



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

PAULA REGINA TOCHE DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA GALECTINA 9 NO SORO, SALIVA E
GLÂNDULAS SALIVARES EM PACIENTES PORTADORES DE SÍNDROME DE
SJÖGREN PRIMÁRIA**

Recife

2022

PAULA REGINA TOCHE DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA GALECTINA 9 NO SORO, SALIVA E
GLÂNDULAS SALIVARES EM PACIENTES PORTADORES DE SÍNDROME DE
SJÖGREN PRIMÁRIA**

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

Área de concentração: Fármacos, medicamentos e insumos essenciais para a saúde.

Orientador: Profa. Dra. Angela Luzia Branco Pinto Duarte

Coorientadores: Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo
Profa. Dra. Andrea Tavares Dantas

Recife

2022

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB4/1788

Santos, Paula Regina Toche dos

Avaliação da expressão da galectina 9 no soro, saliva e glândulas salivares em pacientes portadores de Síndrome de Sjögren primária / Paula Regina Toche dos Santos. – 2022.

92 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Angela Luzia Branco Pinto Duarte.

Coorientador: Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo.

Coorientadora: Profa. Dra. Andrea Tavares Dantas.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Recife, 2022.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Doenças imunológicas. 2. Doenças autoimunes. 3. Biomarcadores. I. Duarte, Angela Luzia Branco Pinto (orientadora). II. Rêgo, Moacyr Jesus Barreto de Melo (coorientador). III. Dantas, Andrea Tavares (coorientadora). IV. Título.

616.978

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2022-191

PAULA REGINA TOCHE DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA GALECTINA 9 NO SORO, SALIVA E
GLÂNDULAS SALIVARES EM PACIENTES PORTADORES DE SÍNDROME DE
SJÖGREN PRIMÁRIA**

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

Área de concentração: Fármacos, medicamentos e
insumos essenciais para a saúde

Aprovado em: _10_/_06_/_22_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Angela Luzia Branco Pinto Duarte (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof^a. Dr^a. Valéria Pereira Hernandes (Examinador Interno)
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães- UFPE

Prof^a. Dr^a. Rafaela Silva Guimarães Gonçalves (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof^a. Dr^a. Guilherme Soares Gomes da Silva (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

AGRADECIMENTOS

A realização desta dissertação é resultado de um caminho percorrido no qual pude contar com o apoio de várias pessoas, às quais dedico, com carinho, a concretização dessa obra.

A Deus Pai, criador do céu e da Terra, que me proporcionou o dom da vida, a riqueza de nascer em um lar abençoado, e juntamente com Nosso Senhor Jesus Cristo, Nossa Senhora e toda a população dos anjos e santos, que me acompanham e iluminam essa grande jornada.

À Profa. Dra. Angela Duarte, chefe do Serviço de Reumatologia do HC-UFPE, que me deu a honra de tê-la como minha orientadora, todo o meu profundo, sincero e especial agradecimento, por todas as oportunidades que me foram dadas por ela, por toda a riqueza de conhecimentos compartilhados e pelo exemplo de dedicação à medicina e aos pacientes.

Ao Prof. Dr Moacyr Rego, exemplo de dedicação à vida acadêmica, que me deu a honra de tê-lo como meu coorientador, minha profunda gratidão pelo apoio e pelos ensinamentos nesses anos de convivência.

À Profa. Dra. Andrea Dantas, que me deu a honra de tê-la como coorientadora, e que esteve sempre disponível em todas as etapas desse processo, sendo eternamente uma fonte de inspiração como profissional e como pessoa.

Aos meus amados pais, Paulo e Clara, que sempre me incentivaram a perseguir meus ideais, em todas as etapas da minha formação, e que não medem esforços para me ajudar no que for necessário.

À minha irmã, Ana Ricarda, por ser minha inspiração e ter sido minha primeira grande mestra.

Ao meu marido Marcos, que esteve sempre comigo em todas as etapas desse processo, me auxiliando, incentivando e amparando nos momentos mais desafiadores.

À minha amiga Aysa Pinheiro, por todos os conhecimentos compartilhados no ambulatório da Síndrome de Sjögren, pelo grande apoio durante todo o mestrado, meu agradecimento especial.

À minha amiga Julia Carone, pelo grande apoio durante todo o mestrado, compartilhando grandes momentos durante esses anos.

À Maria Clara e Anderson, os quais proporcionaram a realização dos procedimentos de ELISA e da imuno-histoquímica.

À Profa Dra. Mariana Lira, médica patologista que prontamente colaborou na revisão das lâminas de imuno-histoquímica, trazendo uma grande contribuição para este trabalho.

Ao Prof. Dr. Luis Gueiros, pela parceria no desenvolvimento das atividades e projetos no ambulatório da Síndrome de Sjögren, e todo conhecimento compartilhado nesses anos.

Aos meus amigos e familiares, pelo apoio e torcida para que este trabalho se concretizasse.

Ao secretário do PPGIT, Paulo, pela presteza e disponibilidade em colaborar, tirar dúvidas e orientações em tudo o que se refere ao Programa.

Aos pacientes do ambulatório de Síndrome de Sjögren, pela colaboração na realização deste trabalho e pela confiança depositada na equipe de Reumatologia do HC.

À equipe de reumatologia do HC-UFPE, que colaborou para que este projeto se tornasse realidade e que são fontes de inspiração para minha vida profissional, o meu reconhecimento e sincero agradecimento.

RESUMO

A Síndrome de Sjögren (SSj) é uma exocrinopatia autoimune crônica e sistêmica, e tem na sua patogênese a participação das imunidades inata e adaptativa. Apesar dos avanços, existe ainda uma escassez de biomarcadores específicos de atividade e prognóstico da doença, além da ausência de terapia específica. Nesse contexto, um grupo de proteínas capazes de se ligar de forma reversível a glicanos chamado galectinas vem sendo estudadas, devido à sua capacidade de executar funções biológicas decorrentes dessas ligações, como adesão, proliferação e morte celular e que podem estar relacionadas à fisiopatologia de várias doenças imunomediadas. Foi realizado um corte transversal de 42 pacientes atendidos no ambulatório de Síndrome de Sjögren do HC-UFPE, dos quais foi feita uma análise, através da comparação com controles saudáveis, dos níveis de galectina-9 (gal-9) no sangue e na saliva através da metodologia ELISA, e realizada imunohistoquímica em biópsias de glândula salivar menor. O objetivo do trabalho foi avaliar os níveis de gal-9 nesses pacientes e estabelecer correlações com variáveis que envolvem atividade da doença, exames complementares, uso de medicações e manifestações extra glandulares, além de avaliar a expressão de gal-9 no tecido glandular desses pacientes. Dos 42 pacientes selecionados, 100% eram mulheres com média de idade de 45,8 anos (DP \pm 11,16). A mediana da gal-9 sérica foi de 2264,24pg/ml, comparado a 3622,86pg/ml dos controles com $p=0,047$. Os níveis de gal-9 salivar apresentaram uma mediana maior do que controles saudáveis (613,58pg/ml x 317,59pg/ml) com $p = 0,012$. A correlação entre a gal-9 no soro e na saliva foi positiva quando comparado com o escore de atividade ESSDAI e IgG sérica, e negativa para idade, porém sem significância estatística. Não houve associação estatisticamente significativa entre a gal-9 sérica e salivares e a positividade do anticorpo Anti Ro/SSa, positividade dos testes de securo, uso ou não de medicamentos imunossupressores. Porém, destaca-se que a mediana da gal-9 na saliva dos pacientes com manifestações extra glandulares foi maior do que os que apenas sintomas glandulares (816,91pg/ml x 328,72) com $p=0,002$ e a mediana da gal-9 salivar foi estatisticamente diferente entre os grupos que eram Anti-La/SSb positivos (927,80pg/ml) e negativos (526,00pg/ml) com $p=0,029$. A análise imuno-histoquímica das biópsias de glândula salivar revelou um aumento da expressão de gal-9 nas células ductais e do infiltrado inflamatório. Concluiu-se que os níveis séricos e salivares de gal-9 foram estatisticamente diferentes em relação a controles

saudáveis, a mediana da gal-9 salivar foi maior na saliva de pacientes com manifestações extra glandulares e que existe a expressão de gal-9 em células ductais e do infiltrado inflamatório de pacientes com SSP. Esses achados inéditos abrem caminhos para que novos estudos com essa galectina sejam realizados em pacientes com SSj a fim de proporcionar um melhor entendimento sobre sua participação no desenvolvimento da doença e sua aplicabilidade como biomarcador.

Palavras-chave: Síndrome de Sjögren primária; Galectinas; Biomarcadores.

ABSTRACT

Primary Sjogren's Syndrome is an systemic and chronic autoimmune exocrinopathy, and its pathogenesis involves the participation of innate and adaptive immunities. Despite advances, there is still a paucity of specific biomarkers of disease activity and prognosis, in addition to the absence of specific therapy. In this context, a group of proteins capable of binding reversibly to glycans called galectins has been studied due to their ability to perform biological functions resulting from these bindings, such as adhesion, proliferation and cell death, which may be related to the pathophysiology of several immune-mediated diseases. A cross-section of 42 patients from the Sjögren's Syndrome outpatient clinic of t HC-UFPE, of whom was performed a analysis of the levels of galectin-9 (gal-9) in the blood and saliva of these patients was also performed using the ELISA methodology and immunohistochemistry was performed in minor salivary gland biopsies. The objective was to evaluate the levels of gal-9 in these patients and to establish correlations with variables involving disease activity, complementary exams, use of medications and extra-glandular manifestations, in addition to evaluating the expression of gal-9 in the glandular tissue of these patients. Of the 42 patients selected, 100% were women with a mean age of 45.8 years (SD \pm 11.16). The median serum gal-9 was 2264.24pg/ml compared to 3622.86pg/ml of controls with $p=0.047$. The salivary gal-9 levels had a higher median than healthy controls (613.58pg/ml x 317.59pg/ml) with $p = 0.012$. The correlation between sérum and salivar gal-9 was positive when compared with the ESSDAI activity score and serum IgG, and negative for age, but without statistical significance. There was no statistically significant association between the medians of gal-9 in saliva and serum according to the positivity of the Anti Ro/SSa antibody, positivity of the dryness tests, use or not of immunosuppressive drugs. However, it is noteworthy that the median of gal-9 in the saliva of patients with extra-glandular manifestations was higher than those with only glandular symptoms (816.91pg/ml x 328.72) with $p=0.002$ and the median of gal-9 9 also salivary was statistically different between the groups that were Anti-La/SSb positive (927.80pg/ml) and negative (526.00pg/ml) with $p=0.029$. Immunohistochemical analysis of salivary gland biopsies revealed an increase in gal-9 expression in ductal cells and in the inflammatory infiltrate. It was concluded that the serum and salivary levels of gal-9 were statistically different in relation to healthy controls, the median of salivary gal-9 was higher in the saliva of patients with extra-

glandular manifestations and that there is an expression of gal-9 in cells ducts and inflammatory infiltrate of patients with SSP. These unprecedented findings open the way for further studies with this galectin to be performed in patients with SSP in order to provide a better understanding of its participation in the development of the disease and its applicability as a biomarker.

Keywords: Primary Sjogren's Syndrome; Galectins; Biomarkers.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Membros da família das galectinas de acordo com sua classificação e formação de “lattices”	30
Figura 2 -	Participação das galectinas 1,3 e 9 nas células do timo desencadeando processos de apoptose	32
Figura 3 -	Participação das galectinas sobre células T virgens, células T efectoras e T regulatórias	33
Figura 4 -	Impacto das galectinas nas diferentes funções celulares imunes e suas implicações na inflamação autoimune	34
Quadro 1 -	Perfil de expressão das galectinas nas diferentes doenças reumáticas autoimunes (DRAIs)	35
Figura 5 -	Funções terapêuticas potenciais da Gal-9 e possíveis mecanismos de ação	38
Figura 6-	Marcação positiva de Gal-9 nas células ductais e no estroma de tecido glandular salivar menor de paciente com SSP (A), Controle Negativo (B), Controle Positivo (C).	58

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Níveis séricos (A) e salivares (B) de gal-9 nos grupos SSP e controle.	53
Gráfico 2 -	Níveis séricos da galectina 9 em pacientes portadores de SSP correlacionados com as variáveis ESSDAI(A), Idade(B) e IgG sérica(C), respectivamente.	54
Gráfico 3 -	Níveis salivares da galectina 9 em pacientes portadores de SSP correlacionados com as variáveis ESSDAI(A), Idade(B) e IgG sérica(C), respectivamente.	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Características relacionadas ao sexo, duração dos sintomas, aos testes diagnósticos, autoanticorpos, hemograma, provas inflamatórias, comorbidades, medicações em uso e escore de atividade dos pacientes do grupo SSP.	51
Tabela 2 -	Achados ultrassonográficos das glândulas salivares de pacientes portadores de SSP (n=32).	52
Tabela 3 -	Comparação da mediana da galectina-9 sérica e salivar nos grupos SSP e controle.	53
Tabela 4 -	Correlação de Spearman entre a galectina-9 no soro e na saliva com os resultados das variáveis ESSDAI atual, idade e IgG sérica no grupo SSP.	53
Tabela 5 -	Associação entre os níveis de gal-9 no soro e na saliva, segundo as variáveis relacionadas a autoanticorpos, testes de secura, medicações e achados ultrassonográficos de glândulas no grupo SSP.	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABNT: Associação Brasileira de Normas Técnicas
- ACR/EULAR: do inglês, American College of Rheumatology
- AR: Artrite Reumatóide
- BLK: do inglês, B lymphocyte kinase
- BLR1: do inglês, Burkitt lymphoma receptor 1
- CD: do inglês, cluster of differentiation
- CLR: do inglês, C-type lectin receptors
- CMV: Citomegalovirus
- CXCL: do inglês, C-X-C motif chemokine ligand
- CXCR5 ou: do inglês, C-X-C Motif Chemokine Receptor 5
- DMARDs: Drogas Antirreumáticas Modificadoras de Doença
- DRAI: Doença Reumática Autoimune
- DRCs: Domínio de Reconhecimento de Carboidratos
- EBV: Epstein Barr Virus
- ELISA: do inglês: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
- ES: Esclerose Sistêmica
- ESSDAI: do inglês, EULAR SJÖGREN'S SYNDROME DISEASE ACTIVITY INDEX
- ESSPRI: do inglês, EULAR SJÖGREN'S SYNDROME PATIENTS REPORTED INDEX
- FOXP3: do inglês, Forkhead box protein P3
- Gal-7: Galectina 7
- Gal-9: Galectina 9
- Gals: Galectinas
- HC-UFPE: Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco
- IL: interleucina
- IRF5: do inglês, Interferon Regulatory Factor 5
- LES: Lúpus Eritematoso Sistêmico
- LINAT: Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas

MHC: do inglês, major histocompatibility complex

NFκB: do inglês, nuclear factor kappa beta

OMERACT: Outcome Measures in Rheumatology

PAD-4: peptidil arginina deaminase 4

PBS/BSA: do inglês, Phosphate Buffered Saline/ bovine serum albumin

PCR: Proteína C Reativa

RRPs: receptores de reconhecimento de padrões (RRPs),

SIGLECs: do inglês, Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectins

SSDDI: do inglês, SJOGREN'S SYNDROME DISEASE DAMAGE INDEX

SSj: Síndrome de Sjögren

SSP: Síndrome de Sjögren Primária

STAT4: do inglês, Signal transducer and activator of transcription 4

TCR: do inglês, T-cell receptor

TIM-3: do inglês, T cell immunoglobulin domain, mucin domain-3

TLR: do inglês, Toll Like Receptor

TNF-α: do inglês, tumor necrosis factor alpha

TNIP-1: do inglês, TNFα-induced protein 3- (TNFAIP3-) interacting protein 1

UFPE: Universidade Federal de Pernambuco

USG: Ultrassonografia

VHS: Velocidade de hemossedimentação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1 SÍNDROME DE SJÖGREN	22
2.1.1 Definição, epidemiologia e patogênese	22
2.1.2 Manifestações Clínicas	24
2.1.3 Exames Complementares	24
2.1.4 Critérios Classificatórios	26
2.1.5 Diagnóstico diferencial	27
2.1.6 Índices relacionados à Síndrome de Sjögren	27
2.1.7 Tratamento	27
2.1.8 Biomarcadores	28
2.2 GALECTINAS	28
2.2.1 Galectina-9	36
3 JUSTIFICATIVA	42
4 OBJETIVOS	43
4.1 OBJETIVO GERAL	43
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
5 MATERIAIS E MÉTODOS	44
5.1 TIPO DE ESTUDO	44
5.2 LOCAL DA PESQUISA	44
5.3 AMOSTRA DA PESQUISA	44
5.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	44
5.4.1 Pacientes	44
5.4.2 Controles	44
5.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	44
5.5.1 Pacientes	44

5.5.2 Controles	45
5.6 INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS	45
5.7 PROCEDIMENTO PARA COLETA DE AMOSTRAS	46
5.8 VARIÁVEIS ANALISADAS	46
5.8.1 Análise das amostras de sangue e de saliva pelo ELISA	46
5.8.2 Análise Imunohistoquímica de tecido de glândula salivar menor	47
5.8.3 Ultrassonografia de glândulas salivares	49
5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
5.10 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	49
6 RESULTADOS	51
6.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	51
6.2 ACHADOS RELACIONADOS À GAL-9 SÉRICA E SALIVAR.....	53
6.3 ACHADOS DESCRITIVOS DA IMUNOHISTOQUÍMICA DA GAL-9	57
7 DISCUSSÃO	60
8 CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS	65
APÊNCIDES	72
APÊNDICE A – FICHA CLÍNICA DE PACIENTES COM SÍNDROME DE SJOGREN	72
APÊNDICE B – FICHA DE CLASSIFICAÇÃO DA ULTRASSONOGRAFIA DAS GLÂNDULAS SALIVARES	80
APÊNDICE C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)	81
ANEXOS	82
ANEXO A – CRITÉRIOS CLASSIFICATÓRIOS PARA SÍNDROME DE SJÖGREN DO GRUPO CONSENSO AMERICANDO-EUROPEU DE 2002	82
ANEXO B – CRITÉRIOS CLASSIFICATÓRIOS PARA SÍNDROME DE SJÖGREN DO COLÉGIO AMERICANO DE REUMATOLOGIA DE 2012	83
ANEXO C – CRITÉRIOS COLÉGIO AMERICANO/LIGA EUROPÉIA CONTRA O REUMATISMO DE 2016	84
ANEXO E – SJOGREN’S SYNDROME DISEASE DAMAGE INDEX (SSDDI)	85

ANEXO F – Eular Sjögren’s Syndrome Disease Activity Index	86
ANEXO F – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	90

1 INTRODUÇÃO

A Síndrome de Sjögren (SSj) é definida como uma epitelite autoimune, na qual se observa a presença de anticorpos e infiltração linfocítica das glândulas exócrinas, levando ao desenvolvimento de sintomas clássicos, como xerostomia e xeroftalmia. Foi descrita inicialmente em 1982 por Mikulicz, o qual estudou pacientes que apresentavam aumento de glândulas salivares e lacrimais e achados histopatológicos semelhantes e, alguns anos mais tarde, pelo sueco Henrik Sjögren, que descreveu a ceratoconjuntivite seca em mulheres pós menopausa, preferencialmente, que apresentavam artrite deformante, e caracterizada por falência da função da glândula lacrimal e salivar (HOCHBERG, 2015). Por se tratar de uma doença sistêmica, além do epitélio glandular, outros tecidos podem ser acometidos, notadamente o articular, hematológico, renal, pulmonar e neurológico (BAER, 2021a).

Atribui-se o termo Síndrome de Sjögren Primária (SSP), quando não existe evidência de outra doença reumática autoimune. Quando isso acontece, geralmente em associação com Artrite Reumatoide (AR), Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES), nomeia-se como Síndrome de Sjögren secundária ou associada (RISCHMUELLER; TIEU; LESTER, 2016).

A prevalência da SSj é estimada em cerca de 0,17% na população brasileira, porém esses dados podem estar subestimados, haja vista serem baseados em um único estudo epidemiológico disponível. Acomete principalmente pessoas do sexo feminino, numa relação de 10 mulheres para cada 1 homem, com a média de idade ao diagnóstico variando entre 40 e 60 anos (VALIM et al., 2013). Sua fisiopatologia está associada a mecanismos ainda não completamente estabelecidos, mas que envolvem a participação das imunidades inata e adaptativa, de vírus como o Epstein barr vírus (EBV) e o citomegalovírus (CMV), além de outros fatores, como hormonais e genéticos (FIRESTEIN; KELLEY, 2013).

O diagnóstico pode ser estabelecido associando-se o quadro clínico de secura oral e/ou ocular por mais de 3 meses, com achados objetivos de hipofunção glandular, sendo os mais comuns o teste de Schirmer e o Fluxo Salivar. Exames de imagem como a Ultrassonografia (USG) e Cintilografia de glândulas salivares, dentre outros, são também utilizados na prática clínica, e caracterizam, de forma indireta ou direta, o grau de função glandular (BAER, 2021b). A biópsia de glândula salivar representa o exame padrão ouro para a classificação da doença, com sensibilidade que varia de 63,5 a 93,7% e especificidade 61,2% a 100% e seu achado principal se caracteriza

por uma sialoadenite crônica focal com predomínio de células mononucleares (BERARDICURTI et al., 2021). Sobre os testes sorológicos, os principais anticorpos são o Anti-Ro/SSa e Anti-La/SSb, os quais se dirigem contra ribonucleoproteínas intracelulares, e são encontrados em cerca de 60 a 80% dos pacientes (BAER, 2021b). Para o tratamento, utilizam-se medicações tópicas como colírios lubrificantes e substitutos de saliva para o tratamento dos sintomas secos e, a depender da gravidade e refratariedade dos sintomas, preconiza-se o uso de imunomoduladores e imunossupressores, sendo os mais utilizados: hidroxiquina, metotrexate, azatioprina e rituximabe (RAMOS-CASALS et al., 2020).

Entretanto, similarmente ao que acontece em outras doenças reumáticas autoimunes, apesar dos avanços no manejo desses pacientes, estima-se que mais de 50% dos pacientes não alcançam um controle satisfatório da doença. A fim de resolver essa lacuna, faz-se necessário abordagens personalizadas, baseando-se no perfil do paciente, suas características clínicas, fatores de mau prognóstico e o desenvolvimento de terapias seletivas (GIACOMELLI et al., 2019). Nessa perspectiva, é grande utilidade o uso dos biomarcadores.

No caso da SSj os principais biomarcadores sorológicos utilizados são os autoanticorpos Anti-Ro/SSa e Anti-La/SSb, os quais são úteis para o diagnóstico e também preditores da doença, uma vez que podem ser detectados em até cerca de 20 anos antes do aparecimento de sintomas (RISCHMUELLER; TIEU; LESTER, 2016). Já para acompanhamento de atividade de doença, lança-se mão principalmente da Velocidade de Hemossedimentação (VHS), β 2-Microglobulina e a Imunoglobulina G, porém nenhuma dessas é específica para a Síndrome de Sjögren (MANFRÈ et al., 2020).

Mais recentemente, foram propostos novos biomarcadores para a SSP, como anticorpos anti-receptor muscarínicos, cujo alvo é o receptor muscarínico tipo 3 (M3R), o qual, uma vez agredido, pode levar à hipossecreção salivar. A calprotectina salivar, encontrada em neutrófilos, é outro biomarcador que mostrou forte correlação com sinais clínicos da doença; e, por fim, as proteínas carbamiladas, cuja elevação se mostrou associada a uma maior infiltração linfocítica focal no parênquima glandular (JONSSON et al., 2018).

