

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM CLÍNICA INTEGRADA

**CARACTERIZAÇÃO DOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS DA RESPOSTA
TH17 NA SÍNDROME DE SJOGREN SECUNDÁRIA A ARTRITE
REUMATOIDE**

CAMILA NUNES CARVALHO

Recife – PE

CAMILA NUNES CARVALHO

**CARACTERIZAÇÃO DOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS DA RESPOSTA
TH17 NA SÍNDROME DE SJOGREN SECUNDÁRIA A ARTRITE
REUMATOIDE**

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

Orientador: Prof. Dr. Luiz Alcino Monteiro Gueiros

Recife –PE

2014

C331c Carvalho, Camila Nunes.
Caracterização dos polimorfismos genéticos da resposta th17 na síndrome de sjogren secundária a artrite reumatoide / Camila Nunes Carvalho. – Recife: O autor, 2014.
83 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientador: Luiz Alcino Monteiro Gueiros.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Odontologia, 2014.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Polimorfismo genético. 2. Interleucina. 3. Artrite reumatoide. 4. Síndrome de Sjogren. I. Gueiros, Luiz Alcino Monteiro (Orientador). II. Título.

617.6

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2014-103)

TÍTULO DO TRABALHO: CARACTERIZAÇÃO DOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS DA RESPOSTA TH17 NA SÍNDROME DE SJOGREN SECUNDÁRIA A ARTRITE REUMATOIDE

NOME DA ALUNA: CAMILA NUNES CARVALHO

DISSERTAÇÃO APROVADA EM:

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. DANYEL ELIAS DA CRUZ PEREZ _____

Prof. (a) Dr. (a) MARIA LUIZA DOS ANJOS PONTUAL_____

Prof. (a) Dr. (a) ANGELA LUZIA BRANCO PINTO DUARTE _____

Recife –PE

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR DA PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Souza Ramos

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIRETOR

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

COORDENADOR DA PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Profa. Dra. Jurema Freire Lisboa de Castro

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

COLEGIADO

MEMBROS PERMANENTES

Profa. Dra. Alessandra A. T. Carvalho

Prof. Dr. Tibério César Uchoa Matheus

Prof. Dr. Anderson S. Leônidas Gomes

MEMBROS COLABORADORES

Prof. Dr. Arnaldo de França Caldas Junior

Prof. Dr. Cláudio Heliomar Vicente da Silva

Prof. Dr. Carlos Menezes Aguiar

Profa. Dra. Lúcia Carneiro de S. Beatrice

Prof. Dr. Danyel Elias da Cruz Perez

SECRETARIA

Profa. Dra. Flavia Maria de M. R. Perez

Oziclere Sena de Araújo

Prof. Dr. Jair Carneiro Leão

Profa. Dra. Jurema Freire Lisboa de Castro

Profa. Dra. Liriane Baratella Evêncio

Prof. Dr. Luiz Alcino Monteiro Gueiros

Prof. Dra. Maria Luiza dos Anjos Pontual

Prof. Dr. Paulo Sávio Angeiras Goes

Profa. Dra. Renata Cimões Jovino Silveira

Profa. Dra. Silvia Regina Jamelli

Prof. Dra. Simone Guimaraes F. Gomes

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Aderval e Dalila, ao meu irmão Aderval Filho e ao meu noivo Lucas. Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter sempre me iluminado o caminho a seguir através de Suas ações.

A meus pais, meus tesouros, pelo incansável incentivo, amor imensurável e suporte em todos os momentos.

Ao meu irmão, meu grande orgulho e exemplo de amor fraternal e também meu espelho como profissional.

Ao meu noivo, grande amor da minha vida, meu incentivador... te amo.

Às famílias Nunes e Carvalho pelo constante incentivo.

À Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, na pessoa do reitor Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado e ao programa de pós-graduação em Odontologia, na pessoa da coordenadora Profa. Dra. Jurema Freire Lisboa de Castro, pela oportunidade e honra de fazer parte de seu corpo discente.

À FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco) pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao meu orientador, prof. Dr. Luiz Alcino Gueiros, por toda dedicação à pós-graduação e aos seus orientandos, pela sua seriedade com a pesquisa e pelo valioso conhecimento transmitido. Agradeço seu voto de confiança e grande receptividade.

