
Você tem sentido boca seca diariamente por mais de três meses?			
Você tem inchaço de glândulas salivares recorrentes ou persistentes na idade adulta?			
Você usa com frequência líquidos para ajudar a engolir alimentos secos?			
<b>III. Sinais oculares</b>	<i>Sim</i>	<i>Não</i>	<i>Não realizado</i>
Evidência de envolvimento ocular definido como um teste positivo em um dos seguintes:			
Teste de Schirmer tipo I, sem anestesia ( $\leq 5$ mm em 5 minutos)			
Escore de Rosa Bengala ou outro teste de olho seco (escore $>4$ de van Bijsterveld)			
<b>IV. Histopatologia:</b>	<i>Sim</i>	<i>Não</i>	<i>Não realizado</i>
Presença de sialoadenite focal linfocítica em glândula salivar menor (obtida de mucosa de aparência normal), lida por patologista experiente, com um escore de foco $>1$ , definida como o número de foco linfocítico (que são adjacentes aos ácinos de aparência normais e contendo mais de 50 linfócitos) por 4mm <sup>2</sup> de tecido glandular			
<b>V. Envolvimento de glândula salivar</b>	<i>Sim</i>	<i>Não</i>	<i>Não realizado</i>
Envolvimento objetivo definido por um teste positivo em um dos seguintes:			
Fluxo salivar total não estimulado ( $<1,5$ ml em 15 minutos)			
Sialografia de parótidas mostrando a presença de sialectasias difusas (padrão puntata, cavitário ou destrutivo), sem evidência de obstrução em ductos maiores.			
Cintilografia salivar mostrando redução da captação, da concentração e/ou excreção reduzida do traçador			
<b>VI. Autoanticorpos</b>	<i>Sim</i>	<i>Não</i>	<i>Não realizado</i>
Presença sérica do anticorpo anti-Ro (SSA)			
Presença sérica do anticorpo anti-La (SSB)			

SS primária de acordo com Consenso Americano-Europeu é definida por:

- a) a presença de 4 itens, desde que o item IV ou VI seja positivo. OU  
b) a presença de 3 dos 4 critérios objetivos (itens III, IV, V ou VI).

### Critérios do ACR 2012

Pacientes com sinais/sintomas devem ter pelo menos 2 dos 3 itens abaixo:

1. (Anti-Ro) e/OU (Anti-La) OU (FR positivo E FAN>1:320) ;
2. Biópsia de glândula salivar com um foco de sialoadenite em 4mm<sup>2</sup> ;
3. Ceratoconjuntivite seca com OSS escore  $\geq 3$  – pontuação de coloração ocular (indivíduos que não estão usando colírio para glaucoma e não foram submetidos a cirurgia corneal ou palpebral em pelo menos 5 anos).

### CRITÉRIOS EUROPEU-AMERICANO, 2016

	<i>Sim</i>	<i>Não</i>	<i>Não realizado</i>
1. Presença sérica de anticorpo anti-Ro (SSA) <input type="checkbox"/> 3 pontos			
2. Presença de sialoadenite focal linfocítica em glândula salivar menor (obtida de mucosa de aparência normal), lida por patologista experiente, com um escore de foco >1, definida como o número de foco linfocítico (que são adjacentes aos ácinos de aparência normais e contendo mais de 50 linfócitos) por 4mm <sup>2</sup> de tecido glandular. <input type="checkbox"/> 3 pontos			
3. OSS (Ocular Score Sicca) $\geq 5$ <input type="checkbox"/> 1 ponto			
4. Teste de Schirmer tipo I, sem anestesia ( $\leq 5$ mm em 5 minutos) <input type="checkbox"/> 1 ponto			
5. Fluxo salivar total não estimulado ( $< 0,1$ ml em 15 minutos) <input type="checkbox"/> 1 ponto			
<b>Total: 9 pontos</b>			

SS Primário, de acordo com Critérios Americano-Europeu 2016 é definido pela presença de  $\geq 4$  pontos.

### III - CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

<b>Pelo menos 1 das doenças ou item abaixo</b>	<i>Sim</i>	<i>Não</i>
Síndrome de Sobreposição		
SS secundária		
18 anos ou menos		
Hepatite C		
Síndrome da Imunodeficiência adquirida (SIDA)		
Passado de radioterapia em cabeça ou pescoço		
Linfoma ou outra doença linfoproliferativa		
Doença enxerto-versus-hospedeiro		
Sarcoidose		
Síndrome da HiperIgG4		

Considera-se síndrome de Sjögren secundária quando as manifestações clínicas são melhor explicadas por outra doença reumática autoimune. A presença de anticorpos associados a outras doenças, como anti CCP, anti cardiolipina, anti centrômero não são critérios de exclusão, quando as manifestações clínicas são melhor explicadas pela síndrome de Sjögren.

#### IV -AVALIAÇÃO CLÍNICA:

##### COMORBIDADES

	Sim	Não
Fibromialgia (ACR 90 ou ACR 2010)		
Síndromes dolorosas regionais (Tendinites/Bursites/ Síndromes compressivas)	Especifique:	
Osteoporose		
Osteoartrite	Especifique:	
Depressão		
Ansiedade		
Hipertensão		
Diabetes		
Dislipidemia		
Obesidade		
IAM /AVC		
Angioplastia		
Hipotireoidismo		
Hepatite B		
Linfoma	Especifique:	
Outras neoplasias	Especifique:	
Doença Renal Crônica		
Doenças respiratórias	Especifique:	
Doenças gastrointestinais	Especifique:	
Doenças endócrinas	Especifique:	
Menopausa		
Tabagismo atual (quanto/dia, carga tabagica, tempo usou, tempo parou)		
Hipovitaminose D		

##### V.FUNÇÃO SALIVAR E LACRIMAL (valor mais recente)

Teste	Resultado 1 (diagnóstico)	Data	Resultado 2 (atual)	Data
Fluxo salivar não estimulado (ml/15min)				
Schirmer OD (mm)				
Schirmer OE (mm)				
Escore OSS				