Na análise histopatológica de biópsias de glândula salivar menor, o grau de infiltrado inflamatório e a presença de centros germinativos, podem ser utilizados não

só como marcadores de atividade de doença, mas também como prognóstico para o desenvolvimento de linfoma(KROESE; HAACKE; BOMBARDIERI, 2018).

Nos últimos anos, marcadores diagnósticos menos invasivos vêm sendo estudados como alternativas à biópsia e a exames sorológicos. A ultrassonografia de glândulas salivares, por exemplo, vem despontando como um método promissor para diagnóstico, prognóstico e avaliação de atividade de doença, sendo observado que, quanto maior a perda da homogeneidade glandular, observada na USG, maior grau de inflamação glandular, maior risco de apresentar sinais e sintomas extra-glandulares e alterações na biópsia, como a presença de centros germinativos (THEANDER; MANDL, 2014).

Sobre marcadores salivares, uma recente revisão sistemática identificou estudos de análise proteômica da secreção salivar e relatou proteínas como B2microglobulina, calprotectina, anidrase carbônica e lectina-5 semelhante à imunoglobulina de ligação ao ácido siálico, como marcadores promissores na SSj (JUNG et al., 2021).

Nessa perspectiva de desenvolvimento de biomarcadores, um grupo de proteínas conhecidas como galectinas vêm sendo estudadas, por sua promissora utilidade, não só no campo das doenças autoimunes, como também nas áreas de oncologia, alergia e infecção. Até o momento, foram descritos 15 diferentes membros desta família, os quais foram denominados de acordo com a ordem de descoberta(IKEMORI et al., 2014). Eles são expressos em diferentes tecidos e células imunes e não imunes, desempenhando funções celulares fisiológicas e patológicas de proliferação, adesão, migração e invasão celular e que podem amplificar ou atenuar programas de sinalização imunológica e vascular, através de interações com receptores glicosilados (CERLIANI et al., 2017; XU; HUANG; HUANG, 2021)

Mendez-Huergo e cols estudaram as galectinas 1 e 3 (gal-1 e gal-3) no soro de pacientes com AR em uso de DMARDs (drogas antirreumáticas modificadoras de doença) e/ou corticóides, sendo encontrado que a gal-1 estava aumentada, em comparação com controles saudáveis e teve correlação com VHS. Já em relação à gal-3, foi visto que estava reduzida nos pacientes, comparados com controles, concluindo-se que os níveis dessas proteínas podem ser importantes para diferenciar pessoas saudáveis de pacientes com AR (MENDEZ-HUERGO et al., 2019). A galectina-3 também foi encontrada em maior quantidade no soro e também na saliva

de pacientes com insuficiência cardíaca, demonstrando uma utilidade clínica potencial nessa patologia (ZHANG et al., 2016b).

Xu e cols, num trabalho recente, revisaram o perfil de expressão de galectinas em doenças autoimunes e pode-se analisar a participação da galectina-9 (gal-9) em trabalhos com LES, AR e Esclerose Sistêmica (ES), sendo observado que ela se encontra aumentada no soro desses pacientes. Na Síndrome de Sjogren, por sua vez, não houve a descrição de trabalhos utilizando essa galectina (XU; HUANG; HUANG, 2021). Até o momento, são escassos os estudos avaliando galectina-9 no soro de pacientes com SSP (VAN DEN HOOGEN et al., 2018a) e não são conhecidos trabalhos que analisaram sua expressão na saliva.

Dessa forma, a escassez de biomarcadores que auxiliem no diagnóstico e avaliação clínica dos pacientes com SSP, a falta de estudos que examinem o comportamento da gal-9 nesse público, somadas às evidências científicas que demonstram sua expressão alterada em outras doenças reumáticas autoimunes, fundamentam o racional para a realização do presente estudo, no qual avaliamos os níveis de gal-9 em pacientes portadores de SSP, buscando uma melhor compreensão dessa galectina nesse grupo de pacientes e visando identificação de possíveis biomarcadores.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SÍNDROME DE SJÖGREN

2.1.1 Definição, epidemiologia e patogênese

A Síndrome de Sjögren é uma patologia inflamatória sistêmica, de natureza autoimune, caracterizada por uma infiltração linfocítica das glândulas exócrinas, principalmente salivares e lacrimais. Tal agressão leva ao desenvolvimento de sintomas como xerostomia e xeroftalmia, associados à presença de autoanticorpos específicos (HOCHBERG, 2015; VALIM et al., 2013). A SSj apresenta uma incidência de 4/100.000 habitantes, com prevalência mundial variando entre 0,1 e 4,8% e a idade ao diagnóstico se dá principalmente entre 40 e 60 anos, numa relação mulher/homem de 10/1 (BOTH et al., 2017; HOCHBERG, 2015).

Em sua patogênese, descreve-se a participação de fatores genéticos, epigenéticos e ambientais. Do ponto de vista genético, encontramos a presença do complexo principal de histocompatibilidade (MHC; do inglês, *major histocompatibility complex*) classe II (principalmente HLA-DQ e HLA-DR, com os haplótipos HLA-DR2, HLA-DR3 no locus DRB1). Outros genes fora do HLA incluem os genes do IRF5 (do inglês: interferon regulatory factor 5) e TNIP (do inglês: TNFAIP3 interacting protein 1), que estão envolvidos com imunidade inata e os genes BLK B (do inglês: lymphocyte kinase B), STAT4 (do inglês: signal transducer and activator of transcription 4), IL-12A (interleucina 12A) e CXCR5 (do inglês: chemokine receptor type 5) ou BLR1 (do inglês: Burkitt lymphoma receptor 1), envolvidos com a imunidade adaptativa (RISCHMUELLER; TIEU; LESTER, 2016). Do ponto de vista epigenético, mecanismos de metilação do DNA, acetilação de histonas e modulação da expressão gênica de microRNAs são descritos na fisiopatologia da síndrome (BAER; DESHMUKH, 2019).

Dos fatores ambientais, postula-se que a persistência de alguns vírus sialotrópicos possa levar à perda dos mecanismos de autotolerância e desenvolvimento de resposta imune evidente, sendo os principais o EBV e CMV (BAER, DESHMUKH, 2019; HOCHBERG, 2015).

Em relação ao sexo, a maior frequência da doença em pacientes do sexo feminino aponta para um mecanismo dependente do estrogênio, o qual protege contra a inflamação das glândulas salivares, e cuja ausência leva à apoptose de células epiteliais, semelhante ao que acontece em outras doenças reumáticas

imunomediadas como Artrite Reumatóide e Lúpus Eritematoso Sistêmico. Diferentemente do LES, no qual a idade de aparecimento dos sintomas geralmente é na fase reprodutiva, na SSj a idade de aparecimento dos sintomas é no período perimenopausa. Baixas concentrações dos hormônios androgênicos dehidroepiandrosterona e diidrotestosterona também são encontrados em pacientes com essa patologia, demonstrando um papel protetor desses hormônios (BRANDT et al., 2015; POROLA et al., 2008).

O dano às células epiteliais da glândula salivar induz à apoptose e expressão dos antígenos SSa (ou Anti-Ro), porém, esse antígeno pode se associar a complexos na superfície celular “blindando-se” do processo apoptótico. Ao interagir com células dendríticas locais e células B, pode estimular os receptores TLR (do inglês: toll like receptors) intracitoplasmáticos e estimular a transcrição de genes relacionados aos interferons (IFNs). Pode haver também ativação de células dendríticas plasmocitóides diretamente por vírus ou fatores ambientais. A ativação do interferon I (IFN-I) vai desencadear a resposta imune adaptativa através da ativação de células B e T, e indução da produção de citocinas, incluindo interferon gama (IFN- γ), IL-17 e o fator de ativação de células B, conhecido como BAAF (do inglês: B cell activating factor) ou Blys (do inglês: B Lymphocyte Stimulator) (BAER; DESHMUKH, 2019).

O resultado desses fatores desencadeia um processo de autorreatividade de células B, produção de anticorpos e inflamação crônica das glândulas salivares e de outros tecidos extraglandulares. Também podemos observar fenômenos como a formação imunocomplexos com deposição nos tecidos (como na vasculite crioglobulinêmica) e linfoproliferação extra nodal. Em associação com outros fatores de risco, a estimulação crônica de células B pode levar ao aparecimento de linfomas (BAER; DESHMUKH, 2019).

A lesão patológica da SSj constitui-se de um infiltrado linfocítico nas glândulas lacrimais e salivares, existindo um predomínio de céls T CD4+ (do inglês: cluster of differentiation-4) nos pequenos infiltrados e células B nos maiores infiltrados, onde se observa maior destruição dos ácinos e perda da arquitetura. Esses infiltrados linfóides periductais podem desenvolver estruturas que se assemelham a órgãos linfóides secundários, chamados de centros germinativos “like”, os quais apresentam um microambiente altamente favorável para a produção de anticorpos. (HOCHBERG, 2015). O perfil de citocinas encontrado no infiltrado inflamatório é caracterizado por um perfil Th1/Th17, com produção de IL-2, IL-10 e IFN γ por células CD4+ e IL-17 por

células Th17, além disso, as células epiteliais “ativadas” podem secretar IL-1, TNF- α (do inglês: tumor necrosis factor alpha) e IL-6 e BAFF (FOX et al., 1994).

Como consequência de uma estimulação crônica de células B, pacientes com Síndrome de Sjögren apresentam um risco que varia de 5 a 44x maior de desenvolver linfoma, sendo os 2 mais frequentes o Linfoma Não Hodgkin de Zona Marginal e o Linfoma MALT. Esse risco é maior do que se observa em outras doenças reumáticas (BENDE et al., 2020). Os maiores fatores de risco para o desenvolvimento de doenças linfoproliferativas são parotidite persistente e a presença de estruturas semelhantes a centros germinativos e alto escore de foco na biópsia (BAER, 2021a).

2.1.2 Manifestações Clínicas

O padrão de acometimento da Síndrome de Sjögren pode variar desde a síndrome sicca, mais frequente, até a presença de sintomas sistêmicos graves. A síndrome sicca ocorre em cerca de 95% dos pacientes e consiste na secura dos olhos (xerofthalmia), da cavidade oral (xerostomia) e da faringe e laringe. Sintomas de secura na vagina também são frequentes em mulheres. Como consequência dessa secura de mucosas podemos encontrar candidíase oral, cáries dentárias, doença periodontal, fotossensibilidade, infecções oculares, tosse, dispneia e rouquidão, dentre outros, os quais podem comprometer sensivelmente a qualidade de vida dos acometidos. Dentre os sintomas constitucionais, o mais importante deles é a fadiga, a qual ocorre em cerca de 70% dos pacientes, sendo sucedido por dor crônica, sintomas depressivos e ansiosos (BOTH et al., 2017).

Além do acometimento de glândulas exócrinas e dos sintomas constitucionais, por se tratar de uma doença sistêmica, cerca de 71% dos pacientes apresentam manifestações extraglandulares, estas incluem cutâneas, articulares, pulmonares, cardiorrespiratórias, gastrointestinais, neurológicas, hematológicas e vasculares. Dessas, o mais frequente é a artralgia, sendo as demais variáveis de acordo com a população. É importante ressaltar a fibromialgia como condição associada muito frequente nessa população (até 30% dos pacientes) e, das doenças reumáticas imunomediadas, a Artrite Reumatóide e o LES são os mais observados.

2.1.3 Exames Complementares

Para auxiliar no diagnóstico da SSj, pode-se lançar mão de exames laboratoriais, incluindo a pesquisa de autoanticorpos, exames de imagem, biópsia

glandular e testes de securo. Dos exames laboratoriais, as alterações mais frequentes são leucopenia, trombocitopenia, anemia, hipergamaglobulinemia e consumo de complemento, numa frequência variável de acordo com a população (HOCHBERG, 2015). Como já dito anteriormente, os principais biomarcadores sorológicos utilizados são os autoanticorpos contra ribonucleoproteínas Anti-Ro/SSa e Anti-La/SSb, os quais são úteis não só para o diagnóstico também preditores da doença (LEE et al., 2019).

Sobre os exames de imagem, a cintilografia e a ultrassonografia (USG) de glândulas salivares são os mais frequentemente utilizados. A cintilografia se refere a um método de medicina nuclear no qual é injetado contraste venoso para análise da produção e eliminação salivar (SHINJO; MOREIRA, 2020).

Através da USG de glândulas salivares, é feita uma análise do grau de heterogeneidade do parênquima das glândulas parótidas e submandibulares, sendo que, quanto maior a heterogeneidade da glândula, maior o seu comprometimento. Ele tem sido demonstrado como uma boa ferramenta na detecção de alterações estruturais do parênquima glandular desde 1988 (GOULES; TZIOUFAS, 2014). Suas vantagens são o fato de ser não invasivo, não ionizante, acessível e de considerável sensibilidade (45,8 a 91,6%) e especificidade (73 a 98,1%) para o diagnóstico da SSj (VASCONCELOS, 2019). Sua principal desvantagem é falta de padronização em relação a equipamentos, sondas utilizadas, escore de classificação dos achados parenquimatosos e critérios de inclusão nos estudos (JOUSSE-JOULIN et al., 2016).

A sialografia já foi um método muito utilizado no passado, porém, por se tratar de um exame invasivo e ter acurácia diagnóstica comparável com a da USG, vem sendo menos realizado atualmente (SONG; LEE; LEE, 2014; TAKAGI et al., 2010). Tomografia e ressonância nuclear magnética de glândulas salivares são métodos menos utilizados para diagnóstico e mais usados em contextos de investigação de transformação maligna para linfoma (JOUSSE-JOULIN; COIFFIER, 2020).

A biópsia de glândula salivar menor é considerada o padrão-ouro para o diagnóstico da doença, cujo achado mais característico é a presença de sialoadenite linfocítica focal, principalmente nas áreas periductais e/ou perivasculares, além de estruturas semelhantes a centros germinativos, apresentando sensibilidade e especificidade superiores a 80% e alto valor preditivo positivo (VITALI et al., 1994). Em 1974, Greenspan e Daniels propuseram o conceito de Escore de foco em biopsias de glândula salivar menor, sendo considerado 01 foco o equivalente a 01 agregado

celular de 50 ou mais células mononucleares em uma área de 4mm². Escores de foco > ou = a 1 são sugestivos de SSj (FISHER et al., 2017)

Apesar da boa acurácia, trata-se de um método invasivo e existem críticas à falta de padronização na interpretação dos achados histológicos (KROESE; HAACKE; BOMBARDIERI, 2018).

A avaliação das securas ocular e oral é feita utilizando-se principalmente os testes de Schirmer e a sialometria. O primeiro trata-se de um teste onde é colocada uma fita estéril milimetrada no saco conjuntival inferior e se mede a extensão da umidificação do papel, sendo considerado alterado quando essa medida é menor que 5mm após 5 minutos. Outros testes comuns para olho seco são o BUT (do inglês: break up tears) e o teste de Rosa Bengala (WHITCHER et al., 2010). Para avaliação da secura oral pode ser realizada a sialometria, na qual mede-se a saliva escoada passivamente durante 15 minutos. Ele pode ser feito após estímulos para produção de saliva (como cubos de parafina). Considera-se um resultado positivo ou alterado quando essa taxa é menor que 0,1ml/min (TREVISANI et al., 2019).

2.1.4 Critérios Classificatórios

Tal qual observamos em outras doenças reumáticas autoimunes, foram desenvolvidos e aperfeiçoados ao longo do tempo, pelas sociedades de reumatologia, critérios para a classificação da SSj. Os mais utilizados são os critérios do Consenso do Grupo americano europeu de 2002, cujos itens envolvem a presença de sintomas de securas oral e ocular, testes que evidenciem essas securas, biópsia de glândula salivar menor e os anticorpos anti-Ro/SSa ou anti-La/SSb e considera-se diagnóstico para SSP quando 4 dos 6 itens são positivos (ANEXO A), (VITALI; BOMBARDIERI; JONSSON, 2002). Os critérios do Colégio Americano de Reumatologia 2012 incluem os anticorpos Anti-Ro/SSa, Anti-La/SSb, biópsia de glândula salivar apresentando sialoadenite linfocítica focal e presença de ceratoconjuntivite seca, considerando diagnóstico quando presente pelo menos 2 dos 3 critérios (ANEXO B) ,(CORNEC et al., 2014). E o último critério, do *American College of Rheumatology/ European League Against Rheumatism (ACR/EULAR)* de 2016, o qual atribui pontuações aos achados de biópsia, positividade do Anti-Ro/SSa e testes de secura e exige-se uma pontuação maior ou igual a 4 para sugerir o diagnóstico de SSP (ANEXO C), .

2.1.5 Diagnóstico diferencial

Muitas são as situações que podem levar à síndrome sicca, sendo as mais frequentes o hipoestrogenismo e o uso de medicamentos como antidepressivos, anti-histamínicos, anticolinérgicos e diuréticos. Em se tratando de parotidite crônica bilateral, faz-se mister a investigação de HIV, hepatite C, doença relacionada à IgG4, amiloidose, tuberculose, sarcoidose, diabetes e alcoolismo (RISCHMUELLER; TIEU; LESTER, 2016).

2.1.6 Índices relacionados à Síndrome de Sjögren

Para um melhor acompanhamento dos pacientes, pode-se lançar mão de instrumentos validados para avaliar a atividade da doença (ESSDAI- EULAR Sjögren's Syndrome Disease Activity Index), o índice de dano (SSDDI- Sjögren's Syndrome Disease Damage Index) e o escore de percepção dos sintomas (ESSPRI- EULAR Sjögren's Syndrome Patients Reported Index). Esses índices são importantes para auxiliar na compreensão da gravidade da doença, resposta à terapêutica e caráter da evolução dos sintomas (agressivo ou indolente). O primeiro se trata de uma tabela contendo os domínios que podem ser acometidos pela síndrome, sendo atribuída uma pontuação de acordo com a gravidade de cada sintoma apresentado, e o somatório final sugere o grau de atividade da doença (leve se o escore for menor < 5, moderado se escore estiver entre 5 e 13 ou alto se >14) (SEROR et al., 2015) . Já o segundo se trata de um escore que enumera possíveis prejuízos causados pela doença de acordo com os órgãos ou sistemas, como perdas dentárias, desenvolvimento de fibrose ou linfoma. (VITALI et al., 2007), e o último trata-se de um questionário autoaplicável de percepção dos sintomas de fadiga, dor e secura (PAGANOTTI et al., 2015).

2.1.7 Tratamento

O tratamento da SSj é direcionado de acordo com o órgão acometido e com a gravidade do sintoma, variando desde medicações tópicas, como os substitutos de saliva e colírios lubrificantes, utilizados para o alívio da xerostomia e xeroftalmia, até corticoides, imunossupressores, drogas modificadoras de doença sintético convencionais e terapia biológica, que são utilizados principalmente quando são observados sintomas extra-glandulares (RAMOS-CASALS et al., 2012; RISCHMUELLER; TIEU; LESTER, 2016)

2.1.8 Biomarcadores

Nas últimas décadas, muitos esforços têm sido feitos para se caracterizar com mais profundidade a doença e suas vias patogênicas e buscar novos biomarcadores que contribuam para um diagnóstico precoce, melhor avaliação prognóstica e permitam uma intervenção terapêutica mais precisa (MANFRÈ et al., 2020).

Os biomarcadores sorológicos clássicos utilizados para o diagnóstico são os autoanticorpos Anti-Ro/SSa e Anti-La/SSb. Ainda que não específicos, são os anticorpos mais frequentes na SSP, com uma prevalência variando de 50-90% e 25-60%, respectivamente (SHINJO; MOREIRA, 2020). Já para acompanhamento de atividade de doença, lança-se mão principalmente do VHS, β 2-Microglobulina e a Imunoglobulina G, porém, nenhuma dessas é específica para a SSj (MANFRÈ et al., 2020).

Na análise histopatológica de biópsias de glândula salivar menor, o grau de infiltrado inflamatório, estimado pelo escore de foco, e a presença de centros germinativos também podem ser utilizados não só como marcadores de atividade de doença, mas também como prognóstico para o desenvolvimento de linfoma (KROESE; HAACKE; BOMBARDIERI, 2018).

Novos biomarcadores para a SSP são o anticorpo anti receptor muscarínico tipo 3 (M3R), o qual parece estar relacionado a atividade exócrina glandular e hipossecreção salivar. Sobre marcadores salivares, uma recente revisão sistemática identificou estudos de análise proteômica da secreção salivar e relatou proteínas como B2microglobulina, calprotectina, anidrase carbônica e lectina-5 semelhante à imunoglobulina de ligação ao ácido siálico, como marcadores promissores na SSj (Jung et al., 2021).

2.2 GALECTINAS

As Galectinas (Gals) são proteínas da família das lectinas, que têm por principal característica a capacidade de se ligarem de forma reversível a beta-galactosídeos, através de regiões conhecidas como domínios de reconhecimento de carboidratos (DRCs), exibindo uma variedade de funções biológicas decorrentes dessas ligações, como adesão, agregação, proliferação e morte celular (NÓBREGA, 2011 (HIRASHIMA et al., 2002; KIM et al., 2013). As galectinas se diferenciam de outras lectinas que também participam do sistema imune, como as lectinas tipo C (do inglês CLR: C-type lectin receptors) e lectinas IgG like ligadoras de ácido siálico (do inglês SIGLECs: sialic

acid-binding immunoglobulin-like lectins), pelo fato de essas outras serem encontradas principalmente no ambiente transmembrana e as galectinas serem solúveis nos meios intra e extra-celular (CERLIANI et al., 2017).

Os primeiros estudos com lectinas remontam ao século XIX, pelo pesquisador Stillmark, o qual, utilizando o extrato de semente da mamona *Ricinus Communis*, a ricina, observou a formação de aglutinados de hemácias de sangue animal. Esse processo ocorreu devido à presença de ligações cruzadas reversíveis dessa lectina com receptores situados na membrana das células sanguíneas, formando aglomerados (NÓBREGA, 2011).

Os glicanos, por sua vez, são oligômeros (carboidratos que contém mais de um carbono) constituintes comuns de células e que podem se apresentar associados a proteínas e lipídios, formando glicoproteínas ou glicolipídios. A existência de mais de 20 subunidades de monossacarídeos diferentes disponíveis para a construção de oligossacarídeos, abundância de pontos de contato para interações intermoleculares e a capacidade dos radicais hidroxila servirem como aceptores para alongamento e ramificações da cadeia são alguns dos fatores que justificam a infinidade de elementos dessa classe. Cada um desses carboidratos pode assumir configurações tridimensionais únicas, como se fossem “palavras”, que são legíveis para as proteínas com as quais interagem. A esse conjunto de “palavras”, ainda não completamente decifrado pela glicobiologia, dá-se o nome de “código do açúcar” (CERLIANI et al., 2017; GABIUS; ROTH, 2017; NELSON; COX, 2018). Essas biomoléculas são uma das principais ferramentas utilizadas pelas células para codificar informações importantes sobre o destino de proteínas, interações célula-célula, diferenciação celular, desenvolvimento de tecidos e sinalização extracelular (GABIUS; ROTH, 2017).

Até o momento foram descritos 15 diferentes membros desta família, os quais foram denominados de acordo com a ordem de descoberta (IKEMORI et al., 2014). Sua classificação varia de acordo com a quantidade de DRCs: galectinas prototípicas, as quais apresentam apenas um DRC: (i) gals 1,2,5,7,10,11,13,14 e 15; (ii) galectinas do tipo repetições em série (“*tandem repeat*”), que apresentam 2 DRCs conectados por um peptídeo ligante, como as gals 4,8,9 e 12; e (iii) galectinas tipo quimera, que contêm um DRC ligado a um domínio diferente da lectina, representada pela galectina 3 (Figura 1) (YANG; RABINOVICH; LIU, 2008; TOSCANO et al., 2018).