A todos os professores da disciplina da Disciplina de Estomatologia da UFPE e seu corpo técnico, que me ensinaram que ainda há muito a aprender. À Rita Maria da Cruz, pela presteza e carinho em todos os momentos durante o desenvolvimento da pesquisa.

Aos professores da pós-graduação em Odontologia por todos os ensinamentos.

Ao Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas HC-UFPE, em especial à Dra. Ângela Duarte e sua equipe, pelo acolhimento e ajuda oferecida.

Aos meus amigos da pós-graduação... companheiros de sala e de laboratório, em especial à minha grande amiga Marília Lins e Silva, pelo apoio e companheirismo em todos os momentos alegres e difíceis vivenciados e compartilhados durante o mestrado.

Aos meus velhos amigos, aqueles que investiram maciçamente em grandes emoções e que têm o poder de marcar com maestria a vida das pessoas, vocês estão sempre presentes aqui comigo.

Aos monitores e alunos de Iniciação Científica – PIBIC que fizeram parte da minha vida nesses dois anos... Ícaro Moura, foram muitos os obstáculos que enfrentamos para concluir a pesquisa, mas conseguimos! Muito obrigada, sua ajuda foi valiosa. Saiba que, além de companheiro de pesquisa, você se tornou um grande amigo! Teresa Gusmão, Isabelle Lemos e Júnior Antunes... vocês são especiais!

Aos pacientes do ambulatório de Reumatologia do Hospital das Clínicas/UFPE e do ambulatório de Estomatologia/UFPE, que tornaram possível a conclusão dessa pesquisa. Muito obrigada!

A todos os meus queridos professores da graduação da Universidade Federal de Alagoas – UFAL, especialmente profa. Dra. Patrícia Batista Lopes do Nascimento e prof. Dr. Luiz Carlos Oliveira. Lembro com muito carinho de vocês constantemente... sem o esforço de vocês eu não estaria aqui.

Aos obstáculos que encontrei... lembrar deles é saber que, se cheguei até aqui, é porque consegui vencê-los.

E eu, que carrego comigo o sonho ainda por realizar, só posso agradecer aos que me incutiram a vontade, ensinaram um tanto e sobretudo a vontade de saber mais.

*“Construí amigos, enfrentei derrotas,
venci obstáculos,
bati na porta da vida e disse-lhe:
Não tenho medo de vivê-la.”*

Augusto Cury

RESUMO

A resposta Th17 desempenha papel chave em diversas doenças inflamatórias e autoimunes, no entanto sua participação na síndrome de Sjogren (SS) ainda permanece incerta. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência dos polimorfismos da resposta Th17 na susceptibilidade e severidade da síndrome de Sjogren secundária (SSs) a artrite reumatoide (AR). Foi avaliada uma amostra composta por 206 pacientes de ambos os sexos, com idade maior que 18 anos e distribuídos em três grupos: artrite reumatoide (AR- 100 pacientes), síndrome de Sjogren secundária à artrite reumatoide (SSs – 31 pacientes) e controles saudáveis (C - 75 pacientes). Todos os pacientes foram submetidos à avaliação clínica e mensuração do fluxo salivar em repouso, teste de Schirmer; alguns pacientes portadores de AR foram ainda submetidos à biópsia de glândula salivar menor para definição do diagnóstico de SSs. Amostras de saliva foram coletadas para isolamento do DNA e genotipagem dos genes da resposta Th17, IL-17A -197G/A e IL-17F 7488T/C. Os polimorfismos genéticos não foram associados com a suscetibilidade à AR e SSs ($p>0,05$). Também não se observou influência destes na atividade de AR e nos indicadores clínicos da SS. Os polimorfismos IL-17A -197G/A e IL-17F 7488T/C não se mostraram relacionados à suscetibilidade e atividade da AR e SSs na população estudada.

Palavras-chave: Polimorfismo Genético. Interleucina 17. Artrite Reumatoide. Síndrome de Sjogren.