##### VI.HISTOPATOLOGIA (DATA : \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ ( ) Não Realizado

Área (mm <sup>2</sup> ) :	Focus score (número total de focos na amostra)
Grau de inflamação:	
Centro Germinativo:	SIM ( ) NÃO( )
Dilatação ductal	Leve( ) moderada ( ) acentuada ( )
Atrofia acinar	Leve( ) moderada ( ) acentuada ( )
Fibrose	Leve( ) moderada ( ) acentuada ( )
Lipossubstituição	Leve( ) moderada ( ) acentuada ( )
Padrão histológico*	( ) 2( ) 3( ) 4( )

- Focal<sup>1</sup>, Inespecífica<sup>2</sup>, Atrofiante<sup>3</sup>, Esclerosante<sup>3</sup>

#### VII. AUTOANTICORPOS

Autoanticorpos	Sim	Não	Não realizado	Título/Resultado	Data
Anti – Ro –SSA					
Anti – La - SSB					
Fator Reumatóide					
FAN					
Anti-CCP					
Anti-centromero					
Anti-cardiolipina					
Anti-Scl70					
Anti-RNP					
Anti-DNA					
Anti-Sm					
Anti-TPO					
Crioglobulinas					
Outros					

#### VIII. MEDICAÇÃO SINTOMÁTICA NO PASSADO OU PRESENTE

	PASSADO	PRESENTE	NÃO
Pilocarpina			
Cevimelina			
Acetilcisteína			
Óleo de linhaça			
Substituto de saliva			
Substituto de lágrima			

#### IX-IMUNOSSUPRESSOR/IMUNOMODULADOR/TRATAMENTO DE COMORBIDADES

	PASSADO	PRESENTE	NÃO
Hidroxicloroquina			
Metotrexate			
Leflunomida			
Azatioprina			
Baixa dose de corticóide ( $\leq 20$ mg/d)			
Alta dose de corticóide ( $> 20$ mg/d)			
Ciclofosfamida			
Micofenolato mofetil			
Imunoglobulina			
Rituximabe			
Outro biológico. Qual?			
Outro imunossupressor. Qual?			
Anti-inflamatório não esteroide			
Analgésico			
Antidepressivo			
Opióide leve (tramadol ou codeína)			
Antihipertensivo			
Anticonvulsivante			
Sinvastatina ou outra estatina			
Antidiabético oral			
Insulina			
Inibidor bomba de próton (Omeprazol/outro)			

Bisfosfonatos			
Vitamina D			
Cálcio			
Ácido fólico			
Outros. Especifique:			

**X: Ultrassonografia de Parótidas**

---



---



---

**XI – Sintomas clínicos atuais**

Artralgia            artrite            xerostomia            xeroftalmia            secreta vaginal  
 Dispneia            raynaud            febre            perda de peso            linfonodomegalia  
 Aumento de parótidas            fadiga            déficit de força            parestesias  
 envolvimento cutâneo

**XII-SINTOMAS E QUESTIONÁRIO DE ATIVIDADE DE DOENÇA (ESSDAI, ESSPRI) E DE DANO(SSDDI)**

**ESSDAI ATUAL**

Domínios	Peso	Pontuação	Escore Domínio (Peso x Ponto)
Constitutional	3		
Linfadenomegalia	4		
Glandular	2		
Articular (com sinovite)	2		
Cutâneo	3		
Respiratório	5		
Muscular (com miosite)	5		
Envolvimento Renal	6		
Envolvimento Neurológico Periférico	5		
Envolvimento Neurológico Central	5		
Hematológico	2		
Biológico	1		
SCORE TOTAL ESSDAI (soma dos domínios):			

**ESSPRI ATUAL**

	Pontuação de 1 a 10
1. Fadiga	
2. Dor articular	
3. Sintomas de secreta	
Total	

**SSDDI – Sjogren’s Syndrome Disease Damage Index**

Item	Definição	Score	Pontuação
1) Dano oral/saliva			
a. Prejuízo do fluxossalivar	Fluxo salivar não estimulado (<1,5ml/15min)		
b. Perda de dentes	Perda completa ou quase completa	1	
2) Dano ocular			
a. Prejuízo na lubrificação ocular	Schirmer < 5mm em 5min		
b. Anormalidade estrutural	Úlcera de córnea, catarata, blefarite crônica	1	
3) Dano neurológico			
a) Envolvimento de SNC	Envolvimento crônico e estável do SNC	2	
b) Neuropatia periférica	Comprometimento crônico e estável do sistema periférico ou autonômico	1	
4) Dano pleuropulmonar (qualquer um das seguintes alterações): a) Fibrose pleural b) Fibrose intersticial c) Significante dano funcional irreversível	a) Confirmado por imagem b) Confirmado por imagem c) Confirmado por espirometria	2	
5) Dano renal (qualquer um das seguintes alterações): a) Aumento da creatinina ou redução da TFG b) Acidose tubular c) Nefrocalcinose	a. Anormalidade estável e crônica b. Ph urinário > 6,0 e bicarbonato sérico < 15 mmoles/litro em 2 exames consecutivos c. Confirmado por imagem	2	
6) Doença linfoproliferativa (qualquer uma das seguintes alterações): a) Linfoma de célula B b) Mieloma múltiplo c) Macroglobulinemia de Waldenström	A. Clínica e confirmação histológica B. Clínica e confirmação histológica C. Clínica e confirmação histológica	5	

**XIII – ANÁLISE DE SANGUE ATUAL (DATA:            )**

	Resultado	Unidade
Leucócitos totais		(10 <sup>9</sup> /L)
Linfócitos		(10 <sup>9</sup> /L)
Plaquetas		(10 <sup>9</sup> /L)
Hemoglobina		(g/dL)
Hematócrito		
VHS		(mm/h)
PCR		(mg/dL)
Uréia		(Mmol/L)
Creatinina		(µmol/L)
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>		(mmol/L)
CPK		(Ui/L)
DHL		(UI/L)
IgG		(g/L)
C3		Specify :
C4		Specify :
Glicemia		(mg/dL)
Colesterol Total		(mg/dL)

Colesterol HDL		(mg/dL)
Colesterol LDL		(mg/dL)
Triglicéridos		(mg/dL)