A produção das gals acontece no citosol, e, posteriormente, podem ser translocadas para o núcleo, onde interagem com ribonucleoproteínas do spliceossomo ou podem ser secretadas para o espaço extracelular, onde vão interagir com outros glicanos (LI et al., 2020). Sua distribuição pode ser ubíqua, como, por exemplo, as gals 1, 3 e 9, ou limitada a determinados tecidos, como as gals 2 e 4. (SALAMANNA et al., 2019; VILAR et al., 2019). No caso da galectina-7, ela é preferencialmente encontrada no tecido epitelial (CHEN et al., 2021)

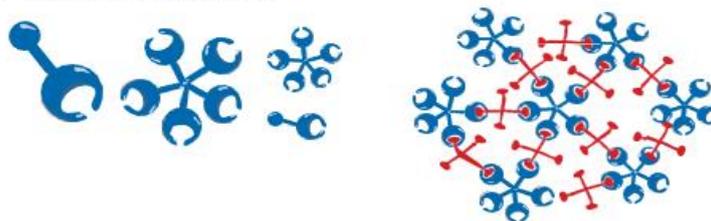
A ligação de galectinas a carboidratos simples leva a interações de baixa afinidade, entretanto, a multivalência de galectinas e glicanos resulta em ligações de alta avidéz que podem resultar em ligações cruzadas, reorganização e reagrupamento de glicoproteínas e glicolipídios, formando uma rede dinâmica denominada “lattices”, como mostrado na figura 1 (CERLIANI et al., 2017). Sua função biológica pode variar a depender do tipo celular, tecidual, da sua concentração, da propriedade de redução e oxidação do meio intra e extra-celular e da disponibilidade de ligantes de carboidratos (VASTA, 2020).

Figura 1 - Membros da família das galectinas de acordo com sua classificação e formação de “lattices”

a Galectinas Prototípicas (galectina-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14, -15)



b Galectina-3 tipo quimera



c Galectinas tipo repetições em série (galectina-4, -6, -8, -9, -12)



Adaptado de: (YANG; RABINOVICH; LIU, 2008).

Inicialmente, pensava-se que as gals funcionavam apenas como ligantes de carboidratos endógenos durante a embriogênese e primeiras fases do desenvolvimento, porém, posteriormente, descobriu-se sua participação em mecanismos de reparação tecidual, adipogênese, desenvolvimento de cânceres e regulação da homeostase imune (VASTA, 2020).

No campo da oncologia, múltiplos papéis vêm sendo atribuídos às galectinas nas últimas duas décadas, principalmente como biomarcador de prognóstico e alvo terapêutico. Por exemplo, tumores do tipo melanoma e câncer de próstata podem superexpressar as galectinas 1,3,7,8 e 9 e esse perfil de expressão pode estar associado ao grau de malignidade ou potencial metastático (VASTA, 2020). Baseado nessas constatações, estudos envolvendo o desenvolvimento de pequenos inibidores que bloqueiam seletivamente a atividade das galectinas representam uma estratégia promissora na terapia do câncer (DI GAETANO et al., 2022; DINGS et al., 2012; VLADOIU et al., 2015). O recente trabalho *in vitro* de Gaetano, por exemplo, utilizou digalactosídeos contendo selênio com afinidade para gal-9 e gal-3 e demonstrou importante atividade anti-proliferativa e anti-migração para células de melanoma e propriedades anti-angiogênicas. (DI GAETANO et al., 2022).

Em relação à metabologia, foi proposto em um estudo envolvendo animais que a gal-9 pode participar da homeostase metabólica através do transporte de glicose e secreção de insulina em células β pancreáticas (NABI; SHANKAR; DENNIS, 2015).

Já foi observado também que as gals são capazes de reconhecer carboidratos exógenos presentes na superfície celular de patógenos, funcionando não só como receptores de reconhecimento de padrões (RRPs), mas também como fatores efetores, através da inibição da adesão e/ou entrada na célula, ruptura da membrana ou promovendo fagocitose, autofagia ou encapsulação de patógenos. Por exemplo, fungos do tipo *Candida Albicans* podem ser detectados por macrófagos através de mecanismos envolvendo TLR-2 e galectina 3, a qual interage com oligomananas na superfície celular, fornecendo evidência de uma atividade antifúngica direta dessa galectina (RABINOVICH; TOSCANO, 2009). Alguns patógenos, por sua vez, ao longo da evolução, desenvolveram modificações adaptativas em seu glicoma de superfície para conseguir invadir as células humanas e blindar essa resposta do hospedeiro (LI et al., 2020).

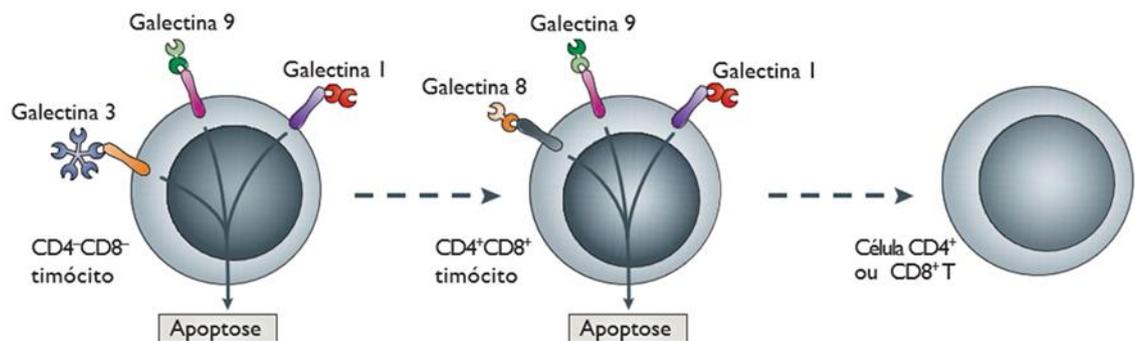
Devido à propriedade de se ligar seletivamente à IgE, a gal-3 vem sendo estudada também na alergologia, sendo observado que a administração exógena de

gal-3 via nasal em ratos portadores de asma levou à normalização da contagem de eosinófilos e células T no lavado broncoalveolar e inibição concomitante de mRNA de IL-5 nos pulmões, levantando-se a possibilidade de utilizar futuramente essa galectina no tratamento da asma alérgica (DEL POZO et al., 2002).

As galectinas exercem importantes funções para garantir a homeostase do sistema imune. Isso ocorre porque elas decifram as informações codificadas através de glicanos das células imunes e modulam sua função. Mais especificamente, essas lectinas podem se ligar a gliconjugados da superfície celular que contém resíduos de N-acetilactosamina (Lac-NAc) e controlar a sinalização e ativação da célula T, modular a sobrevivência de células T, alterar o balanço de citocinas e moldar o compartimento das células B e alterar a função supressora de células T (RABINOVICH; TOSCANO, 2009).

Em células T do timo, a interação das galectinas 1,3 e 9 podem levar à apoptose de células, como mostra a figura 2.

Figura 2 Participação das galectinas 1,3 e 9 nas células do timo desencadeando processos de apoptose

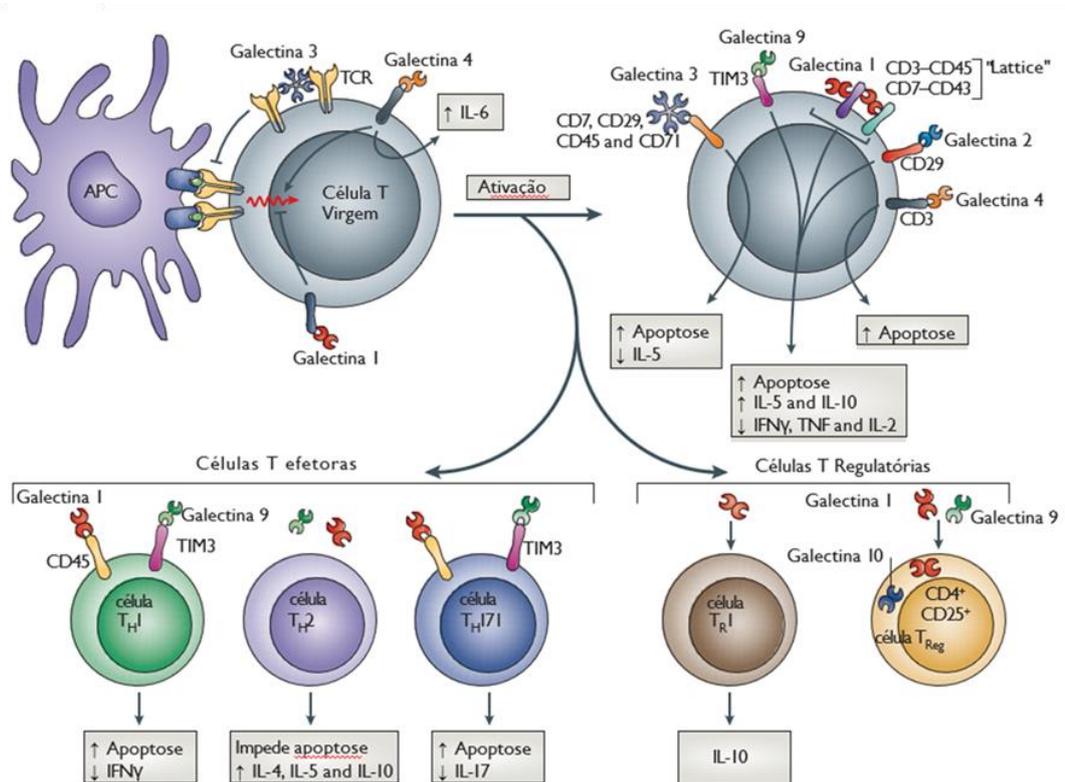


Adaptado de: Rabinovich, 2009

Sobre a ativação de células T na periferia, complexos multivalentes galectina 3-glicanos podem limitar o agrupamento de receptores de célula T (do inglês TCR: T-cell receptor), o que dificulta sua ativação e, por outro lado, a suplementação de células T com metabólito da via da hexosamina, a qual leva ao aumento de glicanos ramificados específicos, impede a sinalização sustentada de TCR, polarização para células Th1 e desenvolvimento de autoimunidade. Já a galectina-4, como se pode observar na figura 3, desencadeia a ativação de células T e produção de IL-6 (GRIGORIAN et al., 2007; RABINOVICH; TOSCANO, 2009).

Após sua ativação, as galectinas 1,2,3,4 e 9 podem se ligar a receptores glicosilados específicos das células T ativadas, incluindo CD3, CD7, CD29, CD43, CD45 e CD71 e o TIM-3 (do inglês: *T cell immunoglobulin domain, mucin domain-3*), desencadeando variadas respostas que podem levar à apoptose dessas células e alterar a produção de IL-5, IL-10, IFN γ , TNF e IL-2. Também já foi descrita a participação das galectinas 1 e 9 atuando, respectivamente, em receptores CD45 e TIM-3 de linfócitos Th1, Th2 e Th17 e influenciando na apoptose, liberação de interleucinas e IFN γ . Sobre células T regulatórias, postula-se que as galectinas 1, 9 e 10 podem mediar a atividade supressora de células T reg CD4+CD25+ (figura 3) (RABINOVICH; TOSCANO, 2009).

Figura 3 – Participação das galectinas sobre células T virgens, células T efetoras e T regulatórias



Adaptado de: Rabinovich, 2009

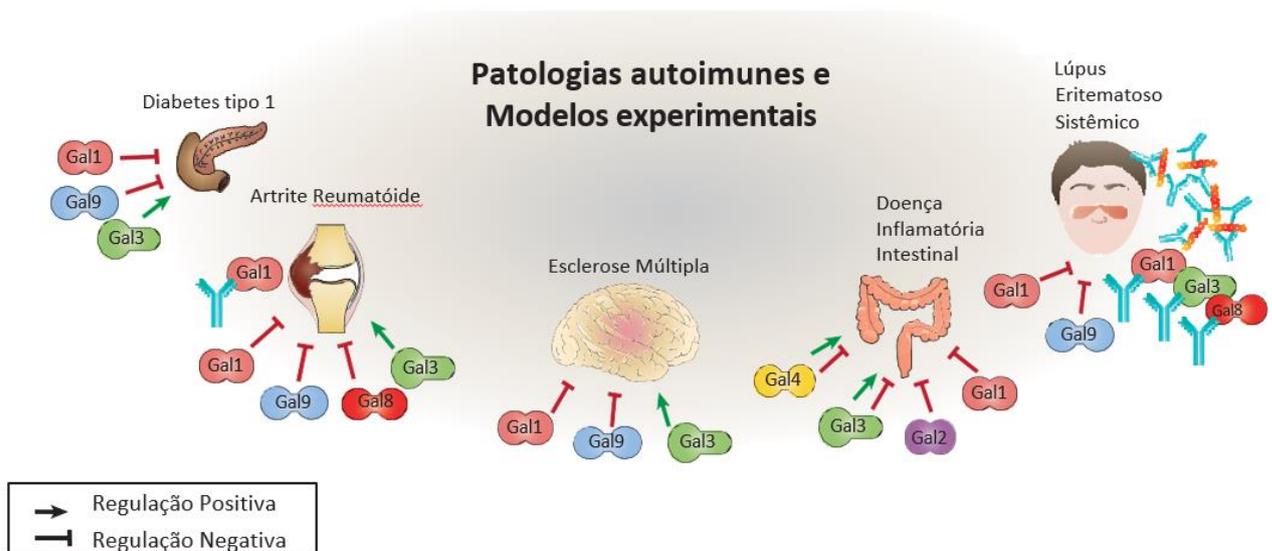
Em relação aos linfócitos B, as galectinas também podem modular várias etapas do desenvolvimento dessas células, como a maturação, ativação, diferenciação e sobrevivência (ACOSTA-RODRÍGUEZ et al., 2004; TABRIZI et al., 2009). A interação galectina-glicanos também influencia na resposta imune

adaptativa, podendo-se, por exemplo, observar a atuação da galectina-1 sobre macrófagos através da inibição da síntese de óxido nítrico e aumento da atividade da enzima arginase, impedindo que essa célula estimule linfócitos T (RABINOVICH; TOSCANO, 2009).

Na medida em que existe a perda da homeostase imune e perda da tolerância imunológica, devido de fatores genéticos, epigenéticos e/ou ambientais, inúmeras doenças podem emergir. Considerando a heterogeneidade de mecanismos patogênicos e a variabilidade clínica, a incidência de pacientes não respondedores a terapias imunossupressoras é elevado. Dessa forma, baseando-se na comprovada participação das galectinas nas células do sistema imune, é de grande interesse a investigação de seus circuitos regulatórios e seus comportamentos nas patologias imunomediadas, podendo ser este um caminho para tratamentos racionais e personalizados (DHIRAPONG et al., 2009)

Em relação à quebra da tolerância imunológica, a figura 4 mostra a participação das galectinas em algumas doenças autoimunes, como diabetes tipo 1, artrite reumatóide, esclerose múltipla, doença inflamatória intestinal e lúpus eritematoso sistêmico, nas quais podem participar como reguladoras positivas ou negativas.

Figura 4 – Impacto das galectinas nas diferentes funções celulares imunes e suas implicações na inflamação autoimune.



Adaptado de: (TOSCANO et al., 2018).

Na Artrite Reumatóide, em estudos com modelos murinos, observou-se que a participação da galectina 1 reduz a atividade de doença através da modulação da

resposta Th1 no sentido de Th2, diminuindo a reação inflamatória. Além disso, a injeção de fibroblastos sinoviais modificados por engenharia genética para produzirem essa galectina, levou à diminuição dos sintomas de artrite através do estímulo à apoptose das células T (RABINOVICH et al., 1999). Já a gal-3 parece exercer uma atividade pró inflamatória nessa doença, mas, paradoxalmente, também diminuiu a destruição óssea através da inibição da maturação de osteoclastos (TOSCANO et al., 2018).

Outro recente estudo destacou o papel emergente da família das gals nas doenças reumáticas, evidenciando que sua expressão se encontra alterada em várias doenças autoimunes e inflamatórias, como no Lúpus Eritematoso Sistêmico, na Artrite Reumatoide, na SSj e na Esclerose Sistêmica (XU; HUANG; HUANG, 2021). No Quadro 1 pode ser observado o perfil de gals descritas até o momento em algumas doenças reumáticas autoimunes (DRAIs).

Quadro 1 – Perfil de expressão das galectinas nas diferentes doenças reumáticas autoimunes (DRAIs).

Doença	Amostra	Expressão da Galectina
Lúpus Eritematoso Sistêmico	Soro	Galectina-1↑ Galectina-2↑ Galectina-3↑ Galectina-9↑
Artrite Reumatoide	Soro	Galectina-1↑ Galectina-3↑ Galectina-4↑ Galectina-7↑ Galectina-9↑
	Fluido Sinovial	Galectina-1↓ Galectina-3↑ Galectina-9↑
Síndrome de Sjögren	Soro	Galectina-3↓
	Biópsia de glândula salivar	Galectina-1↓
Esclerose Sistêmica	Soro	Galectina-3↑ Galectina-7↓ Galectina-9↑
	Fibroblasto cutâneo	Galectina-1↓ Galectina-7↓ Galectina-9↑

Fonte: Adaptado de (XU; HUANG; HUANG, 2021).

Na SSj foi encontrada correlação positiva entre o nível sérico de gal-3 e o nível de interleucina-17 (IL-17) e de proteína C reativa (PCR) (ZHANG et al., 2014). Outro trabalho encontrou uma expressão de gal-1 reduzida em biópsias labiais de pacientes portadores da SSj, comparada com controles, e que essa expressão era

negativamente relacionada com a quantidade de infiltrado de células CD8+ (MARTÍNEZ ALLO et al., 2020)

2.2.1 Galectina-9

A galectina 9 pertence ao grupo de lectinas *tandem repeat*, que apresentam 2 domínios homólogos de reconhecimento de carboidratos conectados por um peptídeo ligante (HIRASHIMA et al., 2002). Em condições fisiológicas, já foi descrita sua presença no fígado, intestino delgado, timo, rim, baço, pulmão e sistema musculoesquelético (HIRASHIMA et al., 2002).

Essa lectina pode apresentar uma variedade de atividades biológicas no contexto tumoral, como regulação do ciclo celular e apoptose, contribuindo para a adesão, migração e metástase, alterações nos mecanismos de tolerância imunológica e influência na angiogênese (HEUSSCHEN; GRIFFIOEN; THIJSEN, 2013; YANG et al., 2022).

Ela foi primeiramente descrita em células tumorais da doença de Hodgkin, condição na qual encontra-se eosinofilia tissular e sanguínea, sendo, portanto, considerada um quimiotáxico específico de eosinófilos (TÜRECI et al., 1997; MATSUSHITA et al., 2000).

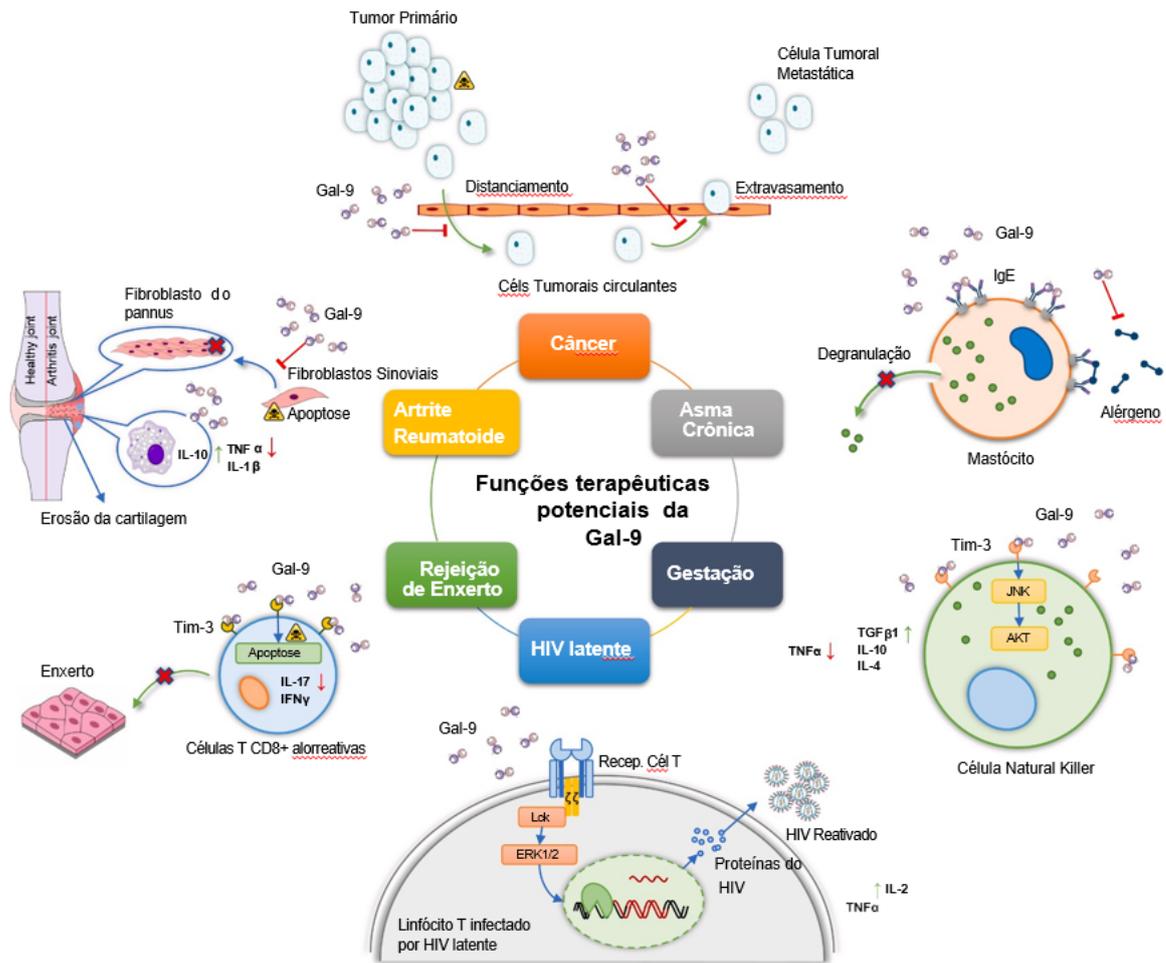
Além das doenças oncológicas, encontramos a participação da gal-9 em condições patológicas como a doença hepática não alcoólica, trombocitopenia imune, nefropatia diabética, fibrose cística pulmonar, hepatite autoimune, infecção aguda pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV; do inglês *human immunodeficiency virus*), asma crônica, processo de rejeição de enxerto, dentre outras, podendo atuar como promotor, inibidor ou biomarcador (JOHN; MISHRA, 2016).

Em alguns subtipos de câncer, postula-se que a gal-9 possa atuar suprimindo metástases através da inibição de distanciamento e saída das células tumorais do local primário. Na asma crônica, a gal-9 pode inibir a interação do alérgeno com a IgE e supressão da degranulação excessiva de mastócitos. Em estudos com enxertos de pele, observou-se que a gal-9 pode induzir a apoptose de cels T CD8+, as quais são responsáveis pelo processo de rejeição, resultando em sobrevivência desses tecidos. A gal-9 também participa ativamente do mecanismo de tolerância imunológica materno fetal através da ligação a células natural killer que apresentam o receptor TIM-3. Em relação a doenças infecciosas, descreve-se que a gal-9 pode reativar o

HIV em estado latente em céls T CD4+ infectadas através da via de sinalização ERK através da interação com o receptor de célula T (FIGURA 5) (MOAR; TANDON, 2021).