ABSTRACT

The Th17 response plays a key role in several inflammatory and autoimmune diseases, however their involvement in Sjogren's syndrome (SS) remains uncertain. The aim of this study was to evaluate the influence of polymorphisms of Th17 response in susceptibility and severity of Sjogren's syndrome secondary (sSS) to rheumatoid arthritis (RA). A sample of 206 patients of both sexes, with more than 18 years and divided into three age groups was evaluated: Rheumatoid arthritis (RA - 100 patients), Sjogren's syndrome secondary to rheumatoid arthritis (sSS – 31 patients) and healthy controls (C - 75 patients). All patients underwent clinical evaluation, measurement of salivary flow and Schirmer's test; some RA patients were undergoing minor salivary gland biopsy for diagnostic definition of sSS. Saliva samples were collected for DNA isolation and genotyping of Th17 response genes, IL -17A – 197G/A and IL -17F 7488T/C. Genetic polymorphisms were not associated with susceptibility to RA and sSS ($p > 0.05$). Also no effect was observed in these RA activity and clinical indicators of SS. IL - 17A – 197G/A and IL - 17F 7488T/C polymorphisms were not related to susceptibility and sSS and RA activity in the studied population.

Keywords: Genetic Polymorphism. Interleukin 17. Rheumatoid Arthritis. Sjogren's Syndrome.

LISTA DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS

Quadro 01	Critérios de classificação da Síndrome de Sjogren de acordo com o Grupo Americano e Europeu de Consenso.....	24
Quadro 02	Critérios do Colégio Americano de Reumatologia para classificação da artrite reumatoide.....	28
Figura 01	Diferenciação das células Th17.....	31
Tabela 01	Avaliação da associação entre as variáveis numéricas velocidade de hemossedimentação (VHS), articulações dolorosas e edemaciadas e escore de atividade da doença (DAS28) e os grupos SSs e AR.....	53
Tabela 02	Avaliação da associação entre genótipos e frequência alélica dos genes IL-17A -197G/A e IL-17F 7488T/C e a susceptibilidade a AR e SSs.....	54
Tabela 03	Avaliação da associação entre genótipos e frequência alélica dos genes IL-17A -197G/A e IL-17F 7488T/C e as características clínicas da AR e SSs.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS

AR – Artrite reumatoide

Células Th – Células t *helper*

Células t-reg – Células T regulatórias

CCS – Ceratoconjutivite *sicca*

CMV – Citomegalovírus

DAS28 – Escore de atividade da doença (Artrite reumatoide)

EBV – Vírus Epstein Barr

FSR – Fluxo salivar em repouso

HCV – Vírus da hepatite C

HLA – *Human Leukocyte Antigens*

INF γ - Interferon gama

LES – Lúpus eritematoso sistêmico

LT – Linfócitos T

MHC – Complexo de histocompatibilidade principal

PCR – Reação em cadeia da polimerase

RANKL – *Receptor activator of nuclear KB ligand*

SNP – Polimorfismo de nucleotídeo único

SS – Síndrome de Sjogren

SSp – Síndrome de Sjogren primária

SSs – Síndrome de Sjogren secundária

STAT – *Signal Transducer and Activator of Transcription*

TNF α – Fator de necrose tumoral alfa

VHS – Velocidade de hemossedimentação

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 PATOGÊNESE DA SÍNDROME DE SJOGREN	17
2.2 FATORES ETIOLÓGICOS DA SÍNDROME DE SJOGREN	18
2.3 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA SÍNDROME DE SJOGREN	19
2.4 CRITÉRIOS CLASSIFICATÓRIOS DA SÍNDROME DE SJOGREN	21
2.5 ARTRITE REUMATOIDE	25
2.6 O PAPEL DA RESPOSTA TH17	28
3. OBJETIVOS.....	32
3.1 OBJETIVO GERAL.....	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4. METODOLOGIA	33
4.1 DESENHO DO ESTUDO E DIVISÃO DOS GRUPOS.....	33
4.2 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE.....	33
4.3 AVALIAÇÃO CLÍNICA	35
REFERÊNCIAS.....	39
5. ARTIGO	44
5.1 RESUMO	45
5.2 ABSTRACT	46
5.3 INTRODUÇÃO	47
5.5 RESULTADOS.....	52
5.6 DISCUSSÃO	55
6. CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS.....	61
APÊNDICES	66
QUESTIONÁRIO DA PESQUISA.....	66
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	70
ANEXOS	72
PARECER CONSUBSTANIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA....	72
NORMAS DA REVISTA (ORAL DISEASES)	75

1. INTRODUÇÃO

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

A SS é classicamente categorizada em primária (SSp), quando ocorre isoladamente, ou como secundária (SSs) quando em associação com outra doença autoimune sistêmica, tal como lúpus eritematoso sistêmico (LES) ou artrite reumatoide (AR). A prevalência de SSs varia de acordo com a doença associada, sendo da ordem de 9 a 19% no LES, e de 4 a 31% na AR. Apesar de sua ocorrência ser relativamente comum, a SS é usualmente subdiagnosticada, subtratada e pouco compreendida. Ainda, a forma secundária é frequentemente considerada como evolução sintomática da patologia de base e não como uma doença associada (Rozman *et al.*, 2004; Mavragani *et al.*, 2007).