**XIV – ANÁLISE DA URINA (DATA:            )**

	<b>Resultado</b>	<b>Unidade</b>
PH		
Densidade		
Leucócitos		Número de células
Hemácias		Número de células
Proteínas		Quantitativo
Proteinúria 24h		(g)

## APÊNDICE C – TRABALHO PUBLICADO NO MESTRADO

Trevisani *et al. Advances in Rheumatology* (2019) 59:58  
<https://doi.org/10.1186/s42358-019-0102-8>

# Recommendations from the Brazilian society of rheumatology for the diagnosis of Sjögren's syndrome (Part I): glandular manifestations (systematic review)



Virginia Fernandes Moça Trevisani<sup>1,2\*</sup>, Sandra Gofinet Pasoto<sup>3</sup>, Marilena Leal Mesquita Silvestre Fernandes<sup>4</sup>, Maria Lúcia Lemos Lopes<sup>5</sup>, Sonia Cristina de Magalhães Souza Fialho<sup>6</sup>, **Aysa César Pinheiro**<sup>7</sup>, Laura Caldas dos Santos<sup>8</sup>, Simone Appenzeller<sup>9</sup>, Tania Fidelix<sup>8</sup>, Sandra Lúcia Euzébio Ribeiro<sup>10</sup>, Danielle Christinne Soares Egypto de Brito<sup>11</sup>, Tatiana Libório<sup>10</sup>, Maria Carmen Lopes Ferreira Silva Santos<sup>12</sup>, Leandro Tanure<sup>13</sup>, Juliana D Agostino Gennari<sup>14</sup>, Vinicius Tassoni Civile<sup>1</sup>, Ana Carolina Pereira Nunes Pinto<sup>1</sup>, Fabíola Reis Oliveira<sup>15</sup>, Jaqueline Martins de Sousa<sup>8</sup>, Samira Tatiyama Miyamoto<sup>16</sup> and Valeria Valim<sup>17</sup>

### Abstract

**Background:** Primary Sjögren's syndrome (pSS) is a systemic immune-mediated disease whose main characteristic is exocrine gland inflammation and, subsequent reduction in tear and saliva production. A delayed diagnosis is common due to the nonspecific clinical manifestations of disease. The aim of the present study was to develop recommendations for the diagnosis of glandular manifestations of pSS based on evidence and expert opinion.

**Main body of the abstract:** We conducted a systematic literature review to retrieve the best evidence available on the accuracy of diagnostic tests for pSS. We also held two in-person meetings with experts (rheumatologists, pathologists, ophthalmologists and dentists) to establish their level of agreement using the Delphi method. Ultimately, we generated 18 recommendations that aim to facilitate the diagnosis of the glandular manifestations of pSS.

**Conclusion:** The diagnosis of glandular manifestations of pSS is complex and multidisciplinary. It requires specific knowledge in the field of ophthalmology, immunology, pathology and imaging, making it compulsory for the rheumatologist to work with professionals from these different areas in order to improve accuracy and early diagnosis. Glandular dysfunction tests, ANA, RF, Anti-Ro, protein electrophoresis, urinalysis, blood count, C-Reactive protein, complement, testing for syphilis and viruses (HCV, HIV) and SGUS should be investigated when dryness or systemic manifestation are present. Minor salivary gland biopsy is recommended for all anti-Ro negative or incomplete criteria cases.

**Keywords:** Sjogren's syndrome, Xerostomia, Xerophthalmia, Salivary gland diseases, Lacrimal apparatus diseases, Diagnosis,

\* Correspondence: [vmoca@uol.com.br](mailto:vmoca@uol.com.br)

<sup>1</sup>Disciplina de Medicina de Urgência e Medicina Baseada em Evidências, Escola Paulista de Medicina-Universidade Federal de São Paulo (EPM-UNIFESP), Rua Botucatu 740 Vila Clementino, São Paulo, SP CEP: 04023-062, Brazil

<sup>2</sup>Disciplina de Reumatologia, Universidade de Santo Amaro, Rua Enéas Siqueira Neto, Jardim das Embuias, São Paulo, SP CEP: 04829-300, Brazil Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2019 Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

**APÊNDICE D – TRABALHO ENVIADO PARA A PUBLICAÇÃO NO  
MESTRADO**

ADRH-D-21-00233

**2021 Recommendations of the brazilian society of rheumatology for the  
gynecological and obstetric care of patients with sjogren´s syndrome**

Fabiola Reis Oliveira; Valeria Valim; Sandra Gofinet Pasoto; Marilena Leal Mesquita Silvestre Fernandes; Maria Lucia Lemos Lopes; Sonia Cristina de Magalhães Souza Fialho; **Aysa César Pinheiro**; Laura Caldas dos Santos; Simone Appenzeller; Tania Fidelix; Sandra Lucia Euzébio Ribeiro; Danielle Christinne Soares Egypto de Brito; Tatiana Libório; Maria Carmen Lopes Ferreira Silva Santos; Leandro Tanure; Juliana D Agostino Gennari; Vinicius Tassoni Civile; Ana Carolina Pereira Nunes Pinto; César Ramos Rocha-Filho; Samira Tatiyama Miyamoto; Lissiane Karine Noronha Guedes; Alisson Pugliesi; Virginia Fernandes Moça Trevisani

Dear author:

You are receiving this email because you have been listed as an author on a manuscript recently submitted to Advances in Rheumatology.

The manuscript details are below.