Em monócitos THP-1, os quais são obtidos de portadores de leucemia monocítica aguda e são muito utilizados em pesquisas envolvendo esse subtipo celular(PARMERA, 2007), foi mostrado que uma superexpressão da gal-9 leva a uma diminuição dos níveis de TIM-3, STAT 3 fosforilada e IL-23 e aumento dos níveis de IL-12.(XU; HUANG; HUANG, 2021). Essa glicoproteína TIM-3 exposta na superfície de células T, ao interagir com a gal-9, pode desencadear várias reações como mobilização de cálcio, ativação de calpaína e caspase 1, as quais culminam em apoptose. De todo modo, foi visto que quando administrado em baixas doses, a gal-9 tem efeitos estimulatórios sobre a célula T, o que reitera a informação de que as galectinas podem ter efeitos imunomodulatórios diferentes, a depender da concentração, presença de receptores e locais disponíveis para interação química (JOHN; MISHRA, 2016).

Figura 5 – Funções terapêuticas potenciais da Gal-9 e possíveis mecanismos de ação



Fonte: Adaptado de Moar, 2021

Um estudo em murinos propôs que sua presença influencia a polarização de macrófagos para tipo M1 ou M2, através das vias da STAT1, STAT3 e NFκB. Mais precisamente, observou-se que o bloqueio da gal-9 em macrófagos aumentou os níveis ou a atividade do TNF-α, IL-6, STAT-1 e NFκB, correlacionando-se mais com características dos macrófagos tipo 1, enquanto sua superexpressão aumentou o nível ou a atividade do TGF-β, IL-10 e STAT3, o que corresponde mais com um perfil de macrófagos M2, demonstrando um potencial uso dessa lectina como alvo imunomodulatório para macrófagos (LV; BAO; LI, 2017).

Sobre as células dendríticas, os estudos sugerem sua participação tanto no mecanismo de fagocitose, quanto de indução da migração. Em células T *Jurkat*, observou-se que a adição de gal-9 ao meio celular favoreceu o aumento da taxa de apoptose e aumento da atividade das caspases 3 e 7. Em células Th1 humanas, observou-se tanto um aumento da apoptose, quanto da produção de IFN-γ. Por fim,

observou-se que a gal-9 também interage com o receptor da célula B através do CD45, no sentido de inibir sua proliferação e suprimir a via do NFKB e a fosforilação da Jun N-terminal cinase (JNK) (XU; HUANG; HUANG, 2021).

À respeito das doenças reumáticas autoimunes, sabe-se que o interferon tipo I está associado à fisiopatologia do Lúpus Eritematoso Sistêmico, e a quimiocina CXCL-10 (do inglês: C-X-C motif chemokine ligand 10) é um de seus marcadores (ENOCSSON et al., 2021; MATSUOKA et al., 2020). Alguns trabalhos vêm propondo que a gal-9 pode ter grande importância nessa patologia, como biomarcador, e até como imunomodulador. Matsuoka e cols observaram maiores níveis séricos da gal-9 em pacientes lúpicos quando comparados com controles, além de uma relação com maior atividade renal. Eles, também, dosaram a gal-9 no líquido cefalorraquidiano dos pacientes lúpicos, com diagnóstico recente de Lúpus Neuropsiquiátrico, e demonstraram um aumento estatisticamente significativo dessa galectina, comparado aos controles (MATSUOKA et al., 2020).

Outro estudo com pacientes portadores de Lúpus Eritematoso Sistêmico e de Síndrome do Anticorpo Antifosfolípide, também encontrou níveis séricos de gal-9 superiores aos do braço controle. Também foi mostrado superioridade da galectina sobre o anticorpo anti-DNA, um marcador clássico de atividade de doença, em detectar a assinatura do Interferon, ou seja, maior atividade da doença (área sobre a curva de 0,86 e 070 para gal-9 e anti-DNA, respectivamente) (VAN DEN HOOGEN et al., 2018b).

O trabalho de Panda e cols. (2018) induziu em modelo murinos sintomas de LES e demonstrou que a administração de gal-9 na fase precoce da doença reduziu esplenomegalia, ativação e expansão de células B e T, geração de autoanticorpos, e também se observaram manifestações renais mais leves em comparação com controles, sendo o mecanismo proposto para tal fato a inibição da sinalização endossomal de receptores tipo Toll (TLRs 7 e 9) (PANDA et al., 2018).

A importância da gal-9 como protetora nas artrites induzidas pelo colágeno foi reiterada no trabalho de Seki (2008), no qual observou-se que, em modelos animais, ela tem participação na medida em que suprime a formação do *pannus* tecidual, a destruição cartilágnea e óssea, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-17 nas articulações, suprimindo a diferenciação de células T CD4+ *naive* em células Th17, através de sua interação com o ligante TIM-3, e promovendo a diferenciação e expansão de linfócitos T Reg, (SEKI et al., 2008).

Em relação à Artrite Reumatoide, inicialmente, observou-se que a gal-9 é altamente expressa no tecido e líquido sinovial, contribuindo para a apoptose *in vitro* de sinoviócitos semelhantes a fibroblastos, o que limitaria a perpetuação da doença e destruição celular (SEKI et al., 2008). Já em outros estudos em pacientes com essa patologia, foi observada a relação entre gal-9 sérica e doença intersticial pulmonar, doença articular avançada, provas de atividade inflamatória, dosagem de anti-CCP e escore de atividade DAS-28 (do inglês, *Disease Activity Score-28*), sugerindo-se, diferentemente do que foi proposto no trabalho de Seki, um efeito pró-inflamatório (XU; HUANG; HUANG, 2021) (WIERSMA et al., 2019).

O mecanismo proposto para justificar esse efeito pró-inflamatório seria uma atuação da gal-9 sobre granulócitos, sobre os quais sua ação pode reduzir atividade apoptótica espontânea e induzir a secreção das citocinas pró-inflamatórias IL-8 e TNF. Além disso, foi demonstrado um aumento da expressão da enzima peptidil arginina deaminase 4 (PAD-4), a qual converte resíduos de arginina em citrulina, num processo conhecido como citrulinização, intrinsecamente relacionado à fisiopatologia da doença. Sugere-se que o aumento dessa expressão enzimática aconteceria através do aumento e mobilização do cálcio citosólico por um estímulo da gal-9 (WIERSMA et al., 2019).

Matsumoto e cols (2021) também estudaram gal-9 em pacientes com Artrite Reumatóide e encontraram correlação positiva dessa galectina com IL-6 e TNF- α , de acordo com o grau de dano articular, sendo forte associação com TNF- α em pacientes com dano articular avançado e com IL-6 em situações de dano articular leve, sugerindo que a interação da gal-9 com essas citocinas pode contribuir para o desenvolvimento de diferentes processos de inflamação e destruição articular (MATSUMOTO et al., 2021).

Em estudos com pacientes com Esclerose Sistêmica, observou-se um aumento sérico de gal-9 nesses pacientes, tanto nas formas cutâneo sistêmica limitada quanto na difusa, comparado com controles, além de um aumento de sua expressão nos fibroblastos da derme, levando a um aumento de fibrose através da via do TGF- β . Também foi visto que seus valores são inversamente proporcionais a testes de função pulmonar como a capacidade vital forçada e capacidade de difusão de monóxido de carbono (XU; HUANG; HUANG, 2021). (SAIGUSA et al., 2017)

Foi demonstrado em estudos animais que a injeção de bleomicina, um fármaco que é conhecidamente um fator de risco para o desenvolvimento da esclerose

sistêmica, aumentou a expressão de gal-9 em fibroblastos da derme e, por outro lado, injeção de bosentana, um antagonista do receptor de endotelina, utilizado no tratamento da patologia, levou a uma diminuição da expressão dessa glectina. Uma das hipóteses para esse aumento da expressão seria a deficiência no fator de transcrição de integração 1 da leucemia friend (FLI-1), ou fator de transcrição ERGB, o qual pertence à família dos fatores de transcrição específicos E26 (ETs), pressupondo-se que a presença desse fator serviria como um repressor da transcrição do gene da gal-9(SAIGUSA et al., 2017; XU; HUANG; HUANG, 2021).

O recente trabalho de Yoon (2022) com 80 pacientes portadores de Vasculites Associada ao Anca mostrou, numa análise de regressão logística multivariada, associação do nível sérico de gal-9 com maior atividade da doença (odds ratio de 5.303), sendo o mecanismo proposto para esse aumento da gal-9 como uma tentativa de atenuar o processo inflamatório através da regulação de células T (YOON et al., 2022).

Apesar de ter sido descrita em várias doenças reumáticas autoimunes, são poucos os estudos relatando as possíveis funções e mecanismos das glectinas 9 na SSP. No trabalho de Van Den Hoogen, foi sugerido que ela esteja aumentada no soro de pacientes com a SSP e se correlacione positivamente com níveis de IgG e com a atividade de doença, medida através de seu índice de atividade ESSDAI (ROSAS et al., 2019; VAN DEN HOOGEN et al., 2018b). Até o presente momento, não são conhecidos trabalhos que analisem a glectina-9 na saliva de pacientes com essa patologia.

3 JUSTIFICATIVA

A Síndrome de Sjögren ainda é uma patologia pouco estudada, quando se compara com outras doenças reumáticas autoimunes, como o LES e a AR. Dentre os vários aspectos que merecem atenção em relação a ela, o campo dos biomarcadores necessita de um olhar especial, haja vista a escassez de estudos com validade externa nessa temática. No que se refere a estudos brasileiros, essa realidade é ainda mais precária. Dessa forma, estudar a galectina-9, que vem ganhando um papel emergente nos estudos envolvendo doenças imunomediadas e inflamatórias, torna-se uma oportunidade para suprir essa demanda e abrir caminhos para novos estudos com galectinas e a síndrome de Sjögren.

A possibilidade de desenvolver marcadores de atividade de doença, diagnóstico ou prognóstico, mais específicos, podem levar à redução de custos na saúde, na medida em que diminuem o tempo até a conclusão diagnóstica e diminuem a solicitação de exames desnecessários. Além disso, diminuir a invasividade de testes clínico-diagnósticos também pode reduzir custo e tempo, o que influencia nos gastos com a saúde, estratégias de diagnóstico e tratamento, e qualidade de vida do paciente.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a gal-9 no soro, na saliva de pacientes portadores de Síndrome de Sjögren primária e sua associação com manifestações clínicas e achados ultrassonográficos.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar os níveis de gal-9 no sangue e na saliva de pacientes com SSP primária e em controles saudáveis;
- Correlacionar os níveis de gal-9 no soro e na saliva desses pacientes com o escore de atividade ESSDAI, IgG e idade;
- Avaliar os níveis de gal-9 no soro e saliva de acordo com a presença de manifestações glandulares e extra glandulares;
- Avaliar os níveis de gal-9 no soro e saliva segundo a positividade a anticorpos específicos, testes de securo, uso de medicações e achados ultrassonográficos das glândulas salivares;
- Descrever a expressão da gal-9 em biópsias teciduais de glândula salivar menor.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 TIPO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo de corte transversal analítico de base hospitalar.

5.2 LOCAL DA PESQUISA

O estudo foi desenvolvido ambulatório de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE) e no Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT), também localizado na UFPE.

5.3 AMOSTRA DA PESQUISA

Foram incluídos neste estudo 42 pacientes portadores de SSP, através de amostragem por conveniência, devido à baixa prevalência dessa patologia. Para efeito comparativo da gal-9, cujo valor de referência no soro e saliva ainda não está padronizado na literatura, foram recrutados controles autodeclarados saudáveis, os quais foram pareados na proporção de 1:1 por sexo e idade, durante o período de julho de 2019 a janeiro de 2021.

5.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

5.4.1 Pacientes

- a. Idade acima de 18 anos;
- b. Ser portador de SSP pelos critérios de 2002 ou ACR 2012 ou ACR/EULAR 2016.

5.4.2 Controles

- a. Idade acima de 18 anos;
- b. Não ser portador de SSP pelos critérios de 2002 ou ACR 2012 ou ACR/EULAR 2016 e se autodeclarar saudável.

5.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

5.5.1 Pacientes

- a. Ser portador de Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), sarcoidose, amiloidose, doença do enxerto x hospedeiro, Hepatite C e doença relacionada à IgG4;

- b. Uso prévio de agentes anticolinérgicos nos últimos 3 meses;
- c. História de irradiação prévia da cabeça e do pescoço;
- d. Síndromes de Sobreposição ou SSj associada a outras doenças do tecido conjuntivo;
- e. Histórico de neoplasia previamente ao diagnóstico de SSj primária.
- f. Estar gestante
- g. Tabagismo atual

5.5.2 Controles

- a. Ter conhecimento de ser portador de qualquer DRAI;
- b. Ter conhecimento de ser portador de AIDS, sarcoidose, amiloidose, doença do enxerto x hospedeiro, Hepatite C e doença relacionada à IgG4;
- c. Uso prévio de agentes anticolinérgicos;
- d. História de irradiação prévia da cabeça e do pescoço;
- e. Histórico de neoplasia.
- f. Estar gestante
- g. Tabagismo atual

5.6 INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS

Utilizou-se uma ficha clínica (Apêndice A) composta de dados demográficos, perfil de manifestações clínicas da doença, critérios classificatórios da Síndrome de Sjögren de 2002, 2012 e 2016 (RAMOS-CASALS et al., 2010; SHIBOSKI et al., 2012, 2017). Também foram utilizados índices que ajudam a caracterizar a SSP, como da ESSPRI-*Eular Sjögren's Syndrome Patient Reported Index* (PAGANOTTI et al., 2015) (Anexo D), SSDDI-*Sjogren's Syndrome Disease Damage Index* (Anexo E) e ESSDAI-*EULAR Sjögren's syndrome disease activity index* (Anexo F), (SEROR et al., 2015). Os dados complementares para caracterizar a amostra, relacionados aos testes de Schirmer e fluxo salivar não estimulado), FAN, FR, autoanticorpos (AntiRo/SSa e Anti La/SSb), hemograma, provas de atividade inflamatória, comorbidades e medicações em uso foram coletados a partir dos prontuários disponibilizados pelo Serviço de Arquivo Médico e Estatístico (SAME).

5.7 PROCEDIMENTO PARA COLETA DE AMOSTRAS

Foram coletadas amostras de sangue de pacientes e controles para avaliação dos níveis sérico e salivar da gal-9 para posterior análise. Também houve a coleta de saliva dos participantes, sendo que, em alguns casos, não foi possível adquirir amostras do grupo doente devido à ausência de produção salivar.

Para a obtenção do sangue, foi realizada a coleta de 30mL de sangue periférico, em tubo seco com heparina, seguida de posterior centrifugação (3000 rpm/min) e armazenamento em tubos eppendorf a no LINAT. A coleta da saliva foi realizada num tubo *Falcon* de 15ml durante um período de 5 minutos sem engolir, após jejum de comidas e bebidas por 1 hora antes do procedimento, através do método de drenagem ou escoamento passivo não estimulado (ZHANG et al., 2016). Após a coleta foi adicionado um coquetel inibidor de protease (Sigma Aldrich, MO, EUA) na razão de 1:100, conforme recomendado pelo fabricante, sendo depois centrifugado a 2000 rpm por 3 min à temperatura ambiente, para formação do sedimento. *A posteriori*, esse sobrenadante foi coletado e dividido em alíquotas de 500µL e armazenado em freezer à -80°.

5.8 VARIÁVEIS ANALISADAS

5.8.1 Análise das amostras de sangue e de saliva pelo ELISA

A técnica ELISA sanduíche (do inglês: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) foi escolhida para a quantificação da gal-9 nas amostras sanguínea e salivar, seguindo as informações recomendadas pelo fabricante (R&D Systems). Inicialmente foi feita a reconstituição de 180µg do anticorpo de captura anti-galectina 9 humana em 1mL de Tampão Fosfato-Salino 1X (PBS; do inglês, *Phosphate Buffered Saline*), colocados 31µL em cada tubo eppendorf de 0,5mL e estocados a -80°C, sendo posteriormente diluído a fim de se obter uma concentração final de 1,0µg/mL. Para cada placa de 96 poços, utilizou-se 5mL de PBS 1x + 27,8µL do anticorpo de captura, sendo colocados 50µL em cada poço para incubação.

Após a placa ser lavada 3 vezes com o tampão de lavagem, ela foi saturada com 150µL / poço de albumina (do inglês, Bovine Serum Albumine) 1% / PBS 1x, por 1 hora, à temperatura ambiente (TA) e, à posteriori, lavada novamente 3 vezes com o tampão de lavagem. A preparação do *standard* foi feita reconstituindo-o em 500µL de

BSA 1% / PBS 1x, chegando a uma concentração de 6000pg/mL. Foram colocados 25µL em cada tubo eppendorf de 0,5mL e estocados a -80°C. A seguir foi feita uma diluição em cascata, até se chegar a uma concentração de 46,87pg/mL e, novamente, a placa foi lavada 3 vezes com o tampão de lavagem.

A preparação do anticorpo de detecção foi procedida reconstituindo 18µg da anti-galectina 9 humana em 1mL de PBS 1%, sendo colocados 60µL em cada tubo eppendorf de 0,5mL, sendo posteriormente diluído a fim de se obter uma concentração final de 100ng/mL. Para cada placa de 96 poços, 5mL do BSA 1% / PBS 1x + 27,8µL do anticorpo de diluição, e colocando 50µL / poço da placa, durante 2 horas à TA. Para a preparação da HRP-Streptavidina, foram utilizados 5mL do BSA 1% + 25µL da Streptavidin-HRP 1/200, estabilizados por 20 minutos a TA, depois separados 50µL em cada poço, seguido de mais uma lavagem da placa por 3 vezes.

A preparação do substrato foi feita com 2,5mL do reativo A e 2,5mL do reativo B (Ref: R&D DY999) e colocados 50µL por poço, durante 20 minutos, ao abrigo da luz, à temperatura ambiente. Por fim, foram colocados 25µL da solução *STOP* com ácido sulfúrico e a placa foi lida em um leitor de ELISA entre 450nm e 570nm. O teste foi feito em duplicata, as quais serviram de controle para os erros de manuseio. O limite mínimo de detecção para a Gal-9 foi de 46,87pg/ml e o máximo de 6.000pg/ml

Para realizar o cálculo comparativo da gal-9 no sangue de controles saudáveis, foi utilizado um banco de soro de voluntários, pareado por sexo e idade, o qual está disponível no LINAT. Para o estudo da galectina na saliva dos controles saudáveis, utilizou-se o grupo de voluntários descrito anteriormente.

5.8.2 Análise Imunohistoquímica de tecido de glândula salivar menor

Foram analisados dezesseis blocos contendo produtos de biópsia de glândula salivar menor. Esses exames foram realizados pela equipe de estomatologia no Departamento de Odontologia da UFPE, que tem vasta experiência na realização desse procedimento. A técnica do exame consiste inicialmente na realização de anestesia local com uma pequena incisão de 0,5 a 1 cm no lábio inferior com retirada de 4 a 6 glândulas salivares menores, seguida de sutura simples.

Os pacientes que ainda não haviam realizado o exame e apresentavam indicação para fazê-lo (para confirmação diagnóstica ou avaliação prognóstica) foram

convidados a procedê-lo. Dos que já haviam feito o exame anteriormente, as lâminas foram resgatadas para avaliação no departamento de patologia do Hospital das Clínicas e de odontologia UFPE.

Por se tratar de um exame invasivo, nos pacientes que já haviam realizado esse procedimento e não se tinha acesso às lâminas, a repetição desse exame foi desconsiderada.

Após adquiridos os blocos, os mesmos foram cortados com espessura de três micrômetros e depois foram desparafinizados em xilol e reidratados em concentrações decrescentes de etanol (100, 95, 70, e 50%). Em seguida foi realizada a recuperação antigênica em Target Retrieval Solution, em pH 9 1:50 (kit Dako), a 65°C por 20 minutos. Após o resfriamento, as lâminas foram incubadas com o bloqueador de peroxidase endógena, por 10 minutos, seguido do bloqueio das ligações inespecíficas com o PBS/BSA 5% (do inglês: Phosphate Buffered Saline/ bovine serum albumin), por 60 minutos, à TA.

Os cortes histológicos foram incubados com o anticorpo anti-galectina-9 (CSB-PA026494A0RB, 1:100, Empresa Cusabio) diluídos em PBS-BSA 5%, durante o período de 60 minutos, a 37°C. Após a incubação com os anticorpos primários, foi aplicado o sistema de amplificação do kit comercial Dako EnVision Duoflex-HRP, por 60 minutos, à temperatura ambiente, e os cortes foram revelados com DAB-H₂O₂.

Os controles positivos utilizados foram selecionados segundo indicação do fabricante, utilizando-se tecido renal, e os controles negativos estabelecidos através da substituição do anticorpo secundário por anticorpo anti-IgG humana inespecífica (DAKO). As fotografias foram realizadas utilizando Microscópio Zeiss, com o sistema de captura de imagem ZEN 2011 (blue edition). A avaliação das lâminas foi feita por biomédico experiente na leitura de galectinas e uma médica patologista.

Foi procedida uma separação das lâminas que tiveram expressão de gal-9 positiva (identificadas com cor acastanhada no parênquima ou região de estroma das glândulas salivares) ou negativa (não visualização da marcação em cor acastanhada em nesses locais), sendo posteriormente identificado os locais onde houve essa marcação.

5.8.3 Ultrassonografia de glândulas salivares

A Ultrassonografia de glândulas salivares foi realizada utilizando-se o equipamento General Electric LOGIC S7, com sonda de transdutor linear de alta frequência (10MHz), em modo-B, realizado por radiologista com mais de 2 anos de experiência na realização desse exame. Utilizou-se a classificação baseada no OMERACT *ultrasound working group* (JOUSSE-JOULIN et al., 2019), que varia de 0 a 3, sendo 0 considerado o parênquima normal, grau 1: mudança mínima, heterogeneidade leve sem áreas anecóicas/hipoecóicas; grau 2, mudança moderada: heterogeneidade moderada com áreas anecoicas/hipoecóicas focais e grau 3 o pior acometimento, com heterogeneidade difusa, áreas hipo ou anecoicas ocupando toda a superfície glandular e sem tecido normal ao redor (Apêndice B).

5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

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) e mediana e os percentis 25 e 75 (mediana (P25; P75) para as variáveis numéricas. A comparação entre as duas categorias em relação às gals foi realizada através do teste Mann-Whitney. O grau da relação entre duas variáveis numéricas foi avaliado pelo coeficiente de correlação de Spearman com o uso do teste t-Student específico para a hipótese de correlação nula.

A escolha dos testes Wilcoxon pareado, Mann-Whitney e a correlação de Spearman ocorreram nas situações em que os dados mostraram ausência de normalidade ou o tamanho da amostra foi inferior a 6 casos em alguma categoria. 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 em planilha EXCEL (Microsoft Office) e o programa utilizado para obtenção dos cálculos estatísticos foi o IMB SPSS na versão 25.

5.10 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este projeto foi submetido à avaliação e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do Hospital das Clínicas da UFPE, de acordo com a resolução nº 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde (Anexo G).

Todos os indivíduos participantes do estudo assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice C), conforme exigência da referida resolução. Nenhuma coleta foi realizada sem a autorização prévia dos voluntários. As coletas de saliva e de sangue foram realizadas por profissionais devidamente treinados, a fim de minimizar o número de tentativas para a coleta e risco de complicações, como hematoma (área arroxeadada na pele) e dor local.