Title: 2021 Recommendations of the brazilian society of rheumatology for the gynecological and obstetric care of patients with sjogren´s syndrome  
Authors: Fabiola Reis Oliveira; Valeria Valim; Sandra Gofinet Pasoto; Marilena Leal Mesquita Silvestre Fernandes; Maria Lucia Lemos Lopes; Sonia Cristina de Magalhães Souza Fialho; **Aysa César Pinheiro**; Laura Caldas dos Santos; Simone Appenzeller; Tania Fidelix; Sandra Lucia Euzébio Ribeiro; Danielle Christinne Soares Egypto de Brito; Tatiana Libório; Maria Carmen Lopes Ferreira Silva Santos; Leandro Tanure; Juliana D Agostino Gennari; Vinicius Tassoni Civile; Ana Carolina Pereira Nunes Pinto; César Ramos Rocha-Filho; Samira Tatiyama Miyamoto; Lissiane Karine Noronha Guedes; Alisson Pugliesi; Virginia Fernandes Moça Trevisani  
Corresponding author: Dr. Alisson Pugliesi

Kind regards,

Editorial Office  
Advances in Rheumatology  
<http://advancesinrheumatology.biomedcentral.com>

**ANEXO A- EULAR SJÖGREN'S SYNDROME DISEASE ACTIVITY INDEX  
(ESSDAI)**

<b><u>Domínio constitucional</u></b>		
<i>Por favor, atenção para não avaliar sintomas constitucionais não relacionados à doença (como febre de origem infecciosa, perda voluntária de peso).</i>		
<b>Nenhuma atividade</b>	ausência dos sintomas a seguir	0
<b>Atividade baixa</b>	febre moderada ou intermitente (37,5°-38,5°C) / suores noturnos ou perda de peso involuntária de 5% a 10% do peso corporal	1
<b>Atividade moderada</b>	febre alta (>38,5°C) / suores noturnos ou perda de peso involuntária de > 10% do peso corporal	2

<b><u>Domínio de linfadenopatia</u></b>		
<b>Nenhuma atividade</b>	ausência das características a seguir	0
<b>Atividade baixa</b>	linfadenomegalia $\geq 1$ cm em qualquer região ou $\geq 2$ cm na região inguinal	1
<b>Atividade moderada</b>	linfadenomegalia $\geq 2$ cm em qualquer região ou $\geq 3$ cm em região inguinal ou esplenomegalia (cl clinicamente palpável ou avaliada por exame de imagem)	2
<b>Atividade alta</b>	doença proliferativa maligna das células B recente	3

<b><u>Domínio glandular</u></b>		
<i>Por favor, atenção para não avaliar aumento do volume glandular não relacionado à doença (como litíase ou infecção).</i>		
<b>Nenhuma atividade</b>	ausência de aumento glandular	0
<b>Atividade baixa</b>	pequeno aumento glandular com: <ul style="list-style-type: none"> <li>• parótida aumentada (<math>\leq 3</math>cm) ou aumento discreto submandibular ou lacrimal<sup>1</sup></li> </ul>	1
<b>Atividade moderada</b>	aumento glandular maior com: <ul style="list-style-type: none"> <li>• parótida aumentada (&gt;3cm) ou aumento importante submandibular ou lacrimal<sup>1</sup></li> </ul>	2

1. A distinção entre aumento discreto ou importante do volume glandular submandibular ou lacrimal fica a critério médico.

<b><u>Domínio articular</u></b>		
<i>Por favor, atenção para não avaliar envolvimento articular não relacionado à doença, como a osteoartrite..</i>		
<b>Nenhuma atividade</b>	ausência de envolvimento articular ativo no momento	0
<b>Atividade baixa</b>	artralgia nas mãos, punhos, tornozelos e pés acompanhados por rigidez matinal (>30 min)	1
<b>Atividade moderada</b>	1 a 5 sinovites dentre as 28 <sup>2</sup>	2
<b>Atividade alta</b>	$\geq 6$ sinovites dentre as 28 <sup>2</sup>	3

2 As 28 articulações incluídas no cálculo do DAS28 (DiseaseActivity Score 28) são ombros, cotovelos, punhos, metacarpofalangeanas, interfalangeanas proximais e joelhos.

**Domínio Cutâneo**

Por favor, atenção em avaliar como “Nenhuma atividade” lesões antigas e estáveis mais relacionadas ao dano (seqüela) do que à atividade da doença ou envolvimento cutâneo não relacionado à doença.

<b>Nenhuma atividade</b>	ausência de envolvimento cutâneo ativo no momento	0
<b>Atividade baixa</b>	eritema multiforme	1
<b>Atividade moderada</b>	vasculite cutânea limitada, incluindo vasculite urticariforme <sup>3</sup> ou púrpura limitada aos pés e tornozelos ou lúpus cutâneo subagudo	1
<b>Atividade alta</b>	vasculite cutânea difusa, incluindo vasculite urticariforme <sup>3</sup> ou púrpura difusa ou úlceras relacionadas à vasculite	2

3: Vasculite cutânea limitada envolve <18% da área de superfície corporal; Vasculite cutânea difusa envolve >18% da área de superfície corporal. Área de superfície corporal (ASC) é definida utilizando a regra dos nove (usado para avaliar a extensão de queimaduras) como vem a seguir: Palma (excluindo os dedos)= 1% ASC, cada membro inferior =18% ASC; cada membro superior = 9% ; tronco (frontal) = 18% ASC; tronco (dorsal) = 18% ASC

**Domínio Respiratório**

Por favor, atenção em avaliar como “Nenhuma atividade” lesões antigas e estáveis mais relacionadas ao dano (seqüela) do que à atividade da doença ou envolvimento respiratório não relacionado à doença (ex. cigarro).

<b>Nenhuma atividade</b>	ausência de envolvimento pulmonar ativo no momento	0
<b>Atividade baixa</b>	tosse persistente ou envolvimento brônquico sem nenhuma alteração radiológica no raio X simples ou evidência de doença pulmonar intersticial ao Rx simples ou TCAR, com: <ul style="list-style-type: none"> <li>• nenhuma dispnéia e</li> <li>• prova de função pulmonar normal</li> </ul>	1
<b>Atividade moderada</b>	envolvimento pulmonar moderadamente ativo, tal como doença pulmonar intersticial diagnosticada pelo TCAR com: <ul style="list-style-type: none"> <li>• dispnéia aos grandes esforços (NHYA<sup>4</sup> II) ou prova de função pulmonar alterada dentro dos seguintes parâmetros: 70% &gt;DLCO<sup>5</sup> ≥ 40% e/ou 80% &gt; CVF<sup>6</sup> ≥ 60%</li> </ul>	2
<b>Atividade alta</b>	envolvimento pulmonar altamente ativo como doença pulmonar intersticial diagnosticada pelo TCAR com: <ul style="list-style-type: none"> <li>• dispnéia aos pequenos esforços ou ao repouso (NHYA<sup>4</sup> III, IV) ou prova de função pulmonar alterada: DLCO<sup>5</sup> &lt; 40% e/ou CVF<sup>6</sup> &lt; 60%</li> </ul>	3

Para o diagnóstico da doença pulmonar intersticial o TCAR (Tomografia computadorizada de alta resolução) ou radiografia simples são necessárias e devem ter sido realizadas nos últimos dois anos.