6 RESULTADOS

6.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Foram incluídas 42 pacientes portadoras de SSP, todas do sexo feminino e com idade variando entre 20 e 61 anos e média de 45,8 ($\pm 11,16$) anos, sendo 18 (42,9%) com mais de 51anos. Não houve diferença de idade em relação ao grupo controle, cuja média foi de 45,2 ($\pm 10,88$) anos.

As características da amostra, assim como os resultados da biópsia salivar, testes objetivos para avaliação de secura ocular e oral, utilizados para o diagnóstico, frequência de autoanticorpos, alterações hematológicas, provas inflamatórias, comorbidades, medicamentos em uso e escore de atividade estão descritos na tabela 3.

Tabela 1 – Características relacionadas ao sexo, duração dos sintomas, aos testes diagnósticos, autoanticorpos, hemograma, provas inflamatórias, comorbidades, medicações em uso e escore de atividade dos pacientes do grupo SSP.

CARACTERÍSTICAS	
Sexo Feminino – n (%)	42 (100)
Idade – média \pm DP	45,8 \pm 11,16
Duração de doença(anos) - média \pm DP	5,81 \pm 4,51
Exames para diagnóstico	
Teste de Schirmer positivo (N=40) - n (%)	27 (67,5)
Média Schirmer (mm) média \pm DP	4.6 \pm 3,01
Fluxo salivar não estimulado alterado (N= 39) - n (%)	35 (89,7)
Biópsia com Sialoadenite focal linfocítica em glândula salivar menor (N =31) n (%)	29 (93,5)
Autoanticorpos Positivos	N (%)
FAN (N=41)	36 (87,8)
Anti Ro/SSA (N=41)	33 (80,4)
Anti La /SSB (N=35)	17 (48,5)
Fator reumatoide (N=42)	15 (35,7)
Hemograma, Provas de Atividade Inflamatória e IgG	10 (23,8)
Anemia (Hb<12)) (N=42) - média \pm DP	12,83 (\pm 1,09)
Linfopenia (linfócitos <4.000/mm ³) (N=42)	13 (30,9)
Leucopenia (leucócitos <10.000/mm ³) (N=42)	11 (26,2)
VHS acima da normalidade (N=35)	25 (71,4)
PCR acima da normalidade (N=39)	5(12,8)
IgG (mg/dl) (média \pm DP)	1539,87 \pm 536,83
Comorbidades (N=42)	N (%)
Sobrepeso (IMC \geq 25 e \leq 29,9)	16 (38,1)
Menopausa	13 (30,9)
Fibromialgia	12 (28,5)
Transtorno de Ansiedade	12 (28,5)

Hipovitaminose D	10 (23,8)
Hipertensão	9 (21,4)
Diabetes	9 (21,42)
Medicações (N=42)	N (%)
Colírios Substitutos de lágrimas	29 (69,0)
Vitamina D	26 (61,9)
Hidroxycloquina	23 (54,7)
Antidepressivos	19 (45,2)
Metotrexato	11 (26,2)
Corticoide (\leq 20 mg de prednisona)	10 (23,8)
Corticoide (\geq 20 mg de prednisona)	0 (0)
Pilocarpina	07 (16,6)
Azatioprina	07 (16,6)
Rituximabe	04 (9,5)
Ciclofosfamida	01 (2,4)
Leflunomida	01 (2,4)
Escore de Atividade	
ESSDAI - mediana (P25; P75)	2,00(1,00; 4,25)

ESSDAI= EULAR Sjögren's Syndrome Disease Activity Index; FAN= Fator Anti Nuclear; IMC= Índice de Massa Corpórea VHS= Velocidade de Hemossedimentação; PCR= Proteína C Reativa

No que concerne a exames de imagem, foram analisados os resultados de USG de glândulas parótidas e submandibulares de 32 pacientes com SSP, dos quais 24(75%) apresentavam achados compatíveis com SSj. A descrição detalhada se encontra na Tabela 2.

Tabela 2 – Achados ultrassonográficos das glândulas salivares de pacientes portadores de SSP (n=32).

Variável	n (%)
USG compatível com SSj	
Sim	24(75)
Não	8(25)
Grau de acometimento de parótida	
0 e 1	16 (50,0)
2 e 3	16 (50,0)
Grau de acometimento de submandibular	
0 e 1	8 (19,0)
2 e 3	24 (57,1)

6.2 ACHADOS RELACIONADOS À GAL-9 SÉRICA E SALIVAR

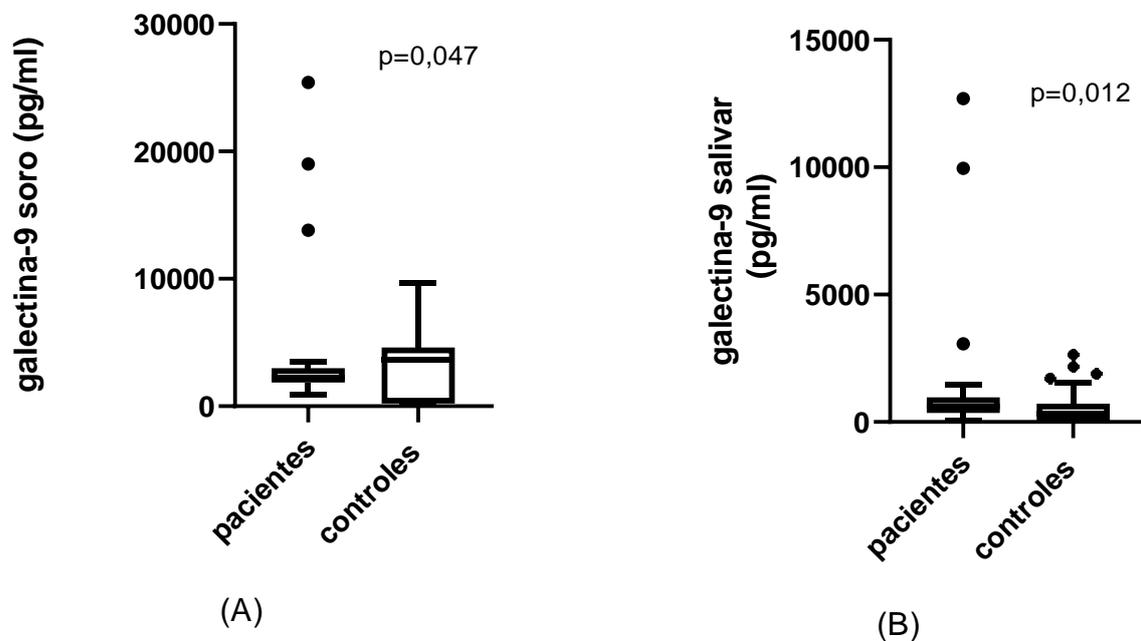
Em relação aos níveis séricos de gal-9, o grupo controle apresentou a mediana significativamente superior ao dos pacientes do grupo SSP. Por outro lado, na saliva, a mediana foi maior no grupo dos doentes (Tabela 4 e Gráfico 1).

Tabela 3 – Comparação da mediana da galectina-9 sérica e salivar nos grupos SSP e controle.

Variável	Pacientes (n=42)	Controle (n=42)	Valor
	Mediana (P25; P75)	Mediana (P25; P75)	
Soro	2264,24 (1867,27; 2980,91)	3622,86 (215,00; 4602,14)	$p^{(1)} = 0,047$
Saliva	613,58 (352,97; 972,67)	317,59 (46,87; 714,49)	$p^{(1)} = 0,012$

(1) Pelo teste de Mann-Whitney

Gráfico 1- Níveis séricos (A) e salivares (B) de gal-9 nos grupos SSP e controle.



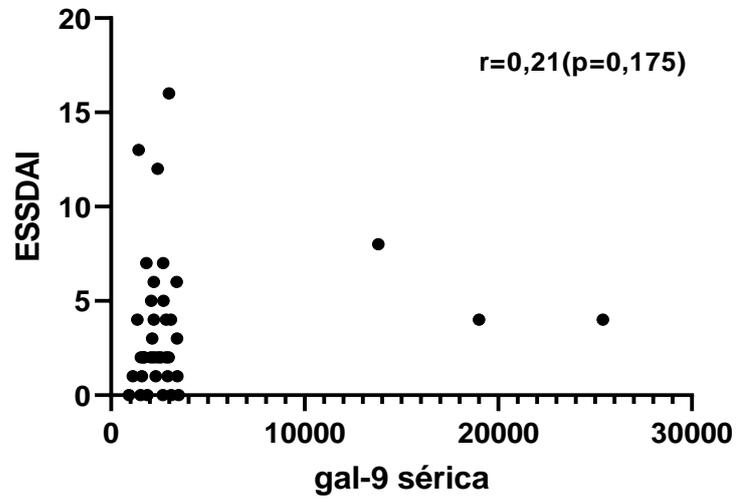
As correlações entre os níveis da gal-9 sérica e salivar e a idade, dosagem de IgG sérica e atividade de doença podem ser observadas na Tabela 4. Entretanto, não foram registradas associações significativas entre os níveis de gal-9 e as três variáveis analisadas. Esses valores podem ser observados nos gráficos 2 e 3.

Tabela 4 – Correlação de Spearman entre a galectina-9 no soro e na saliva com os resultados das variáveis ESSDAI atual, idade e IgG sérica no grupo SSP.

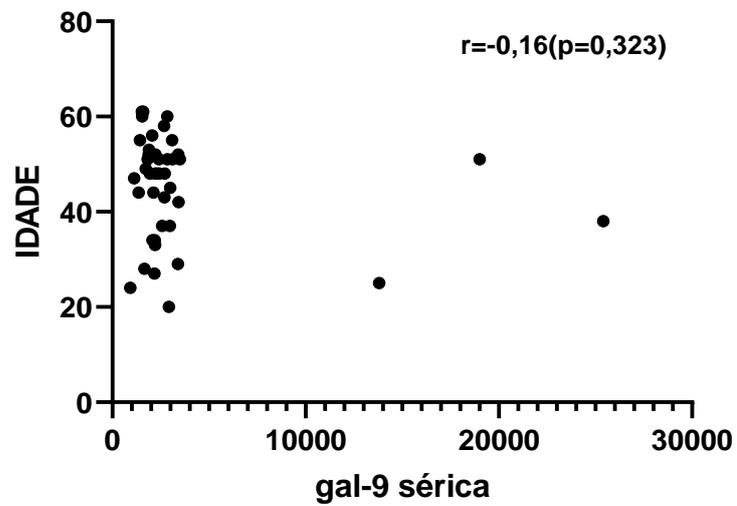
Variável	Soro r (p)	Saliva r (p)
Escore ESSDAI atual	0,21 (0,175)	0,32 (0,090)
Idade	- 0,16 (0,323)	- 0,13 (0,496)
IgG sérica	0,16 (0,341)	0,25 (0,213)

ESSDAI= EULAR Sjögren's Syndrome Disease Activity

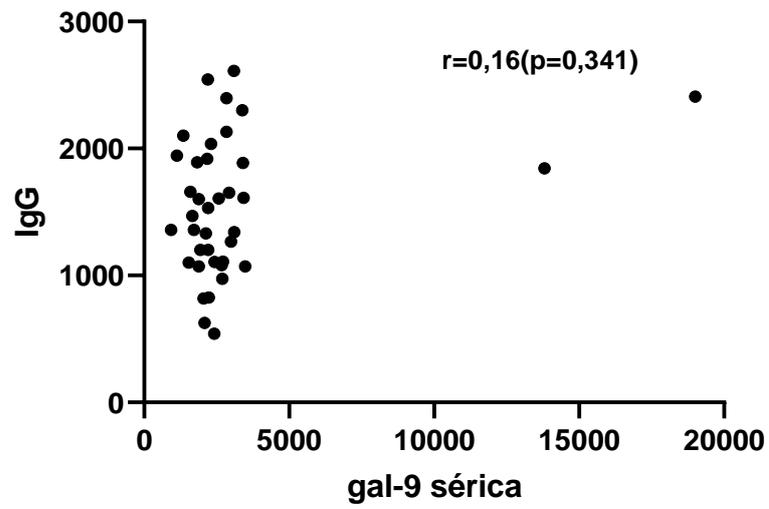
Grafico 2- Níveis séricos da galectina 9 em pacientes portadores de SSP correlacionados com as variáveis ESSDAI(A), Idade(B) e IgG sérica(C), respectivamente.



(A)

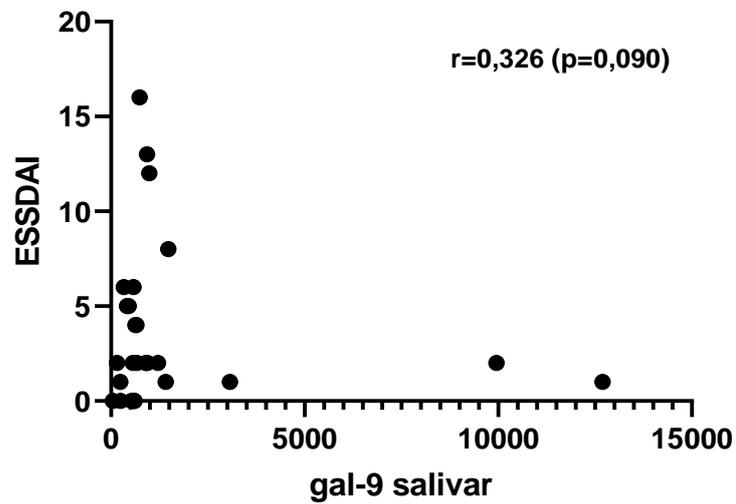


(B)

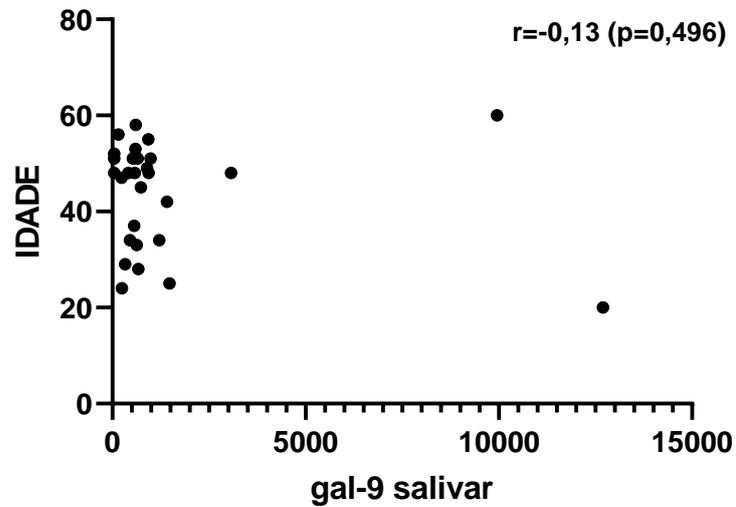


(C)

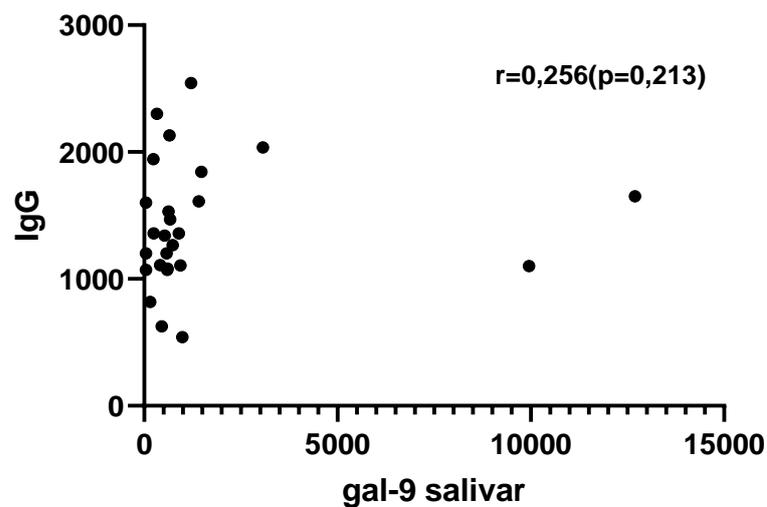
Grafico 3- Níveis salivares da galectina 9 em pacientes portadores de SSP correlacionados com as variáveis ESSDAI(A), Idade(B) e IgG sérica(C), respectivamente.



(A)



(B)



(C)

Na Tabela 5 se apresentam os resultados da gal-9 no soro e na saliva e suas associações, segundo as categorias das variáveis: anti-Ro (SSA), anti-La (SSB), teste de Schirmer, fluxo salivar, uso dos medicamentos, manifestações extra-glandulares e graus de acometimento de glândula parótida e submandibular. Foram observados maiores níveis de gal-9 na saliva de pacientes com Anti-La/SSB positivo e com presença de manifestações extraglandulares.

Tabela 5 – Associação entre os níveis de gal-9 no soro e na saliva, segundo as variáveis relacionadas a autoanticorpos, testes de secura, medicações e achados ultrassonográficos de glândulas salivares no grupo SSP.

Variável	Soro	Saliva
Anti-Ro (SSA)	Mediana (P25;P75)	Mediana (P25;P75)
Positivo	2305,91 (1915,00; 2952,12)	655,70 (508,73; 1097,82)
Negativo	1967,27 (1525,61; 3075,23)	238,12 (25,70; 738,73)
Valor de p	p⁽¹⁾ = 0,409	p⁽¹⁾ = 0,072
Anti-La (SSB)		
Positivo	2222,58 (1624,09; 3033,94)	927,80 (599,30; 1411,01)
Negativo	2210,45 (1881,67; 2843,79)	526,00 (198,00; 816,91)
Valor de p	p⁽¹⁾ = 0,978	p⁽¹⁾ = 0,029*
Teste de Schirmer		
Positivo	2190,76 (1824,09; 2992,27)	627,56 (422,26; 970,12)
Negativo	2425,61 (1946,06; 3180,91)	625,40 (245,44; 1482,00)
Valor de p	p⁽¹⁾ = 0,549	p⁽¹⁾ = 0,8272
Teste Fluxo salivar		
Positivo	2415,00 (1883,94; 2984,70)	612,44 (311,33; 941,92)
Negativo	2305,91 (1657,42; 0,00)	938,11 (564,81; 1211,00)
Valor de p	p⁽¹⁾ = 0,535	p⁽¹⁾ = 0,397
Uso de imunomodulador e/ou imunossupressor		
Sim*	2264,24 (1882,80; 2943,79)	600,54 (311,30; 930,39)
Não	2514,24 (1688,48; 5778,82)	1053,27 (454,03; 4285,52)
Valor de p	p⁽¹⁾ = 0,695	p⁽¹⁾ = 0,214
Ultrassonografia de glândulas salivares		
Graus 0 e 1	2492,01 (1671,1; 3410,5)	412,1 (190,19; 1041,00)
Graus 2 e 3	2573,01 (2083,01; 2977,02)	655,72 (573,66; 1347,27)
Valor de p	p⁽¹⁾ = 0,979	p⁽¹⁾ = 0,298
Presença de manifestação extra-glandular		
Sim	2360,45 (2060,45; 2988,48)	816,91 (569,18; 1361,45)
Não	1915,00 (1479,01; 2809,70)	328,72 (46,87; 581,00)
Valor de p	p⁽¹⁾ = 0,224	p⁽¹⁾ = 0,002*

(*) Pacientes em uso de hidroxicloroquina isoladamente ou associado com outros imunossupressores (metotrexate, leflunomida, azatioprina, ciclofosfamida ou rituximabe)

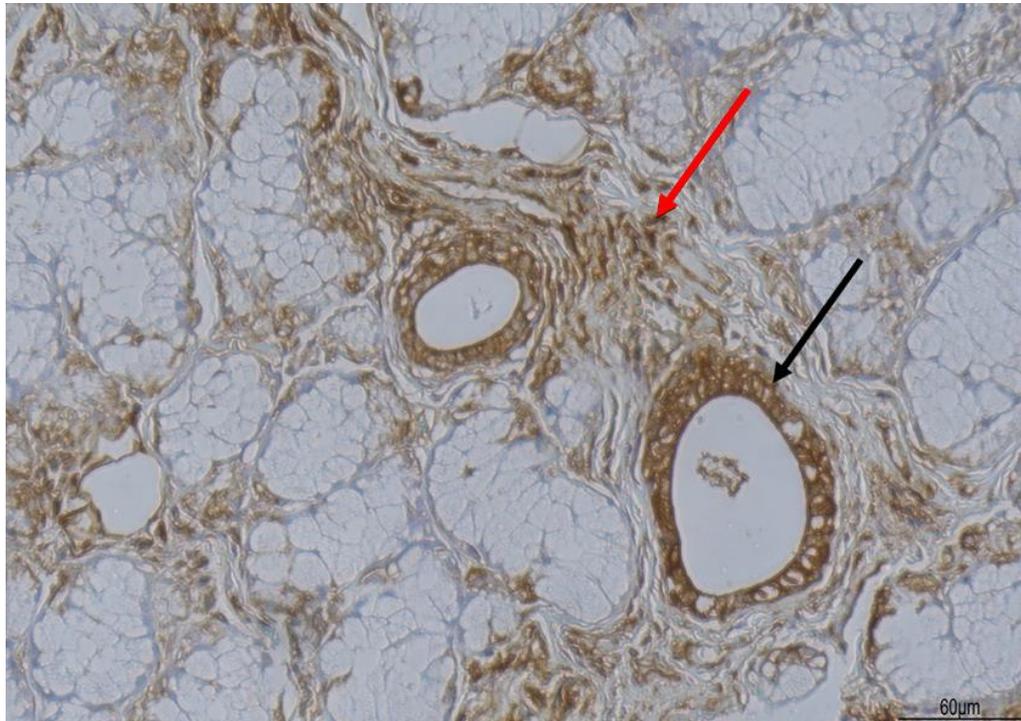
(1) Pelo teste Mann-Whitney.

6.3 ACHADOS DESCRITIVOS DA IMUNOHISTOQUÍMICA DA GAL-9

O estudo imuno-histoquímico realizado nos tecidos provenientes das biópsias de glândulas salivares disponíveis de pacientes portadoras de SSP revelou que 7/16 (43%) tiveram marcação positiva no estroma e 14/16 (87,5%) nas células ductais. Na figura 5 pode-se observar lâminas de biópsias com marcação positiva (A) e os controles negativo (B) e positivo (C).

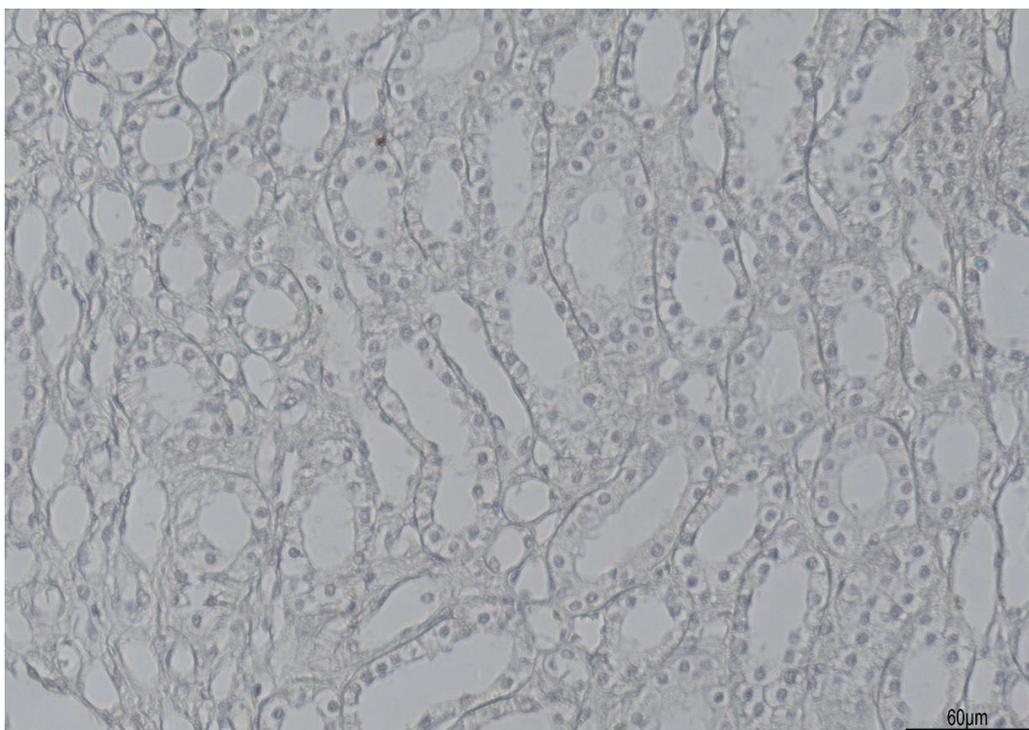
Figura 6 – Marcação positiva de Gal-9 nas células ductais e no estroma de tecido glandular salivar menor de paciente com SSP (A), Controle Negativo (B), Controle Positivo (C).

Marcação positiva de Gal-9 nas células ductais e em células do infiltrado inflamatório



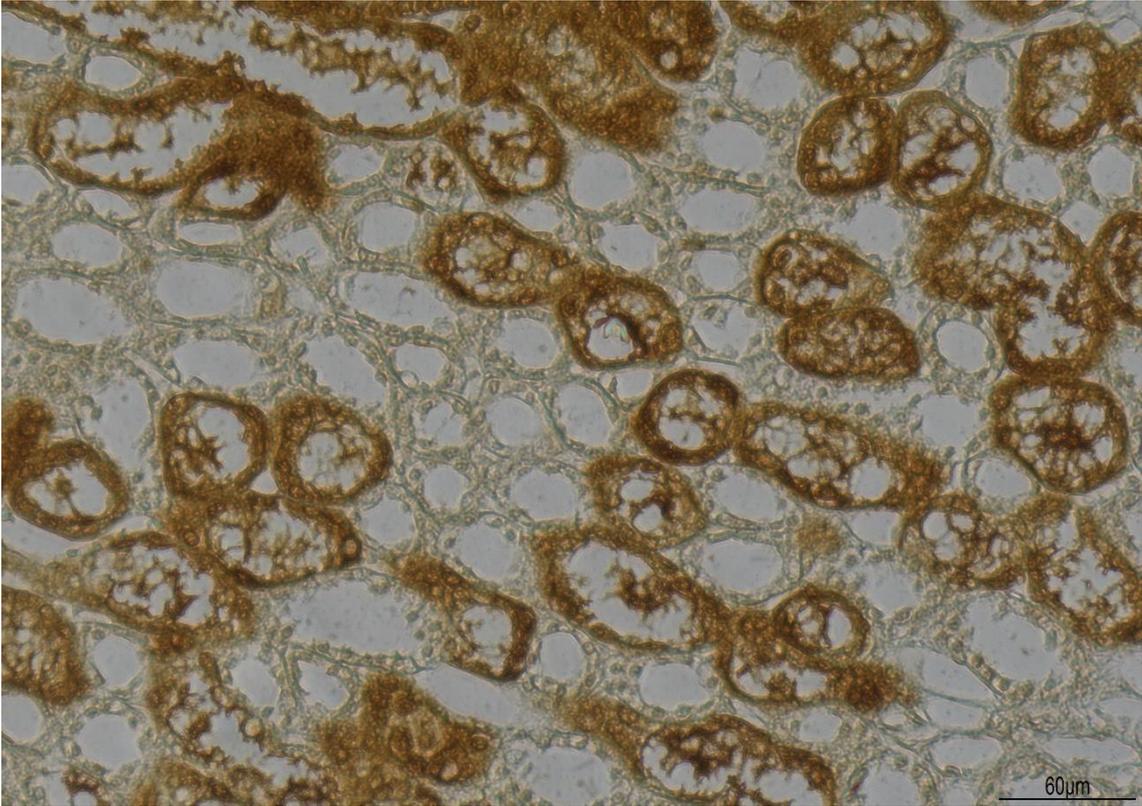
→ Células do Infiltrado Inflamatório → Células Ductais
(A)

Controle negativo gal-9 (RIM)



(B)

Controle positivo gal-9 (RIM)



(C)

7 DISCUSSÃO

Neste trabalho foram estudados os níveis de gal-9 no soro e, de forma inédita, na saliva de pacientes portadores de SSP e foram realizadas comparações com medidas relacionadas à atividade da doença e fatores que pudessem influenciar nessa atividade.

No que se refere à galectina-9 no soro, a mediana dos controles foi estatisticamente superior do que a dos pacientes. O fato da maioria dos pacientes do presente estudo estar em atividade leve da doença (mediana ESSDAI=2) e mais de 80% estarem sob o uso de imunomediadores ou imunossupressores, pode ter influenciado nesse resultado. Diferentemente dos nossos achados, o trabalho de Van den Hoogen e cols. (2018) mostrou níveis circulantes maiores dessa lectina em pacientes com SSP, comparado com outros participantes que tinham síndrome sicca (não relacionado à SSj) ou com o grupo controle (VAN DEN HOOGEN et al., 2018a). É importante salientar que esse estudo de Van den Hoogen não descreveu detalhes sobre o tempo de doença dos pacientes, o grau de atividade nem as medicações em uso, fatores os quais poderiam ajudar a esclarecer esses achados divergentes.

De forma inédita, o presente estudo identificou níveis mais elevados de gal-9 na saliva de pacientes com SSP em comparação com controles saudáveis. Esse achado pode ser um reflexo do microambiente inflamatório crônico que ocorre no tecido glandular, no qual classicamente encontramos a presença de linfócitos T CD4+ e linfócitos B (HOCHBERG, 2015), os quais podem expressar TIM-3 (IWASAKI-HOZUMI et al., 2021). Como uma forma de atenuar esse processo inflamatório, mais gal-9 pode estar sendo produzida, para que, ao interagir com o receptor TIM-3, possa levar à apoptose das células T e, ao interagir com o CD45, inibir a proliferação de céls B.

Em relação ao ESSDAI e à IgG, não foi observada correlação entre níveis séricos e salivares de gal-9 e esses parâmetros. Van den Hoogen e cols. (2018), também fizeram correlação semelhante e investigaram a gal-9 sérica em pacientes com SSP, encontrando em resultados preliminares uma correlação positiva dessa galectina com ESSDAI ($r=0,43$; $p=0.004$) e com a IgG ($r=0,64$ ($p<0.001$)) (Van den Hoogen, 2018). Entretanto, a indisponibilidade de dados da amostra referentes à mediana do ESSDAI, média da IgG dos pacientes, dificulta a realização de

comparações com o presente estudo. Caso o número de pacientes fosse maior, talvez uma correlação forte pudesse ser encontrada, sendo necessários mais estudos para avaliar essa relação.

Sobre a USG de glândulas parótidas e submandibulares, foi encontrado que a mediana da gal-9, tanto no soro como na saliva, foi superior nos pacientes que apresentavam uma classificação de grau 2 e 3, ou seja, compatíveis com SS, quando comparados com pacientes de grau 0 ou 1, porém, sem significância estatística. Os fatores que poderiam aumentar o poder estatístico dessa relação a inclusão de mais pacientes, e, também, realizar esse exame em controles saudáveis.

Apesar de serem descritas correlações de altos escores ultrassonográficos em pacientes portadores de Sjögren com os níveis de IgG, presença do AntiRo-SSa, vasculite cutânea e presença de centros germinativos na biópsia de glândula salivar (THEANDER; MANDL, 2014), até o momento, não se tem relato na literatura de trabalhos que fizeram análise de achados ultrassonográficos com galectina-9 em pacientes com SSP, o que reforça o caráter inovador deste estudo.

Ao se avaliar a relação entre os níveis de gal-9 sérico e salivar com anticorpos, testes de secura, uso de medicações e presença de manifestações extra-glandulares, observou-se, que nos pacientes que apresentavam manifestações extra-glandulares, a dosagem da gal-9 salivar foi maior do que os que tinham apenas sintomas glandulares, o que pode também ser um reflexo de uma maior agressão epitelial e infiltração linfocitária.

O achado da relação da gal-9 salivar e a positividade do autoanticorpo Anti-La/SSb pode ser uma tradução indireta da agressão autoimune que está acontecendo a nível celular no parênquima das glândulas salivares, fazendo com que essa proteína La/SSb, que na verdade é intracelular, esteja sendo exposta na membrana celular e, dessa forma, esteja sendo apresentada a células do sistema imune, levando a um aumento na produção de gal-9. Mais estudos com são necessários para se confirmar esses achados.

De acordo com a literatura, um trabalho que utilizou, em pacientes portadores de SSP, a hidroxicloroquina juntamente com leflunomida, outra droga antirreumática modificadora da doença, demonstrou que a gal-9 pode ser utilizada como biomarcador

de resposta à terapêutica com hidroxicloroquina e/ou leflunomida, além de dosagem de outros marcadores da assinatura do interferon (Van den Hoogen, 2018; Van der Heijden et al., 2019). Entretanto, como no presente estudo apenas uma paciente estava em uso desse DMARD, e foi avaliada transversalmente, não foi possível essa análise.

Acerca da análise imuno-histoquímica da marcação das gal-9 dos pacientes, encontrou-se uma marcação positiva tanto em células ductais quanto em células estromais. Não foram encontrados trabalhos semelhantes com esse tipo de avaliação para efetuar comparações. Até o momento, não está esclarecido se, em condições fisiológicas, a gal-9 é encontrada em tecidos glandulares saudáveis, portanto, sua presença nesse tecido pode ser um reflexo da infiltração de outros tipos celulares que podem expressar a gal-9 (HIRASHIMA et al., 2002) ou da própria ação das células epiteliais, as quais, em condições patológicas, podem funcionar como células apresentadoras de antígenos, ao expor autoantígenos em sua membrana e perpetuar o ciclo de ativação da resposta imune. Esse estado ativado pode, por meios ainda não esclarecidos, fazer com que essas células expressem gal-9. (RISCHMUELLER; TIEU; LESTER, 2016).

Entre as limitações do presente estudo destaca-se o tamanho da amostra que pode não ter sido suficiente para detectar associações entre os níveis de gal-9 e parâmetros clínicos e laboratoriais da doença. A ampliação da quantidade de pacientes em variados graus de atividade de doença, pode contribuir na investigação do potencial da gal-9 como biomarcador na SSP, uma vez que o fato da maioria das pacientes estar com a doença bem controlada e em uso de medicações, pode ter influenciado nos resultados.

Estudar partes saudáveis do tecido da biópsia glandular e pacientes saudáveis são alternativas que podem aumentar a evidência dos achados inéditos imunohistoquímicos do presente estudo ao avaliar a presença de gal-9 em condições fisiológicas. Analisar de forma mais detalhada os subtipos celulares do infiltrado inflamatório que expressam essa galectina podem abrir caminho para novos estudos envolvendo alvos terapêuticos na SSP.

Aprofundar o conhecimento sobre a participação das gals no desenvolvimento da Síndrome de Sjögren e suas correlações com marcadores clínicos e histológicos,

é de fundamental importância, uma vez que, essas condições ainda apresentam mecanismos patogênicos ainda obscuros e multifatoriais. Esses achados especulativos requerem pesquisas adicionais para estabelecer reprodutibilidade, generalização e utilidade na avaliação de pacientes acometidos por essa síndrome.

8 CONCLUSÃO

- Os níveis de gal-9 no soro de pacientes portadores de SSP se apresentaram estatisticamente menores comparados a controles saudáveis.
- Os níveis de gal-9 salivar se apresentaram estatisticamente maiores em pacientes portadores de SSP e se correlacionaram com a presença de manifestações extra-glandulares e a positividade do anticorpo Anti-La/SSb,
- Os níveis de gal-9 salivar e sérica não apresentaram associação com achados ultrassonográficos
- Os níveis de gal-9 no soro e na saliva não apresentaram correlação estatisticamente significativa com escore de atividade ESSDAI, IgG, idade.
- Não foi encontrada associação entre os níveis de gal-9 no soro e na saliva segundo testes de securo, medicações e o Anticorpo Anti-Ro e também não houve associação entre o o nível de gal-9 no soro e Anti-La.
- A análise das biópsias glandulares permitiu a observação da expressão aumentada de gal-9 nas células ductais e do estroma em pacientes portadores de SSP.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA-RODRÍGUEZ, E. V. et al. Galectin-3 Mediates IL-4-Induced Survival and Differentiation of B Cells: Functional Cross-Talk and Implications during *Trypanosoma cruzi* Infection. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 1, p. 493–502, 1 jan. 2004.
- BAER, A. **Clinical manifestations of Sjögren’s syndrome: Extraglandular disease**. Disponível em: <https://www.uptodate.com/contents/clinical-manifestations-of-sjogrens-syndrome-extraglandular-disease?search=sjogren&source=search_result&selectedTitle=3~150&usage_type=default&display_rank=3>. Acesso em: 25 mar. 2021a.
- BAER, A. **Diagnosis and classification of Sjögren’s syndrome**. Disponível em: <https://www.uptodate.com/contents/diagnosis-and-classification-of-sjogrens-syndrome?search=sjogren&source=search_result&selectedTitle=2~150&usage_type=default&display_rank=2#H19529727>. Acesso em: 25 mar. 2022b.
- BAER, A.; DESHMUKH, U. **Pathogenesis of Sjögren’s syndrome**. Disponível em: <https://www.uptodate.com/contents/pathogenesis-of-sjogrens-syndrome?search=Pathogenesis%20of%20Sj%C3%B6gren%27s%20syndrome.%20&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1>. Acesso em: 6 maio. 2021.
- BENDE, R. J. et al. Salivary Gland Mucosa-Associated Lymphoid Tissue–Type Lymphoma From Sjögren’s Syndrome Patients in the Majority Express Rheumatoid Factors Affinity-Selected for IgG. **Arthritis & Rheumatology**, v. 72, n. 8, p. 1330–1340, 8 ago. 2020.
- BERARDICURTI, O. et al. Association Between Minor Salivary Gland Biopsy During Sjögren’s Syndrome and Serologic Biomarkers: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 11 jun. 2021.
- BOTH, T. et al. **Reviewing primary Sjögren’s syndrome: Beyond the dryness - From pathophysiology to diagnosis and treatment** *International Journal of Medical Sciences* Ivyspring International Publisher, , 2017.
- BRANDT, J. E. et al. **Sex differences in Sjögren’s syndrome: A comprehensive review of immune mechanisms** *Biology of Sex Differences* BioMed Central Ltd., , 3 nov. 2015.
- CERLIANI, J. P. et al. **Translating the ‘Sugar Code’ into Immune and Vascular Signaling Programs** *Trends in Biochemical Sciences* Elsevier Ltd, , 1 abr. 2017.
- CHEN, H. L. et al. Galectin-7 downregulation in lesional keratinocytes contributes to enhanced IL-17A signaling and skin pathology in psoriasis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 131, n. 1, 4 jan. 2021.
- CORNEC, D. et al. Salivary gland ultrasonography improves the diagnostic performance of the 2012 American college of rheumatology classification criteria for sjögren’s syndrome. **Rheumatology (United Kingdom)**, v. 53, n. 9, p. 1604–1607, 2014.

DEL POZO, V. et al. Gene Therapy with Galectin-3 Inhibits Bronchial Obstruction and Inflammation in Antigen-challenged Rats through Interleukin-5 Gene Downregulation. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 166, n. 5, p. 732–737, set. 2002.

DHIRAPONG, A. et al. **The immunological potential of galectin-1 and -3** **Autoimmunity Reviews**, mar. 2009. . Acesso em: 2 jan. 2020

DI GAETANO, S. et al. Design, Synthesis, and Anticancer Activity of a Selenium-Containing Galectin-3 and Galectin-9N Inhibitor. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 5, 1 mar. 2022.

DINGS, R. P. M. et al. Antitumor agent calixarene 0118 targets human galectin-1 as an allosteric inhibitor of carbohydrate binding. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 11, p. 5121–5129, 14 jun. 2012.

ENOCSSON, H. et al. Comparison of Surrogate Markers of the Type I Interferon Response and Their Ability to Mirror Disease Activity in Systemic Lupus Erythematosus. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 30 jun. 2021.

FIRESTEIN, G. S.; KELLEY, W. N. **Kelley's textbook of rheumatology**. 9th. ed. Philadelphia: Philadelphia, PA : Elsevier/Saunders, c2013., 2013. v. 2 v.

FISHER, B. A. et al. Standardisation of labial salivary gland histopathology in clinical trials in primary Sjögren's syndrome. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 76, n. 7, p. 1161–1168, jul. 2017.

FOX, R. I. et al. Cytokine mRNA expression in salivary gland biopsies of Sjögren's syndrome. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 152, n. 11, p. 5532–9, 1 jun. 1994.

GABIUS, H.-J.; ROTH, J. An introduction to the sugar code. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 147, n. 2, p. 111–117, 2017.

GIACOMELLI, R. et al. Guidelines for biomarkers in autoimmune rheumatic diseases - evidence based analysis. **Autoimmunity reviews**, v. 18 1, p. 93–106, 2019.

GOULES, A. V.; TZIOUFAS, A. G. Diagnostic value of ultrasonography in Sjögren's syndrome. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 10, n. 8, 3 ago. 2014.

GRIGORIAN, A. et al. Control of T Cell-mediated Autoimmunity by Metabolite Flux to N-Glycan Biosynthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 27, p. 20027–20035, jul. 2007.

HEUSSCHEN, R.; GRIFFIOEN, A. W.; THIJSSSEN, V. L. Galectin-9 in tumor biology: A jack of multiple trades. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1836, n. 1, p. 177–185, 2013.

HIRASHIMA, M. et al. Galectin-9 in physiological and pathological conditions. **Glycoconjugate Journal**, v. 19, n. 7–9, p. 593–600, 2002.

HOCHBERG. **Rheumatology**. 6th. ed. [s.l.] Elsevier, 2015.

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.

IWASAKI-HOZUMI, H. et al. **Blood levels of Galectin-9, an immuno-regulating molecule, reflects the severity for the acute and chronic infectious diseases** *Biomolecules* MDPI AG, , 1 mar. 2021.

JOHN, S.; MISHRA, R. **Galectin-9: From cell biology to complex disease dynamics** *Journal of Biosciences* Springer India, , 1 set. 2016.

JONSSON, R. et al. Current concepts on Sjögren's syndrome – classification criteria and biomarkers. **European Journal of Oral Sciences**, v. 126, p. 37–48, 1 out. 2018.

JOUSSE-JOULIN, S. et al. Is salivary gland ultrasonography a useful tool in Sjögren's syndrome? A systematic review. **Rheumatology (United Kingdom)**, v. 55, n. 5, p. 789–800, 2016.

JOUSSE-JOULIN, S. et al. Video clip assessment of a salivary gland ultrasound scoring system in Sjögren's syndrome using consensual definitions: An OMERACT ultrasound working group reliability exercise. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 78, n. 7, p. 967–973, 2019.

JOUSSE-JOULIN, S.; COIFFIER, G. **Current status of imaging of Sjogren's syndrome** *Best Practice and Research: Clinical Rheumatology* Bailliere Tindall Ltd, , 1 dez. 2020.

JUNG, J. Y. et al. **Salivary biomarkers in patients with sjögren's syndrome— a systematic review** *International Journal of Molecular Sciences* MDPI, , 1 dez. 2021.

KIM, S. J. et al. Galectin-7 is epigenetically-regulated tumor suppressor in gastric cancer. **Oncotarget**, v. 4, n. 9, p. 1461–1471, 2013.

KROESE, F.; HAACKE, E.; BOMBARDIERI, M. The role of salivary gland histopathology in primary Sjögren's syndrome: promises and pitfalls. **Clinical and experimental rheumatology**, p. 222–233, 2018.

LEE, J. et al. **Distinct clinical characteristics of anti-Ro/SSA-negative primary Sjögren's syndrome: data from a nationwide cohort for Sjögren's syndrome in Korea** *Clin Exp Rheumatol*. [s.l: s.n.].

LI, F.-Y. et al. Galectins in Host Defense Against Microbial Infections. In: HSIEH, S.-L. (Ed.). **Lectin in Host Defense Against Microbial Infections**. Singapore: Springer Singapore, 2020. p. 141–167.

LV, R.; BAO, Q.; LI, Y. Regulation of M1-type and M2-type macrophage polarization in RAW264.7 cells by Galectin-9. **Molecular Medicine Reports**, v. 16, n. 6, p. 9111–9119, 1 dez. 2017.

MANFRÈ, V. et al. One year in review 2020: comorbidities, diagnosis and treatment of primary Sjögren's syndrome. **Clinical and experimental rheumatology**, v. 38 Suppl 126, n. 4, p. 10–22, 2020.

MARTÍNEZ ALLO, V. C. et al. Suppression of age-related salivary gland autoimmunity by glycosylation-dependent galectin-1-driven immune inhibitory circuits. 2020.

MATSUMOTO, H. et al. Association between inflammatory cytokines and immune-checkpoint molecule in rheumatoid arthritis. **PLoS ONE**, v. 16, n. 11 November, 1 nov. 2021.

MATSUOKA, N. et al. Galectin-9 as a biomarker for disease activity in systemic lupus erythematosus. **PLoS ONE**, v. 15, n. 1, 1 jan. 2020.

MATSUSHITA, N. et al. Requirement of divalent galactoside-binding activity of ecalectin/galectin-9 for eosinophil chemoattraction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 12, p. 8355–8360, 2000.

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. 9, 2019.

MOAR, P.; TANDON, R. Galectin-9 as a biomarker of disease severity. **Cellular Immunology**, v. 361, p. 104287, mar. 2021.

NABI, I. R.; SHANKAR, J.; DENNIS, J. W. The galectin lattice at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 128, n. 13, p. 2213–2219, 2015.

NELSON, D.; COX, M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 7th. ed. [s.l.] Grupo A, 2018. v. 1

NÓBREGA, R. B. **Análise estrutural do domínio de reconhecimento a carboidratos da lectina DvirL de Dioclea virgata e sua correlação na indução da produção de óxido nítrico**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/tede/3642>>. Acesso em: 30 maio. 2021.

PAGANOTTI, M. A. et al. Validation and psychometric properties of the EULAR Sjögren's Syndrome Patient Reported Index (ESSPRI) into Brazilian Portuguese. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 55, n. 5, p. 439–445, 2015.

PANDA, S. K. et al. Galectin-9 inhibits TLR7-mediated autoimmunity in murine lupus models. **Journal of Clinical Investigation**, v. 128, n. 5, p. 1873–1887, 1 maio 2018.

PARMERA, D. **DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO DE AVALIAÇÃO DE PROTÓTIPOS VACINAIS EM LINHAGEM DE MONÓCITO HUMANA (THP-1)**. Rio de Janeiro: Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, em parceria com o Instituto Oswaldo Cruz, 2007.

POROLA, P. et al. Androgen deficiency and defective intracrine processing of dehydroepiandrosterone in salivary glands in Sjögren's syndrome. **Journal of Rheumatology**, v. 35, n. 11, p. 2229–2235, nov. 2008.

RABINOVICH, G. A. et al. Recombinant Galectin-1 and Its Genetic Delivery Suppress Collagen-Induced Arthritis via T Cell Apoptosis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 190, n. 3, p. 385–398, 2 ago. 1999.

RABINOVICH, G. A.; TOSCANO, M. A. **Turning “sweet” on immunity: Galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation** *Nature Reviews Immunology*, maio 2009.