4 NYHA (classificação funcional da New York Heart Association) 5 DLCO (Prova de difusão de dióxido de carbono) 6 CVF (Capacidade vital forçada)

**Domínio Renal**

Por favor, atenção em avaliar como “Nenhuma atividade” lesões antigas e estáveis mais relacionadas ao dano (seqüela) do que à atividade da doença e envolvimento renal não relacionado à doença.

Se a biópsia for feita, favor classificar a atividade baseada, primeiramente, nas características histológicas.

<b>Nenhuma atividade</b>	ausência de envolvimento renal ativo no momento: <ul style="list-style-type: none"> <li>• proteinúria &lt; 0,5g/d, nenhuma hematúria, nenhuma leucocitúria nenhuma acidose ou</li> <li>• proteinúria estável de longa duração devido ao dano/seqüela</li> </ul>	0
<b>Atividade baixa</b>	evidência de envolvimento específico da atividade renal, limitada a: <ul style="list-style-type: none"> <li>• acidose tubular sem insuficiência renal ou</li> <li>• envolvimento glomerular: <ul style="list-style-type: none"> <li>- com proteinúria (entre 0,5 e 1 g/d) e</li> <li>- sem hematúria ou insuficiência renal (TGF<sup>7</sup> ≥ 60ml/min)</li> </ul> </li> </ul>	1
<b>Atividade moderada</b>	atividade renal moderada: <ul style="list-style-type: none"> <li>• acidose tubular com insuficiência renal (TGF<sup>7</sup> &lt; 60 ml/min) ou</li> </ul>	2

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• envolvimento glomerular: <ul style="list-style-type: none"> <li>- com proteinúria entre 1 e 1.5g/d e</li> <li>- sem hematuria ou insuficiência renal (TGF<sup>7</sup> ≥ 60ml/min) ou</li> </ul> </li> <li>• evidência histológica: <ul style="list-style-type: none"> <li>• glomerulonefrite e/ou</li> <li>• infiltração intersticial infóide importante</li> </ul> </li> </ul>	
<b>Atividade alta</b>	atividade renal alta: <ul style="list-style-type: none"> <li>• envolvimento glomerular: <ul style="list-style-type: none"> <li>• proteinúria &gt; 1,5 g/d e/ou</li> <li>• hematuria e/ou</li> <li>• insuficiência renal (TGF<sup>7</sup> &lt; 60 ml/min) ou</li> </ul> </li> <li>• evidência histológica de: <ul style="list-style-type: none"> <li>• glomerulonefrite proliferativa ou</li> <li>• crioglobulinemia relacionada ao envolvimento renal</li> </ul> </li> </ul>	3

7 TGF (Taxa de filtração glomerular) calculada com a fórmula MDRD (Modification of Diet in Renal Disease).

<b><u>Domínio Muscular</u></b>		
<i>Por favor, atenção para não avaliar envolvimento muscular não relacionado à doença, como fraqueza devido a corticosteróides.</i>		
<b>Nenhuma atividade</b>	ausência de envolvimento muscular ativo no momento	0
<b>Atividade baixa</b>	miosite levemente ativa diagnosticada pela EMG ou biópsia com: <ul style="list-style-type: none"> <li>• ausência de fraqueza e creatinaquinase alterada (N* &lt; CK ≤ 2N)</li> </ul>	1
<b>Atividade moderada</b>	miosite moderadamente ativa diagnosticada pela EMG ou biópsia com: <ul style="list-style-type: none"> <li>• fraqueza (déficit máximo de 4/5) ou creatinaquinase elevada (2N &lt; CK ≤ 4N)</li> </ul>	2
<b>Atividade alta</b>	miosite altamente ativa diagnosticada pela EMG ou biópsia com: <ul style="list-style-type: none"> <li>• fraqueza (déficit ≤ 3/5) ou creatinaquinase elevada (&gt; 4N)</li> </ul>	3

\*N=normal (valor de referência).

EMG= eletromiografia

<b><u>Domínio do sistema nervoso periférico</u></b>		
<i>Por favor, atenção em avaliar como "Nenhuma atividade" lesões antigas e estáveis mais relacionadas ao dano (seqüela) do que à atividade ou envolvimento do sistema nervoso periférico não relacionado à doença.</i>		
<b>Nenhuma atividade</b>	ausência de envolvimento ativo do sistema nervoso periférico, no momento	0
<b>Atividade baixa</b>	evidência de envolvimento ativo do sistema nervoso periférico, como: <ul style="list-style-type: none"> <li>• polineuropatia periférica axonal diagnosticado pelo ECN/ENMG ou</li> <li>• neuralgia do Trigêmio (V nervo craniano)</li> </ul>	1
<b>Atividade moderada</b>	evidência de envolvimento moderadamente ativo, do sistema nervoso periférico, como: <ul style="list-style-type: none"> <li>• neuropatia axonal motora e sensorial diagnosticada pelo ECN/ENMG, sem déficit motor ou</li> <li>• neuropatia sensorial pura com a presença de vasculite crioglobulinêmica ou</li> <li>• gangliopatia<sup>8</sup> com sintomas restritos à ataxia moderada ou</li> <li>• polineuropatia inflamatória desmielinizante crônica (CIDP)<sup>9</sup> com deficiência funcional moderada (sem déficit motor ou ataxia moderada) ou</li> <li>• envolvimento do nervo craniano de origem periférica (exceto nervo do Trigêmio (V))</li> </ul>	2
<b>Atividade alta</b>	evidência de envolvimento altamente ativo do sistema nervoso periférico,	3

	como: <ul style="list-style-type: none"> <li>• neuropatia axonal motora e sensorial diagnosticada pela ECN/ENMG com déficit motor <math>\leq 3/5</math> ou</li> <li>• envolvimento do nervo periférico atribuído à vasculite (mononeuritemúltipla) ou</li> <li>• ataxia severa atribuída à ganglionopatia<sup>8</sup> ou</li> <li>• polineuropatia inflamatória desmielinizante crônica (CIDP)<sup>9</sup> com deficiência funcional severa: déficit motor <math>\leq 3/5</math> ou ataxia grave</li> </ul>	
--	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

8 Deficiência sensorial pura com ataxia e deficiência difusa ou abolição do potencial sensitivo no ECN (estudo da condução nervosa) ;9 Poliradiculoneuropatia com sintomas clínicos sugestivos (déficit sensoriomotor dos 4 membros, déficit motor proximal, arreflexia generalizada, sintomas sensoriais iniciais afetando membros superiores, e/ou associado a envolvimento do nervo craniano), nível de proteína aumentado e/ou ECN anormal (latência distal motora prolongada, velocidade da condução nervosa reduzida, latência prolongada da onda F , bloqueio da condução e/ou dispersão temporal)

<b><u>Domínio do Sistema nervoso central</u></b>		
<i>Por favor, atenção em avaliar como "Nenhuma atividade" lesões antigas e estáveis mais relacionadas ao dano (seqüela) do que à atividade da doença ou envolvimento do sistema nervoso central não relacionado à doença.</i>		
<b>Nenhuma atividade</b>	ausência de envolvimento ativo do SNC no momento	0
<b>Atividade moderada</b>	manifestações clínicas moderadamente ativas do SNC, como: <ul style="list-style-type: none"> <li>• envolvimento de nervo craniano de origem central ou</li> <li>• neurite óptica ou</li> <li>• síndrome semelhante à esclerose múltipla com sintomas restritos à deficiência sensorial pura ou deficiência cognitiva comprovada</li> </ul>	2
<b>Atividade alta</b>	manifestações clínicas altamente ativas do SNC, como: <ul style="list-style-type: none"> <li>• vasculite cerebral com acidente vascular cerebral ou ataque isquêmico transitório</li> <li>• convulsões ou</li> <li>• mielite transversa ou</li> <li>• meningite linfocítica ou</li> <li>• síndrome semelhante à esclerose múltipla com déficit motor</li> </ul>	3

<b><u>Domínio hematológico</u></b>		
<i>Por favor, atenção:</i>		
<i>- levando em conta anemia, neutropenia e trombocitopenia, somente a citopenia auto-imune deve ser considerada.</i>		
<i>- não avaliar citopenia que não esteja relacionada à doença (como deficiência de vitamina ou de ferro, citopenia induzida por droga, como por exemplo, linfocitopenia associada à ciclofosfamida).</i>		
<b>Nenhuma atividade</b>	ausência de citopenia auto-imune	0
<b>Atividade baixa</b>	citopenia de origem auto-imune com: <ul style="list-style-type: none"> <li>• neutropenia<sup>10</sup> (<math>1000 &lt; \text{neutrófilos} &lt; 1500/\text{mm}^3</math>) ou anemia<sup>11</sup> (<math>10 &lt; \text{Hb} &lt; 12\text{g/dl}</math>) ou trombocitopenia<sup>12</sup> (<math>100.000 &lt; \text{Plt} &lt; 150.000/\text{mm}^3</math>) ou linfopenia (<math>500 &lt; \text{linfócitos} &lt; 1000/\text{mm}^3</math>)</li> </ul>	1
<b>Atividade moderada</b>	citopenia de origem auto-imune com: <ul style="list-style-type: none"> <li>• neutropenia<sup>10</sup> (<math>500 \leq \text{neutrophils} \leq 1000/\text{mm}^3</math>) ou anemia<sup>11</sup> (<math>8 \leq \text{Hb} \leq 10\text{g/dl}</math>) ou trombocitopenia<sup>12</sup> (<math>50.000 \leq \text{Plt} \leq 100.000/\text{mm}^3</math>) ou linfopenia (<math>\leq 500/\text{mm}^3</math>)</li> </ul>	2
<b>Atividade alta</b>	citopenia de origem auto-imune com: <ul style="list-style-type: none"> <li>• neutropenia<sup>10</sup> (neutrófilos <math>&lt; 500/\text{mm}^3</math>) ou anemia<sup>11</sup> (Hb <math>&lt; 8 \text{ g/dl}</math>) ou trombocitopenia<sup>12</sup> (<math>\text{Plt} &lt; 50.000/\text{mm}^3</math>)</li> </ul>	3

<sup>10</sup> Neutropenia sem nenhuma etiologia conhecida.

<sup>11</sup> Anemia com o teste de Coombs positivo e aumento na contagem de reticulócitos ;<sup>12</sup> Trombocitopenia de origem periférica com nenhuma outra etiologia encontrada, ou em caso de dificuldades para realização de identificação de auto anticorpos anti-plaquetas e/ou a presença de megacariócitos de aspirado de medula óssea e/ou anemia auto-imune associada.

<b><u>Domínio biológico</u></b>		
<b>Nenhuma atividade</b>	ausência de qualquer uma das seguintes alterações	0
<b>Atividade baixa</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>pico clonal ou hipocomplementemia C4 ou C3 baixa ou CH50) ou hipergamaglobulinemia ou nível de IgG entre 16 e 20g/L</li> </ul>	1
<b>Atividade moderada</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>presença de crioglobulinemia ou hipergamaglobulinemia ou nível alto de IgG &gt; 20g/L ou início recente de<sup>13</sup> hipogamaglobulinemia ou diminuição recente de nível de IgG (&lt;5g/L)</li> </ul>	2

13 Nos últimos 6 meses

### **CÁLCULO DO ESSDAI**

Multiplicar o peso do domínio pela pontuação para obter o escore do domínio.

O valor final é a soma dos escores de todos os domínios.