RAMOS-CASALS, M. et al. Sjögren syndrome or Sjögren disease? The histological and immunological bias caused by the 2002 criteria. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, v. 38, n. 2–3, p. 178–185, abr. 2010.

RAMOS-CASALS, M. et al. **Topical and systemic medications for the treatment of primary Sjögren’s syndrome** *Nature Reviews Rheumatology*, jul. 2012.

RAMOS-CASALS, M. et al. EULAR recommendations for the management of Sjögren’s syndrome with topical and systemic therapies. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 79, n. 1, p. 3–18, 1 jan. 2020.

RISCHMUELLER, M.; TIEU, J.; LESTER, S. Primary Sjögren’s syndrome. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 30, n. 1, p. 189–220, 2016.

ROSAS, J. et al. ESSDAI activity index of the SJÖGRENSER cohort: analysis and comparison with other European cohorts. **Rheumatology International**, 2019.

SAIGUSA, R. et al. Systemic Sclerosis Dermal Fibroblasts Suppress Th1 Cytokine Production via Galectin-9 Overproduction due to Fli1 Deficiency. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 137, n. 9, p. 1850–1859, 1 set. 2017.

SALAMANNA, F. et al. **Role and translational implication of galectins in arthritis pathophysiology and treatment: A systematic literature review** *Journal of Cellular Physiology* Wiley-Liss Inc., , 1 fev. 2019.

SEKI, M. et al. Galectin-9 suppresses the generation of Th17, promotes the induction of regulatory T cells, and regulates experimental autoimmune arthritis. **Clinical Immunology**, v. 127, n. 1, p. 78–88, 2008.

SEROR, R. et al. EULAR Sjögren’s syndrome disease activity index (ESSDAI): A user guide. **RMD Open**, v. 1, n. 1, p. 1–9, 2015.

SHIBOSKI, C. H. et al. 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. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 76, n. 1, p. 9–16, 1 jan. 2017.

SHIBOSKI, S. C. et al. **American College of Rheumatology Classification Criteria for Sjögren’s Syndrome: A Data-Driven, Expert Consensus Approach in the SICCA Cohort.** [s.l: s.n.].

SHINJO, S.; MOREIRA, C. LIVRO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA. In: 2a. ed. [s.l.] Editora Manole, 2020.

SONG, G. G.; LEE, Y. H.; LEE, Y. H. **Diagnostic accuracies of sialography and salivary ultrasonography in Sjögren’s syndrome patients: a meta-analysis** *Clinical and Experimental Rheumatology*. [s.l: s.n.].

TABRIZI, S. J. et al. T Cell Leukemia/Lymphoma 1 and Galectin-1 Regulate Survival/Cell Death Pathways in Human Naive and IgM + Memory B Cells through

Altering Balances in Bcl-2 Family Proteins. **The Journal of Immunology**, v. 182, n. 3, p. 1490–1499, 1 fev. 2009.

TAKAGI, Y. et al. Salivary gland ultrasonography: Can it be an alternative to sialography as an imaging modality for Sjögren's syndrome? **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 69, n. 7, p. 1321–1324, jul. 2010.

THEANDER, E.; MANDL, T. Primary Sjögren's syndrome: Diagnostic and prognostic value of salivary gland ultrasonography using a simplified scoring system. **Arthritis Care and Research**, v. 66, n. 7, p. 1102–1107, 2014.

TOSCANO, M. A. et al. Untangling Galectin-Driven Regulatory Circuits in Autoimmune Inflammation. **Trends in Molecular Medicine**, v. 24, n. 4, p. 348–363, 2018.

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, 18 dez. 2019.

TÜRECI, Ö. et al. Molecular definition of a novel human galectin which is immunogenic in patients with Hodgkin's disease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 10, p. 6416–6422, 1997.

VALIM, V. et al. PREVALÊNCIA DA SÍNDROME DE SJÖGREN PRIMÁRIA EM IMPORTANTE ÁREA METROPOLITANA NO BRASIL. v. 53, n. 1, p. 29–34, 2013.

VAN DEN HOOGEN, L. L. et al. Galectin-9 reflects the interferon signature and correlates with disease activity in systemic autoimmune diseases. **Annals of the Rheumatic Diseases**, 1 jan. 2018a.

VAN DEN HOOGEN, L. L. et al. Galectin-9 is an easy to measure biomarker for the interferon signature in systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 77, n. 12, p. 1810–1814, 1 dez. 2018b.

VAN DER HEIJDEN, E. H. M. et al. Additive immunosuppressive effect of leflunomide and hydroxychloroquine supports rationale for combination therapy for Sjögren's syndrome. **Expert Review of Clinical Immunology**, v. 15, n. 7, p. 801–808, 3 jul. 2019.

VASCONCELOS, J. T. **Livro da sociedade brasileira de reumatologia**. 1st. ed. Barueri: Manole, 2019. v. 1

VASTA, G. R. Galectins in Host–Pathogen Interactions: Structural, Functional and Evolutionary Aspects. In: HSIEH, S.-L. (Ed.). **Lectin in Host Defense Against Microbial Infections**. Singapore: Springer Singapore, 2020. p. 169–196.

VILAR, K. DE M. et al. Galectin-1, -4, and -7 Were Associated with High Activity of Disease in Patients with Rheumatoid Arthritis. **Autoimmune Diseases**, v. 2019, p. 3081621, 2019.

VITALI, C. et al. **The European Community Study Group on Diagnostic Criteria for Sjogren's Syndrome. Sensitivity and specificity of tests for ocular and oral involvement in Sjogren's syndrome** *Annals of the Rheumatic Diseases*. [s.l.: s.n.].

VITALI, C. et al. Sjögren's syndrome disease damage index and disease activity index: Scoring systems for the assessment of disease damage and disease activity in Sjögren's syndrome, derived from an analysis of a cohort of Italian patients. **Arthritis and Rheumatism**, v. 56, n. 7, p. 2223–2231, 2007.

VITALI, C.; BOMBARDIERI, S.; JONSSON, R. Classification criteria for Sjögren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. 2002.

VLADOIU, M. C. et al. **Design of a peptidic inhibitor that targets the dimer interface of a prototypic galectin**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <www.impactjournals.com/oncotarget/>.

WHITCHER, J. P. et al. A Simplified Quantitative Method for Assessing Keratoconjunctivitis Sicca From the Sjögren's Syndrome International Registry. **American Journal of Ophthalmology**, v. 149, n. 3, p. 405–415, mar. 2010.

WIERSMA, V. R. et al. Galectin-9 is a possible promoter of immunopathology in rheumatoid arthritis by activation of peptidyl arginine deiminase 4 (PAD-4) in Granulocytes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 16, 2 ago. 2019.

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.

YANG, R. et al. Development and characterization of anti-galectin-9 antibodies that protect T cells from galectin-9-induced cell death. **Journal of Biological Chemistry**, v. 298, n. 4, p. 101821, abr. 2022.

YANG, R.-Y.; RABINOVICH, G. A.; LIU, F.-T. Galectins: structure, function and therapeutic potential. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 10, p. e17, 2008.

YOON, T. et al. **Serum galectin-9 could be a potential biomarker in assessing the disease activity of antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis Gal-9 in ANCA-associated vasculitis / T. Yoon et al** **Clinical and Experimental Rheumatology**. [s.l.: s.n.].

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, 1 out. 2014.

ZHANG, X. et al. A pilot study to demonstrate diagnostic potential of galectin-3 levels in saliva. **Journal of Clinical Pathology**, v. 69, n. 12, p. 1100–1104, 2016a.

ZHANG, X. et al. A pilot study to demonstrate diagnostic potential of galectin-3 levels in saliva. **Journal of Clinical Pathology**, v. 69, n. 12, p. 1100–1104, 1 dez. 2016b.

APÊNCIDES

APÊNDICE A – FICHA CLÍNICA DE PACIENTES COM SÍNDROME DE SJÖGREN



**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UFPE
FILIAL DA EMPRESA BRASILEIRA
DE SERVIÇOS HOSPITALARES**

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 2015 e
- () Maior de 18 anos;

I. Sintomas oculares	Sim	Não	Não Realizado
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?			
II. Sintomas orais	Sim	Não	
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 íquidos para ajudar a engolir alimentos secos?			
III. Sinais oculares	Sim	Não	Não realizado
Evidência de envolvimento ocular definido como um teste positivo em um dos seguintes:			
Teste de Schirmer tipo I, sem anestesia (≤ 5 mm em 5 minutos)			
Escore de Rosa Bengala ou outro teste de olho seco (escore >4 de van Bijsterveld)			
IV. Histopatologia:	Sim	Não	Não realizado
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^2 de tecido glandular			
V. Envolvimento de glândula salivar	Sim	Não	Não realizado
Envolvimento objetivo definido por um teste positivo em um dos seguintes:			
Fluxo salivar total não estimulado ($<1,5\text{ml}$ 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			
VI. Autoanticorpos	Sim	Não	Não realizado
Presença sérica do anticorpo anti-Ro (SSA)			
Presença sérica do anticorpo anti-La (SSB)			

SSj 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^2
3. Ceratoconjuntivite seca com OSS escore ≥ 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, 2015

	Sim	Não	Não realizado
• Presença sérica de anticorpo anti-Ro (SSA) → 3 pontos			

<ul style="list-style-type: none"> • 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 4mm² de tecido glandular. → 3 pontos 			
<ul style="list-style-type: none"> • OSS (Ocular Score Sicca) ≥ 5 → 1 ponto 			
<ul style="list-style-type: none"> • Teste de Schirmer tipo I, sem anestesia (≤5mm em 5 minutos) → 1 ponto 			
<ul style="list-style-type: none"> • Fluxo salivar total não estimulado (<0,1ml em 15 minutos) → 1 ponto 			
Total: 9 pontos			

SS Primário, de acordo com Critérios Americano-Europeu 2015 é definido pela presença de ≥ 4 pontos.

III - CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Pelo menos 1 das doenças ou item abaixo	Sim	Não
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 ²) :	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 ()
Lipossustituição	Leve () moderada () acentuada ()
Padrão histológico*	1() 2() 3() 4()

- * Focal¹, Inespecífica², Atrofiante³, Esclerosante³

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-Sc170					
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			

Metotrexato			
Leflunomida			
Azatioprina			
Baixa dose de corticóide ($\leq 20\text{mg/d}$)			
Alta dose de corticóide ($>20\text{mg/d}$)			
Ciclofosfamida			
Micofenolato mofetil			
Imunoglobulina			
Rituximabe			
Outro biológico. Qual?			
Outro imunossupressor. Qual?			
Anti-inflamatório não esteroideal			
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 a x mia x mia se aginal

Dispneia a id fe de peso lin omegalia

Aumento de parótidas fad de le força pa sias

envolvimento cutâneo

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

ESSDAI INICIAL

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		
ESCORE TOTAL ESSDAI (soma dos domínios) :			

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		
ESCORE TOTAL ESSDAI (soma dos domínios) :			

ESSPRI ATUAL

	Pontuação de 1 a 10
• Fadiga	
• Dor articular	
• Sintomas de secura	
Total	

SSDDI – Sjogren's Syndrome Disease Damage Index

Item	Definição	cScore	Pontuação
1) Dano oral/saliva			
a) Prejuízo do fluxo salivar	Fluxo salivar não estimulado (<1,5ml/15min)	1	
b) Perda de dentes	Perda completa ou quase completa	1	
2) Dano ocular			
a) Prejuízo na lubrificação ocular	Schirmer < 5mm em 5min	1	
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):		2	
a) Fibrose pleural	a) Confirmado por imagem		
b) Fibrose intersticial	b) Confirmado por imagem		

c) Significante dano funcional irreversível	c) Confirmado por espirometria		
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 ⁹ /L)
Linfócitos		(10 ⁹ /L)
Plaquetas		(10 ⁹ /L)
Hemoglobina		(g/dL)
Hematócrito		
VHS		(mm/h)
PCR		(mg/dL)
Uréia		(mmol/L)
Creatinina		(µmol/L)
HCO ₃ ⁻		(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)
Triglicerídeos		(mg/dL)

XIV – ANÁLISE DA URINA (DATA: _____)

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

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 =	
	ESSDAI TOTAL:	

APÊNDICE B – FICHA DE CLASSIFICAÇÃO DA ULTRASSONOGRAFIA DAS GLÂNDULAS SALIVARES



[Digite aqui][Digite aqui]



NOME:

IDADE:

PRONTUÁRIO:

DATA:

USG DE GLÂNDULAS SALIVARES

REFERÊNCIA PARA CLASSIFICAÇÃO:

- 0- Parênquima normal
- 1- Mínima alteração: leve heterogeneidade, sem áreas hipo ou anecóicas
- 2- Moderada alteração: moderada heterogeneidade com áreas focais hipo ou anecóicas ardeadas por tecido normal
- 3- Severa alteração: heterogeneidade difusa com áreas hipo ou anecóicas ocupando toda a superfície glandular e sem tecido normal a redor.

Parótida gordurosa – não é possível classificar entre 0 e 3 porque o parênquima é homogêneo, porém hiperecôico em relação com o tecido adjacente

Parótida fibrosa- não é possível classificar entre 0 e 3 porque a parótida apresenta bandas hiperecôicas que se desenvolvem para um tecido fibrótico indistinguível dos tecidos moles adjacentes

se 0-1: inespecíficos 2-3: compatíveis com SSj

	Parótida Esq	Parótida Dir	Submandib E	Submandib D
Tamanho (LxT ou apenas T)				
Classificação				
Presença fibrose?				
Infiltração gordurosa?				
Presença de powerdoppler?				
Resistência Interna				

Classificação final :

Referência bibliográfica: Video clip assessment of a salivary gland ultrasound scoring system in Sjögren's syndrome using consensual definitions: an OMERACT ultrasound working group reliability exercise

Para o Doppler: usar uma frequência de 6,6-8MHz, filtro de parede baixo, o ROI englobando toda a estrutura de interesse, juntamente com um pulso de repetição para frequência (PRF), que varie de 700Hz a 1,4KHz. Durante o exame, deve ser realizada uma pressão mínima no transdutor de modo a evitar obliteração do vaso. Varrer nos planos longitudinal e transversal. A medida da resistência interna será obtida pela diferença entre o pico de velocidade sistólica e diastólica fina sobre o pico de velocidade sistólica.

APÊNDICE C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UFPE
FILIAL DA EMPRESA BRASILEIRA
DE SERVIÇOS HOSPITALARES



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS)

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa **AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS GALECTINAS 7 E 9 NO SORO E NA SALIVA DE PACIENTES PORTADORES DA SÍNDROME DE SJÖGREN PRIMÁRIA**, que está sob a responsabilidade da pesquisadora Paula Regina Toche dos Santos, Endereço: Av. Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Recife -PE, CEP 50740-900. Tel: 2126-3633; e-mail: paulatoche86@gmail.com.

Também participam desta pesquisa os pesquisadores: Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo (telefone:97943799; e-mail: moacyr.rego@gmail.com); Aysa César Pinheiro (telefone:999046690, e-mail: aysapinheiro@hotmail.com); Andrea Tavares Dantas (telefone:991721582; e-mail: andreatdantas@gmail.com),. e está sob a orientação de: Angela Luzia Branco Pinto Duarte (telefone:999288550; e-mail: angelabduarte@hotmail.com). Telefone do Ambulatório da Reumatologia: 2126-3575.

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 rubriche 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:

- **Descrição da pesquisa:** esta pesquisa busca estudar a relação entre os níveis da galectina 7 e 9, e as manifestações clínicas glandulares e extra-glandulares da Síndrome de Sjogren. Para tal estudo, será preenchida uma ficha com informações sociodemográficas, histórico da doença, achados do exame físico do entrevistado, além de questionários relacionados aos sintomas da doença. Além disso, realizaremos a coleta de sangue por profissional qualificado (30ml de sangue- equivalente a metade de um copo pequeno de café, através de uma punção em veia do braço); dosagem de saliva através da coleta em um copo plástico de forma espontânea ou estimula através da ingestão de sucção de um limão ou do ato de mascar um chiclete. Realizaremos o teste de Schirmer através da colocação delicada pelo examinador de uma fita de papel filtro entre o globo ocular e a pálpebra inferior do paciente. Além disso, também realizaremos a Ultrassonografia das glândulas parótidas. Os pacientes, a depender do critério do pesquisador, serão incluídos no grupo dos pacientes portadores da doença, ou então, no grupo controle.
- **Esclarecimento do período de participação do voluntário na pesquisa, início, término e número de visitas para a pesquisa:** esta pesquisa terá início após a aprovação no Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco e tem previsão de término em fevereiro de 2021. Os participantes da mesma serão acompanhados a cada 3 meses e poderão entrar em contato com o pesquisador por telefone ou vir pessoalmente ao Hospital das Clínicas em caso de dúvidas. Os pacientes que estão no grupo controle serão entrevistados apenas a quantidade de vezes suficiente para preencher a ficha sociodemográfica e clínica e realizados testes e exames.
- **RISCOS diretos** para o voluntário: risco baixo de hematoma (“mancha roxa”) no local da punção em decorrência da coleta de sangue, o que pode ser revertido em poucos dias ou horas com a colocação de gelo e solucionada com analgésicos simples em caso de dor. Os exames do fluxo salivar, teste do Schirmer e ultrassonografia de parótidas são indolores.

ANEXOS

ANEXO A – CRITÉRIOS CLASSIFICATÓRIOS PARA SÍNDROME DE SJÖGREN DO GRUPO CONSENSO AMERICANO-EUROPEU DE 2002

Table 2 Revised international classification criteria for Sjögren's syndrome

<p>I. Ocular symptoms: a positive response to at least one of the following questions:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Have you had daily, persistent, troublesome dry eyes for more than 3 months? 2. Do you have a recurrent sensation of sand or gravel in the eyes? 3. Do you use tear substitutes more than 3 times a day? <p>II. Oral symptoms: a positive response to at least one of the following questions:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Have you had a daily feeling of dry mouth for more than 3 months? 2. Have you had recurrently or persistently swollen salivary glands as an adult? 3. Do you frequently drink liquids to aid in swallowing dry food? <p>III. Ocular signs—that is, objective evidence of ocular involvement defined as a positive result for at least one of the following two tests:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Schirmer's I test, performed without anaesthesia (≤ 5 mm in 5 minutes) 2. Rose bengal score or other ocular dye score (≥ 4 according to van Bijsterveld's scoring system) <p>IV. Histopathology: In minor salivary glands (obtained through normal-appearing mucosa) focal lymphocytic sialoadenitis, evaluated by an expert histopathologist, with a focus score ≥ 1, defined as a number of lymphocytic foci (which are adjacent to normal-appearing mucous acini and contain more than 50 lymphocytes) per 4 mm² of glandular tissue¹⁸</p> <p>V. Salivary gland involvement: objective evidence of salivary gland involvement defined by a positive result for at least one of the following diagnostic tests:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Unstimulated whole salivary flow (≤ 1.5 ml in 15 minutes) 2. Parotid sialography showing the presence of diffuse sialectasias (punctate, cavitory or destructive pattern), without evidence of obstruction in the major ducts¹⁹ 3. Salivary scintigraphy showing delayed uptake, reduced concentration and/or delayed excretion of tracer²⁰ <p>VI. Autoantibodies: presence in the serum of the following autoantibodies:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Antibodies to Ro(SSA) or La(SSB) antigens, or both

Table 3 Revised rules for classification

For primary SS

In patients without any potentially associated disease, primary SS may be defined as follows:

- a. The presence of any 4 of the 6 items is indicative of primary SS, as long as either item IV (Histopathology) or VI (Serology) is positive
- b. The presence of any 3 of the 4 objective criteria items (that is, items III, IV, V, VI)
- c. The classification tree procedure represents a valid alternative method for classification, although it should be more properly used in clinical-epidemiological survey

For secondary SS

In patients with a potentially associated disease (for instance, another well defined connective tissue disease), the presence of item I or item II plus any 2 from among items III, IV, and V may be considered as indicative of secondary SS

Exclusion criteria:

Past head and neck radiation treatment
 Hepatitis C infection
 Acquired immunodeficiency disease (AIDS)
 Pre-existing lymphoma
 Sarcoidosis
 Graft versus host disease
 Use of anticholinergic drugs (since a time shorter than 4-fold the half life of the drug)

ANEXO B – CRITÉRIOS CLASSIFICATÓRIOS PARA SÍNDROME DE SJÖGREN DO COLÉGIO AMERICANO DE REUMATOLOGIA DE 2012

Table 7

Proposed classification criteria for Sjögren's syndrome¹.

The classification of Sjögren's syndrome, which applies to individuals with signs/symptoms that may be suggestive of SS, will be met in patients who have at least two of the following three objective features:

- 1 Positive serum anti-SSA (Ro) and/or anti-SSB (La) or [positive rheumatoid factor and ANA \geq 1:320]
- 2 Labial salivary gland biopsy exhibiting focal lymphocytic sialadenitis² with a focus score \geq 1 focus / 4 mm²
- 3 Keratoconjunctivitis sicca with ocular staining score \geq 3 (assuming that individual is not currently using daily eye drops for glaucoma, and has not had corneal surgery or cosmetic eyelid surgery in the last 5 years)³

Prior diagnosis of any of the following conditions would exclude participation in Sjögren's syndrome studies or therapeutic trials because of overlapping clinical features or interference with criteria tests:

- History of head and neck radiation treatment
 - Hepatitis C infection
 - Acquired Immunodeficiency Syndrome
 - Sarcoidosis
 - Amyloidosis
 - Graft versus host disease
 - IgG4-related disease
-

¹We excluded participants with rheumatoid arthritis, systemic lupus, scleroderma, or other connective tissue disease from these analyses since there were only 87 (6%) such participants.

²Using histopathological definitions and focus score assessment methods previously described (15)

³Using ocular staining score previously described (17)

ANEXO C – CRITÉRIOS COLÉGIO AMERICANO/LIGA EUROPÉIA CONTRA O REUMATISMO DE 2016

Table 3 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism classification criteria for primary Sjögren's syndrome: The classification of primary Sjögren's syndrome (SS) applies to any individual who meets the inclusion criteria,* does not have any of the conditions listed as exclusion criteria,† and has a score of ≥ 4 when the weights from the five criteria items below are summed

Item	Weight/score
Labial salivary gland with focal lymphocytic sialadenitis and focus score of ≥ 1 foci/4 mm ² ‡	3
Anti-SSA/Ro-positive	3
Ocular Staining Score ≥ 5 (or van Bijsterveld score ≥ 4) in at least one eye§¶	1
Schirmer's test ≤ 5 mm/5 min in at least one eye§	1
Unstimulated whole saliva flow rate ≤ 0.1 mL/min§**	1

ANEXO E – 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 F – EULAR SJÖGREN'S SYNDROME DISEASE ACTIVITY INDEX

APÊNDICE – EULAR SJÖGREN'S SYNDROME DISEASE ACTIVITY INDEX (ESSDAI) em português		
Domínio constitucional (3) Por favor, atenção para não avaliar sintomas constitucionais não relacionados à doença (como febre de origem infecciosa, perda voluntária de peso).		
Nenhuma atividade	Ausência dos sintomas a seguir	<input type="checkbox"/> 0
Atividade baixa	Febre moderada ou intermitente (37,5°-38,5°C) / suores noturnos ou perda de peso involuntária de 5% a 10% do peso corporal	<input type="checkbox"/> 1
Atividade moderada	Febre alta (> 38,5°C) / suores noturnos ou perda de peso involuntária de > 10% do peso corporal	<input type="checkbox"/> 2
Domínio de linfadenopatia (4)		
Nenhuma atividade	Ausência das características a seguir	<input type="checkbox"/> 0
Atividade baixa	Linfadenomegalia ≥ 1 cm em qualquer região ou ≥ 2 cm na região inguinal	<input type="checkbox"/> 1
Atividade moderada	Linfadenomegalia ≥ 2 cm em qualquer região ou ≥ 3 cm em região inguinal ou esplenomegalia (clínicamente palpável ou avaliada por exame de imagem)	<input type="checkbox"/> 2
Atividade alta	Doença proliferativa maligna das células B recente	<input type="checkbox"/> 3
Domínio glandular (2) Por favor, atenção para não avaliar aumento do volume glandular não relacionado à doença (p. ex., litíase ou infecção).		
Nenhuma atividade	Ausência de aumento glandular	<input type="checkbox"/> 0
Atividade baixa	Pequeno aumento glandular com: • parótida aumentada (≤ 3cm) ou aumento discreto submandibular ou lacrimal ^a	<input type="checkbox"/> 1
Atividade moderada	Aumento glandular maior com: • parótida aumentada (> 3cm) ou aumento importante submandibular ou lacrimal ^a	<input type="checkbox"/> 2
Domínio articular (2) Por favor, atenção para não avaliar envolvimento articular não relacionado à doença, como a osteoartrite.		
Nenhuma atividade	Ausência de envolvimento articular ativo no momento	<input type="checkbox"/> 0
Atividade baixa	Atralgia nas mãos, punhos, tornozelos e pés acompanhados por rigidez matinal (> 30 min)	<input type="checkbox"/> 1
Atividade moderada	1 a 5 artrites dentre as 28 ^b	<input type="checkbox"/> 2
Atividade alta	≥ 6 artrites dentre as 28 ^b	<input type="checkbox"/> 3
Domínio cutâneo (3) Por favor, atenção em avaliar como "Nenhuma atividade" lesões antigas e estáveis mais relacionadas ao dano (sequela) do que à atividade da doença ou ao envolvimento cutâneo não relacionado à doença.		
Nenhuma atividade	Ausência de envolvimento cutâneo ativo no momento	<input type="checkbox"/> 0
Atividade baixa	Eritema multiforme	<input type="checkbox"/> 1
Atividade moderada	Vasculite cutânea limitada, incluindo vasculite urticariforme ^c ou púrpura limitada aos pés e tornozelos ou lúpus cutâneo subagudo	<input type="checkbox"/> 2
Atividade alta	Vasculite cutânea difusa, incluindo vasculite urticariforme ^c ou púrpura difusa ou úlceras relacionadas à vasculite	<input type="checkbox"/> 3
Domínio respiratório (5) Por favor, atenção em avaliar como "Nenhuma atividade" lesões antigas e estáveis mais relacionadas ao dano (sequela) do que à atividade da doença ou ao envolvimento respiratório não relacionado à doença (p. ex., cigarro).		
Nenhuma atividade	Ausência de envolvimento pulmonar ativo no momento	<input type="checkbox"/> 0
Atividade baixa	Tosse persistente ou envolvimento brônquico sem nenhuma alteração radiológica no raio X simples ou evidência de doença pulmonar intersticial no raio X simples ou TCAR, com: • nenhuma dispneia e • prova de função pulmonar normal	<input type="checkbox"/> 1
Atividade moderada	Envolvimento pulmonar moderadamente ativo, tal como doença pulmonar intersticial diagnosticada pelo TCAR com: • dispneia aos grandes esforços (NYHA ^d II) ou prova de função pulmonar alterada dentro dos seguintes parâmetros: 70% > DLCO ^e ≥ 40% e/ou 80% > CVF ^f ≥ 60%	<input type="checkbox"/> 2
Atividade alta	Envolvimento pulmonar altamente ativo como doença pulmonar intersticial diagnosticada pelo TCAR com: • dispneia aos pequenos esforços ou ao repouso (NYHA ^d III, IV) ou prova de função pulmonar alterada: DLCO ^e < 40% e/ou CVF ^f < 60%	<input type="checkbox"/> 3
Domínio renal (5) Por favor, atenção em avaliar como "Nenhuma atividade" lesões antigas e estáveis mais relacionadas ao dano (sequela) do que à atividade da doença e ao envolvimento renal não relacionado à doença. Se a biópsia for feita, favor classificar a atividade baseada, primeiramente, nas características histológicas.		
Nenhuma atividade	Ausência de envolvimento renal ativo no momento: • proteinúria < 0,5g/d, nenhuma hematúria, nenhuma leucocitúria, nenhuma acidose ou • proteinúria estável de longa duração devido ao dano/sequela	<input type="checkbox"/> 0
Atividade baixa	Evidência de envolvimento específico da atividade renal, limitada a: • acidose tubular sem insuficiência renal ou • envolvimento glomerular: - com proteinúria (entre 0,5 e 1 g/dL) e - sem hematúria ou insuficiência renal (TCF ^g ≥ 60 mL/min)	<input type="checkbox"/> 1
Atividade moderada	Atividade renal moderada: • acidose tubular com insuficiência renal (TCF ^g < 60 mL/min) ou • envolvimento glomerular: - com proteinúria entre um e 1,5 g/dL e - sem hematúria ou insuficiência renal (TCF ^g ≥ 60 mL/min) ou • evidência histológica: - glomerulonefrite e/ou - infiltração intersticial linfóide importante	<input type="checkbox"/> 2
Atividade alta	Atividade renal alta: • envolvimento glomerular: - proteinúria > 1,5 g/dL e/ou - hematúria e/ou - insuficiência renal (TCF ^g < 60 mL/min) ou • evidência histológica de: - glomerulonefrite proliferativa ou - crioglobulinemia relacionada ao envolvimento renal	<input type="checkbox"/> 3

APÊNDICE – EULAR SJÖGREN'S SYNDROME DISEASE ACTIVITY INDEX (ESSDAI) em português (continuação)		
Domínio muscular (6)		
Por favor, atenção para não avaliar envolvimento muscular não relacionado à doença, como fraqueza devido a corticosteroides.		
Nenhuma atividade	Ausência de envolvimento muscular ativo no momento	<input type="checkbox"/> 0
Atividade baixa	Miosite levemente ativa diagnosticada pela EMG ou biópsia com: • ausência de fraqueza e creatinaquinase alterada ($N < CK \leq 2N$)	<input type="checkbox"/> 1
Atividade moderada	miosite moderadamente ativa diagnosticada pela EMG ou biópsia com: • fraqueza (déficit máximo de 4/5) ou creatinaquinase elevada ($2N < CK \leq 4N$)	<input type="checkbox"/> 2
Atividade alta	miosite altamente ativa diagnosticada pela EMG ou biópsia com: • fraqueza (déficit $\leq 3/5$) ou creatinaquinase elevada ($> 4N$)	<input type="checkbox"/> 3
Domínio do sistema nervoso periférico (5)		
Por favor, atenção em avaliar como "Nenhuma atividade" lesões antigas e estáveis mais relacionadas ao dano (sequela) do que à atividade ou ao envolvimento do sistema nervoso periférico não relacionado à doença.		
Nenhuma atividade	Ausência de envolvimento ativo do sistema nervoso periférico, no momento	<input type="checkbox"/> 0
Atividade baixa	Evidência de envolvimento ativo do sistema nervoso periférico, como: • polineuropatia periférica axonal diagnosticada pelo ECN/ENMG ou • neuralgia do nervo trigêmeo (V nervo craniano)	<input type="checkbox"/> 1
Atividade moderada	Evidência de envolvimento moderadamente ativo, do sistema nervoso periférico, como: • neuropatia axonal motora e sensorial diagnosticada pelo ECN/ENMG, sem déficit motor ou • neuropatia sensorial pura com a presença de vasculite crioglobulinêmica ou • gangliopatia com sintomas restritos à ataxia moderada ou • polineuropatia inflamatória desmielinizante crônica (CIDP) ¹ com deficiência funcional moderada (sem déficit motor ou ataxia moderada) ou	<input type="checkbox"/> 2
Atividade alta	• envolvimento do nervo craniano de origem periférica – exceto nervo do Trígêmeo (V) Evidência de envolvimento altamente ativo do sistema nervoso periférico, como: • neuropatia axonal motora e sensorial diagnosticada pela ECN/ENMG com déficit motor $\leq 3/5$ ou • envolvimento do nervo periférico atribuído à vasculite (mononeurite múltipla) ou • ataxia severa atribuída à ganglionopatia ^a ou • polineuropatia inflamatória desmielinizante crônica (CIDP) ¹ com deficiência funcional severa: déficit motor $\leq 3/5$ ou ataxia grave	<input type="checkbox"/> 3

APÊNDICE – EULAR SJÖGREN'S SYNDROME DISEASE ACTIVITY INDEX (ESSDAI) em português (continuação)		
Domínio muscular (6)		
Por favor, atenção para não avaliar envolvimento muscular não relacionado à doença, como fraqueza devido a corticosteroides.		
Nenhuma atividade	Ausência de envolvimento muscular ativo no momento	<input type="checkbox"/> 0
Atividade baixa	Miosite levemente ativa diagnosticada pela EMG ou biópsia com: • ausência de fraqueza e creatinaquinase alterada ($N < CK \leq 2N$)	<input type="checkbox"/> 1
Atividade moderada	miosite moderadamente ativa diagnosticada pela EMG ou biópsia com: • fraqueza (déficit máximo de 4/5) ou creatinaquinase elevada ($2N < CK \leq 4N$)	<input type="checkbox"/> 2
Atividade alta	miosite altamente ativa diagnosticada pela EMG ou biópsia com: • fraqueza (déficit $\leq 3/5$) ou creatinaquinase elevada ($> 4N$)	<input type="checkbox"/> 3
Domínio do sistema nervoso periférico (5)		
Por favor, atenção em avaliar como "Nenhuma atividade" lesões antigas e estáveis mais relacionadas ao dano (sequela) do que à atividade ou ao envolvimento do sistema nervoso periférico não relacionado à doença.		
Nenhuma atividade	Ausência de envolvimento ativo do sistema nervoso periférico, no momento	<input type="checkbox"/> 0
Atividade baixa	Evidência de envolvimento ativo do sistema nervoso periférico, como: • polineuropatia periférica axonal diagnosticada pelo ECN/ENMG ou • neuralgia do nervo trigêmeo (V nervo craniano)	<input type="checkbox"/> 1
Atividade moderada	Evidência de envolvimento moderadamente ativo, do sistema nervoso periférico, como: • neuropatia axonal motora e sensorial diagnosticada pelo ECN/ENMG, sem déficit motor ou • neuropatia sensorial pura com a presença de vasculite crioglobulinêmica ou • gangliopatias com sintomas restritos à ataxia moderada ou • polineuropatia inflamatória desmielinizante crônica (CIDP) ¹ com deficiência funcional moderada (sem déficit motor ou ataxia moderada) ou	<input type="checkbox"/> 2
Atividade alta	• envolvimento do nervo craniano de origem periférica – exceto nervo do Trígêmeo (V) Evidência de envolvimento altamente ativo do sistema nervoso periférico, como: • neuropatia axonal motora e sensorial diagnosticada pela ECN/ENMG com déficit motor $\leq 3/5$ ou • envolvimento do nervo periférico atribuído à vasculite (mononeurite múltipla) ou • ataxia severa atribuída à ganglionopatia ^a ou • polineuropatia inflamatória desmielinizante crônica (CIDP) ¹ com deficiência funcional severa: déficit motor $\leq 3/5$ ou ataxia grave	<input type="checkbox"/> 3
Domínio do sistema nervoso central (5)		
Por favor, atenção em avaliar como "Nenhuma atividade" lesões antigas e estáveis mais relacionadas ao dano (sequela) do que à atividade da doença ou envolvimento do sistema nervoso central não relacionado à doença.		
Nenhuma atividade	Ausência de envolvimento ativo do SNC no momento	<input type="checkbox"/> 0
Atividade baixa	Manifestações clínicas moderadamente ativas do SNC, como: • envolvimento de nervo craniano de origem central ou • neurite óptica ou • síndrome semelhante à esclerose múltipla com sintomas restritos à deficiência sensorial pura ou deficiência cognitiva comprovada	<input type="checkbox"/> 1
Atividade moderada	Manifestações clínicas altamente ativas do SNC, como: • vasculite cerebral com acidente vascular cerebral ou ataque isquêmico transitório • convulsões ou • mielite transversa ou • meningite linfocítica ou • síndrome semelhante à esclerose múltipla com déficit motor	<input type="checkbox"/> 2
Domínio hematológico (2)		
Por favor, atenção: levando em conta anemia, neutropenia e trombocitopenia, somente a citopenia autoimune deve ser considerada; não avaliar citopenia que não esteja relacionada à doença (p. ex., deficiência de vitamina ou de ferro, ou ainda citopenia induzida por droga, como p. ex. linfocitopenia associada à ciclofosfamida).		
Nenhuma atividade	Ausência de citopenia autoimune	<input type="checkbox"/> 0
Atividade baixa	citopenia de origem autoimune com: • neutropenia ¹ ($1000 < \text{neutrófilos} < 1500/\text{mm}^3$) ou anemia ² ($10 < \text{Hb} < 12 \text{ g/dL}$) ou trombocitopenia ¹ ($100.000 < \text{plaquetas} < 150.000/\text{mm}^3$) ou linfopenia ($500 < \text{linfócitos} < 1000/\text{mm}^3$)	<input type="checkbox"/> 1
Atividade moderada	Citopenia de origem autoimune com: • neutropenia ¹ ($500 \leq \text{neutrófilos} \leq 1000/\text{mm}^3$) ou anemia ² ($8 \leq \text{Hb} \leq 10 \text{ g/dL}$) ou trombocitopenia ¹ ($50.000 \leq \text{plaquetas} \leq 100.000/\text{mm}^3$) ou linfopenia ($\leq 500/\text{mm}^3$)	<input type="checkbox"/> 2
Atividade alta	Citopenia de origem autoimune com: • neutropenia ¹ (neutrófilos $< 500/\text{mm}^3$) ou anemia ² ($\text{Hb} < 8 \text{ g/dl}$) ou trombocitopenia ¹ (plaquetas $< 50.000/\text{mm}^3$)	<input type="checkbox"/> 3

APÊNDICE – EULAR SJÖGREN'S SYNDROME DISEASE ACTIVITY INDEX (ESSDAI) em português (continuação)		
Domínio biológico (1)		
Nenhuma atividade	Ausência de qualquer uma das seguintes alterações	<input type="checkbox"/> 0
Atividade baixa	• pico clonal ou hipocomplementemia (C4 ou C3 ou CH50 baixos) ou hipergamaglobulinemia ou nível de IgG entre 1600 e 2000 mg/dL	<input type="checkbox"/> 1
Atividade moderada	• Presença de crioglobulinemia ou hipergamaglobulinemia ou nível alto de IgG > 2000 mg/dL ou início recente de ^m hipogamaglobulinemia ou diminuição recente de nível de IgG (< 500 mg/dL)	<input type="checkbox"/> 2
<p>N, normal (valor de referência); EMG, eletromiografia.</p> <p>^aA distinção entre aumento discreto ou importante do volume glandular submandibular ou lacrimal fica a critério médico.</p> <p>^bAs 28 articulações incluídas no cálculo do DAS28 (Disease Activity Score 28) são ombros, cotovelos, punhos, metacarpofalângicas, interfalângicas proximais e joelhos.</p> <p>^cVasculite 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.</p> <p>Para o diagnóstico da doença pulmonar intersticial a TCAR (tomografia computadorizada de alta resolução) ou radiografia simples são necessárias e devem ter sido realizadas nos últimos dois anos.</p> <p>^dNYHA (classificação funcional da New York Heart Association).</p> <p>^eDLCO (prova de difusão de dióxido de carbono).</p> <p>^fCVF (capacidade vital forçada).</p> <p>^gTGF (taxa de filtração glomerular) calculada com a fórmula MDRD (Modification of Diet in Renal Disease).</p> <p>^hDeficiência sensorial pura com ataxia e deficiência difusa ou abolição do potencial sensitivo no ECN (estudo da condução nervosa).</p> <p>ⁱPoliradiculoneuropatia com sintomas clínicos sugestivos (déficit sensório-motor dos quatro 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).</p> <p>^jNeutropenia sem nenhuma etiologia conhecida.</p> <p>^kAnemia com o teste de Coombs positivo e aumento na contagem de reticulócitos.</p> <p>^lTrombocitopenia de origem periférica com nenhuma outra etiologia encontrada, ou em caso de dificuldades para realização de identificação de autoanticorpos antiplaquetas e/ou a presença de megacariócitos de aspirado de medula óssea e/ou anemia autoimune associada.</p> <p>^mNos últimos seis meses.</p>		

Classificação:

<5 : Baixo, ≥ 5 a ≤14 : moderado; ≥15 : alto.

ANEXO F – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

UFPE - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE PERNAMBUCO -
HC/UFPE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS GALECTINAS 7 E 9 NO SORO E NA SALIVA DE PACIENTES PORTADORES DA SÍNDROME DE SJÖGREN PRIMÁRIA

Pesquisador: PAULA REGINA TOCHE DOS SANTOS

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 19324819.0.0000.8807

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.670.110

Apresentação do Projeto:

O presente projeto de pesquisa intitulado "AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS GALECTINAS 7 E 9 NO SORO E NA SALIVA DE PACIENTES PORTADORES DA SÍNDROME DE SJÖGREN PRIMÁRIA" é uma pesquisa para a obtenção do título de Mestre do programa de PPG em Inovação Terapêutica da aluna Paula Regina Toche dos Santos, sob a orientação de Angela Luzia Branco Pinto Duarte e a co-orientação de Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo e Andrea Tavares Dantas.

Objetivo da Pesquisa:

Geral: Determinar os níveis das galectinas 7 e 9 no sangue e na saliva de pacientes portadores da Síndrome de Sjögren e sua associação com manifestações extra glandulares e achados ultrassonográficos.
ESPECÍFICOS:

Quantificar os níveis de galectina 7 e 9 no sangue e na saliva dos pacientes com síndrome de sjögren primária e em controles saudáveis;

Correlacionar os níveis de galectinas 7 e 9 com os índices de atividade da doença, achados ultrassonográficos das glândulas salivares e manifestações glandulares e extraglandulares;

Associar os níveis de galectinas 7 e 9 em pacientes portadores da Síndrome de Sjogren que desenvolveram neoplasia.

Endereço: Av. Professor Moraes Rego, S/N, 3º andar do prédio principal (enfermarias)

Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.670-901

UF: PE **Município:** RECIFE

Telefone: (81)2126-3743

E-mail: cep@ufpe@gmail.com

**UFPE - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE PERNAMBUCO -
HC/UFPE**



Continuação do Parecer: 3.670.110

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS: risco baixo de hematoma (“mancha roxa”) no local da punção em decorrência da coleta de sangue, o que pode ser revertido em poucos dias ou horas com a colocação de gelo e solucionada com analgésicos simples em caso de dor. Os exames do fluxo salivar, teste do Schirmer e ultrassonografia de parótidas são indolores.

BENEFÍCIOS: melhor entendimento sobre o perfil clínico, social e laboratorial dos pacientes acompanhados no ambulatório, o que permite um melhor acompanhamento dos mesmos; a possibilidade de descobertas científicas sobre a Síndrome de Sjogren, acerca de diagnóstico, prognóstico e tratamento.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A presente pesquisa será um estudo de coorte analítico, de base hospitalar, onde serão incluídos pacientes portadores de Síndrome de Sjogren Primária atendidos no ambulatório de Síndrome de Sjogren do Serviço de Reumatologia do HC-UFPE, através de amostragem aleatória simples.

Os dados serão coletados por prontuários disponibilizados pelo SAME. Será utilizado uma ficha clínica composta de avaliação de perfil de manifestações clínicas da doença com critérios dos diagnósticos de 2002, 2012 e 2015, índices de atividade de doença como ESSDAI (EULAR Sjogren’s syndrome disease activity index)¹⁵ e SDDI (Sjogren’s Syndrome Disease Damage Index)¹⁶ e da avaliação do ESPRI (Eular Sjogren’s Syndrome Patient Reported Index)¹⁷, serão realizados exames laboratoriais e de imagem.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O presente projeto de pesquisa apresenta todos os termos de apresentação obrigatório como Projeto detalhado, Folha de rosto, TCLE, cartas de anuência, termos de compromisso, currículo e declaração de matrícula.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O presente projeto de pesquisa apresenta todos os termos e objetivos de apresentação obrigatório para sua execução.

Considerações Finais a critério do CEP:

PROJETO APROVADO APÓS A ANÁLISE DE PENDÊNCIAS PELOS RELATORES

O Protocolo foi avaliado e está APROVADO. Para iniciar a coleta de dados. Solicitamos o comparecimento ao NAP para solicitar a Carta de Encaminhamento, caso a pesquisa seja realizada no âmbito do Hospital das Clínicas. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será

Endereço: Av. Professor Moraes Rego, S/N, 3º andar do prédio principal (enfermarias)
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.670-901
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-3743 **E-mail:** cephcupe@gmail.com

**UFPE - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE PERNAMBUCO -
HC/UFPE**



Continuação do Parecer: 3.670.110

dada após o envio da Notificação com o 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, 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:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1342735.pdf	29/09/2019 22:40:41		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetodetalhado.docx	29/09/2019 22:40:15	PAULA REGINA TOCHE DOS SANTOS	Aceito
Outros	cartaderespostaaspendencias.docx	29/09/2019 22:38:17	PAULA REGINA TOCHE DOS SANTOS	Aceito
Outros	cartaanuencialinat.pdf	29/09/2019 22:33:48	PAULA REGINA TOCHE DOS SANTOS	Aceito
Outros	cartaanuenciasame.pdf	26/09/2019 15:57:04	PAULA REGINA TOCHE DOS SANTOS	Aceito
Outros	curricullumAysa.docx	15/09/2019 13:02:33	PAULA REGINA TOCHE DOS SANTOS	Aceito

Endereço: Av. Professor Moraes Rego, S/N, 3º andar do prédio principal (enfermarias)
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.670-901
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-3743 **E-mail:** cephcupe@gmail.com

UFPE - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE PERNAMBUCO -
HC/UFPE



Continuação do Parecer: 3.670.110

Outros	curriculumlattesPaulaToche.docx	15/09/2019 13:00:18	PAULA REGINA TOCHE DOS SANTOS	Aceito
Outros	curriculumlattesPaulaToche.pdf	19/08/2019 21:04:45	PAULA REGINA TOCHE DOS SANTOS	Aceito
Outros	curriculoAndreaTavaresDantas.docx	18/08/2019 14:33:30	PAULA REGINA TOCHE DOS SANTOS	Aceito
Outros	curriculoMoacyrJesusBarretodeMeloReg o.docx	18/08/2019 14:32:23	PAULA REGINA TOCHE DOS SANTOS	Aceito
Outros	curriculoAngelaLuziaBrancoPintoDuarte. docx	18/08/2019 14:32:00	PAULA REGINA TOCHE DOS SANTOS	Aceito
Outros	declaracaodematricula.docx	18/08/2019 14:31:10	PAULA REGINA TOCHE DOS SANTOS	Aceito
Outros	cartaanuencia.docx	18/08/2019 14:28:14	PAULA REGINA TOCHE DOS SANTOS	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEMaiores18.doc	10/08/2019 15:32:48	PAULA REGINA TOCHE DOS SANTOS	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	10/08/2019 15:31:27	PAULA REGINA TOCHE DOS SANTOS	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 30 de Outubro de 2019

Assinado por:

Paulo Roberto Cavalcanti Carvalho
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Professor Moraes Rego, S/N, 3º andar do prédio principal (enfermarias)
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.670-901
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-3743 **E-mail:** cephcupe@gmail.com