ESSDAI < 5 = baixo

ESSDAI ≥ 5 e ≤ 14 = moderado

ESSDAI ≥ 15 = alto

ESSDAI domínio: (peso do domínio)	Pontuação do domínio x peso	Qual manifestação?
Constitucional (3)	X 3 =	
Linfadenopatia (4)	X 4 =	
Glandular (2)	X 2 =	
Articular (2)	X 2 =	
Cutaneo (3)	X 3 =	
Respiratorio (5)	X 5 =	
Renal (5)	X 5 =	
Muscular (6)	X 6 =	
Sistema nervoso periférico (5)	X 5 =	
Sistema nervoso central (5)	X 5 =	
Hematológico (2)	X 2 =	
Biológico (1)	X 1 =	
<b>ESSDAI TOTAL:</b>		

## ANEXO B - EULAR SJÖGREN'S SYNDROME PATIENTS REPORTED INDEX (ESSPRI)

Seu médico pediu que você respondesse algumas perguntas relacionadas com a sua doença. Para responder as perguntas, favor levar em consideração a gravidade de seus sintomas nas piores fases apenas durante as **duas últimas semanas**.

Por favor, assinale a alternativa que melhor descreve sua resposta.  
Por favor, responda todas as perguntas com atenção.

Exemplo:

Nenhuma dor	<table style="display: inline-table; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 0 10px;">0</td> <td style="padding: 0 10px;">1</td> <td style="padding: 0 10px;">2</td> <td style="padding: 0 10px;">3</td> <td style="padding: 0 10px;">4</td> <td style="padding: 0 10px;">5</td> <td style="padding: 0 10px;">6</td> <td style="padding: 0 10px;">7</td> <td style="padding: 0 10px;">8</td> <td style="padding: 0 10px;">9</td> <td style="padding: 0 10px;">10</td> </tr> </table>	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Máximo de dor imaginável
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			

1) O quanto a sua **secura** tem sido grave durante as duas últimas semanas?

Nenhuma secura	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Máximo de ressecamento imaginável
-------------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	--------------------------------------

2) O quanto a sua **fadiga** tem sido grave durante as duas últimas semanas?

Nenhuma fadiga	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Máximo de fadiga imaginável
-------------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	--------------------------------

3) O quanto a sua **dor** (dores nas juntas ou músculos, nos seus braços ou pernas) tem sido grave durante as duas últimas semanas?

Nenhuma dor	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Máximo de dor imaginável
-------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	-----------------------------

Cálculo do ESSPRI = média aritmética dos 3 domínios (secura, dor e fadiga)

Estado de sintoma aceitável se ESSPRI < 5 pontos

Melhora clinicamente importante se diminuição de pelo menos  $\geq 1$  ponto ou 15% do ESSPRI total

**ANEXO C – SJOGREN’S SYNDROME DISEASE DAMAGE INDEX (SSDDI)**

Item	Definição	Score	Pontuação
1) Dano oral/saliva			
a) Prejuízo do fluxo salivar	Fluxo salivar não estimulado (<1,5ml/15min)	1	
b) Perda de dentes	Perda de todos ou quase todos	1	
2) Dano ocular			
a) Prejuízo na lubrificação ocular	Schirmer < 5mm em 5min	1	
b) Anormalidade estrutural	Úlcera em córnea , catarata, blefarite crônica	1	
3) Dano neurológico			
a) Envolvimento de SNC	Envolvimento crônico e estável do SNC	2	
b) Neuropatia periférica	Comprometimento crônico e estável do sistema periférico ou autônomo	1	
4) Dano pleuropulmonar (qualquer um das seguintes alterações): a) Fibrose pleural b) Fibrose intersticial c) Significante dano funcional irreversível	a) Confirmado por imagem b) Confirmado por imagem c) Confirmado por espirometria	2	
5) Dano renal (qualquer um das seguintes alterações): a) Aumento da creatinina ou redução da TFG b) Acidose tubular c) Nefrocalcinose	a) Anormalidade estável e crônica b) Ph urinário > 6,0 e bicarbonato sérico <15 mmoles/litro em 2 exames consecutivos c) Confirmado por imagem	2	
6) Doença linfoproliferativa (qualquer uma das seguintes alterações): a) Linfoma de célula B b) Mieloma múltiplo c) Macroglobulinemia de Waldenström	a) Clínica e confirmação histológica b) Clínica e confirmação histológica c) Clínica e confirmação histológica	5	

**ANEXO D – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA****PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** ANÁLISE DE GALECTINAS 1 E 3 SÉRICAS E SALIVARES EM PACIENTES COM SÍNDROME DE SJÖGREN PRIMÁRIA E SUA ASSOCIAÇÃO COM SINTOMAS EXTRAGLANDULARES

**Pesquisador:** Aysa César Pinheiro

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 12623619.2.0000.8807

**Instituição Proponente:** HOSPITAL DAS CLÍNICAS DE PERNAMBUCO

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 3.420.239

**Apresentação do Projeto:**

Este projeto tem como finalidade compor um banco de dados a partir do qual poderão ser desenvolvidos: Trabalho de Conclusão de Curso (TCC), Iniciação Científica (PIBIC), Monografia de Residência, Dissertação de Mestrado (proposta atual) e Tese de Doutorado. Tem como autora a mestranda Aysa Cesar Pinheiro; orientadora a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Angela Luzia Branco Pinto Duarte e coorientadores os professores doutores Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo Andrea Tavares Dantas. Apresenta como objetivo geral determinar os níveis das galectinas 1 e 3 no soro e na saliva de pacientes com Síndrome de Sjögren Primária e sua associação com manifestações extraglandulares. A Síndrome de Sjögren (SS), representa uma exocrinopatia autoimune, multissistêmica, crônica caracterizada pela hipofunção das glândulas salivares e lacrimais devido à infiltração linfocítica (DHIRAPONG, A et al, 2009, SHIBOSKI, CH et al, 2016), podendo atingir vários órgão além de oferecer alto risco de transformação para linfoma. (VALIM, V et al, 2015). A justificativa e relevância do estudo se dá pelo fato de que “os mecanismos celulares das galectinas ainda são pouco estudados na Síndrome de Sjögren e nesta doença ainda faltam biomarcadores que determinem um perfil dos pacientes que irão desenvolver sintomas extraglandulares e quadros mais graves. Portanto, entender a função das galectinas na obtenção de respostas efetivas adequadas aos antígenos pode revelar importantes papéis para doenças autoimunes como a Síndrome de Sjögren e delinear novas estratégias para

diagnóstico e intervenção terapêutica dessa doença”. Para tal, sugere-se um estudo de coorte analítico, de base hospitalar, com duração de dois anos, amostra estimada de 60 pacientes com um grupo controle de 30 indivíduos sem doença autoimune e neoplasia.

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Geral: Determinar os níveis das galectinas 1 e 3 no soro e na saliva de pacientes com Síndrome de Sjögren Primária e sua associação com manifestações extraglandulares.

Objetivos Específicos:

- Determinar os níveis de galectina 1 e 3 sérica e salivar nos pacientes com SSP;
- Correlacionar os níveis de galectinas 1 e 3 com os índices de atividade de doença ;
- Associar os níveis de galectinas 1 e 3 com os tipos de manifestações extraglandulares mais frequentes (doença renal , SNC, SNP e pulmonar);
- Avaliar a associação entre as galectinas 1 e 3 sérica e salivar com a expressão dessas galectinas no tecido das glândulas salivares menores;
- Associar os níveis de galectinas com o desenvolvimento de neoplasia.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os riscos e benefícios foram descritos na metodologia do projeto e nos TCLE's.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Sem comentários para o momento.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

A pesquisadora apresentou todos os documentos obrigatórios assinados pelos seus representantes legais.

**Recomendações:**

Sem recomendações.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

- Aprovado.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

PROJETO APROVADO - APÓS ANÁLISE PENDÊNCIA PELOS RELATORES

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMACOES_BASICAS_DO_PROJETO_1259594.pdf	14/06/2019 11:57:55	Aysa César Pinheiro	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	projetodemestrado.doc	14/06/2019 11:55:38	Aysa César Pinheiro	Aceito
Investigador	projetodemestrado.doc	14/06/2019 11:55:38	Aysa César Pinheiro	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_impossibilitadosassinarnovo.doc	14/06/2019 11:54:02	Aysa César Pinheiro	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEMaioresnovo.doc	14/06/2019 11:53:34	Aysa César Pinheiro	Aceito
Outros	CARTADERESPOTAASPENDENCIASmestrado.docx	13/06/2019 20:30:47	Aysa César Pinheiro	Aceito
Outros	cartapatologia.pdf	10/06/2019 22:12:36	Aysa César Pinheiro	Aceito
Outros	cartadeanuenciasameatualizada.pdf	25/04/2019 19:43:47	Aysa César Pinheiro	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostoatualizada.pdf	25/04/2019 19:42:33	Aysa César Pinheiro	Aceito
Outros	termoconfidencialidade.pdf	21/04/2019 15:38:38	Aysa César Pinheiro	Aceito
Outros	termocompromisso.pdf	21/04/2019 15:38:09	Aysa César Pinheiro	Aceito
Outros	formularioebeserth.pdf	21/04/2019 15:37:29	Aysa César Pinheiro	Aceito
Outros	cartadeapresentacao.pdf	21/04/2019 15:35:53	Aysa César Pinheiro	Aceito
Outros	cartaanuenciaebeserth.pdf	21/04/2019 15:35:05	Aysa César Pinheiro	Aceito
Outros	CURRICULOAYSA.doc	30/03/2019 10:15:07	Aysa César Pinheiro	Aceito
Outros	CURRICULOANDREA.doc	30/03/2019 10:14:41	Aysa César Pinheiro	Aceito
Outros	curriculomoacyr.docx	30/03/2019	Aysa César Pinheiro	Aceito

		09:06:13		
Outros	CURRICULOANGELA.docx	30/03/2019 09:04:59	Aysa César Pinheiro	Aceito
Outros	DECLARACAOMESTRADO.pdf	30/03/2019 08:58:11	Aysa César Pinheiro	Aceito

As exigências foram atendidas e o protocolo está APROVADO, sendo liberado para o início da coleta de dados. Solicitamos o comparecimento ao NAP para adquirir a Carta de Encaminhamento, caso a pesquisa seja realizada no âmbito do Hospital das Clínicas. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio do Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via “Notificação”, pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link “Para enviar Relatório Final”, disponível no site do CEP/HC/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

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

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

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética os relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). O CEP/HC/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

Recife, 27 de junho de 2019

---

Assinado por **José Ângelo Rizzo**(Coordenador(a))

## ANEXO E- Financiamento da SBR

RECIBO

Recebi do Fundo de Auxílio à Pesquisa e Ensino em Reumatologia da Sociedade Brasileira de Reumatologia, a importância de R\$ 10.304,49 (dez mil, trezentos e quatro reais e quarenta e nove centavos), referentes a "Análise de galectinas 1 e 3 séricas e salivares em pacientes com síndrome de sjogren primária e sua associação com sintomas extraglandulares", aprovado pelo Conselho Consultivo da SBR, conforme as normas do vigentes.

Centro de Estudos de Reumatologia de PE  
CNPJ: 03.039.003/0001-27

São Paulo, 16 de outubro de 2019

*Aysa César Pinheiro*

Dra. Aysa Pinheiro  
Clínica Médica / Reumatologia  
CRM: 19.599

Av. Brigadeiro Luís Antônio, 2466 conj. 92/93/94  
São Paulo - SP - CEP 01402-000  
Telefone: (+55 11) 3289-7165 / 3266-3986 / 3266-9336  
www.reumatologia.org.br - E-mail: sbre@terra.com.br

Presidente: José Roberto Provenza  
Secretário: José Eduardo Martínez  
1º Secretário: Dawton Torígoe  
2º Secretária: Sandra Hiroko Watanabe  
Tesoureiro: Luiz Carlos Latorre  
1º Tesoureiro: Eduardo de Souza Meirelles  
Diretor Científico: Eduardo dos Santos Paiva  
Ouvidor: Cesar Emile Baaklin  
Presidente Eleito: Ricardo Machado Xavier