Apesar de alguns eventos patológicos chaves da SS serem bem conhecidos, sua etiologia ainda permanece incerta. Algumas linhas de evidência sugerem que a SS resulta da interação de agentes ambientais com um grau variável de predisposição genética levando a alteração patológica do padrão de resposta imune (Rozman *et al.*, 2004).

Algumas linhas de evidência sugerem uma contribuição de um subtipo de células T mais recentemente descoberto – as células Th17 – na imunopatogênese de várias desordens autoimunes, incluindo a SS (Mavragani *et al.*, 2010). Essas células foram identificadas como células T auxiliares distintas de células Th1 e Th2 e são células efetoras chave em uma variedade de doenças autoimunes, tais como esclerose múltipla, artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico e psoríase (Deák *et al.*, 2013). Além disso, linfócitos T CD4+ infiltrados em glândulas salivares de pacientes com SS predominantemente expressam IL-17 (também conhecida como IL-17A) sugerindo estarem envolvidas na patogênese da SS (Hernández-Molina *et al.*, 2011).

Contudo, a despeito dos inúmeros estudos, os eventos que promovem a perda do balanço imune e favorecem a infiltração linfocitária nas glândulas exócrinas de pacientes com SS ainda permanecem pouco compreendidos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A síndrome de Sjogren (SS) foi inicialmente descrita em 1932 pelo oftalmologista dinamarquês Henrik Sjogren, que relatou as características clínicas e microscópicas de uma tríade de ceratoconjuntivite *sicca*, xerostomia e artrite reumatoide em 19 mulheres. Desde então, diversos estudos têm relatado a importância clínica das alterações sorológicas e imunopatológicas desta doença. Atualmente a SS é compreendida como uma doença autoimune de progressão lenta e relativamente comum que acomete predominantemente mulheres de meia idade na proporção mulher: homem de 9:1 (Delaleu *et al.*, 2008; Hamza *et al.*, 2012; Ice *et al.*, 2012; Tzioufas *et al.*, 2012).

A SS caracteriza-se pela infiltração linfocítica nas glândulas exócrinas, principalmente as glândulas salivares e lacrimais, resultando em redução de suas funções secretórias e consequente ressecamento oral e ocular (Mavragani *et al.*, 2010; Ice *et al.*, 2012; Tzioufas *et al.*, 2012). Com alguma frequência, observa-se envolvimento de outras superfícies, como pele, vagina, tubos braquiais e do trato gastrointestinal, além de manifestações extrarticulares como fadiga, fenômeno de Raynaud e artralgias. De acordo com presença de doenças associadas, SS é classificada como primária (SSp), quando ocorre isoladamente ou secundária (SSs) quando apresenta-se em associação com outra doença autoimune sistêmica, principalmente lúpus eritematoso sistêmico (LES) e artrite reumatoide (AR) (Bowman *et al.*, 2012). A forma primária apresenta prevalência de 0,5 a 1%, enquanto que a prevalência das formas secundárias parece mudar de acordo com a doença associada, variando de 9 a 19% no LES a 4 a 31% na AR (Ramos-Casals *et al.*, 2002). Apesar de relativamente comum, a SSp é frequentemente subdiagnosticada e portanto subtratada, sendo ainda pouco compreendida quando comparada com outras doenças autoimunes (Rozman *et al.*, 2004; Mavragani *et al.*, 2007). Neste contexto, o tipo secundário da doença ainda é menos compreendido (Reksten *et al.*, 2009; Manoussakis *et al.*, 2010).

2.1 PATOGÊNESE DA SÍNDROME DE SJOGREN

Por muitos anos, a patologia imune na SS, assim como em outras doenças autoimunes, foi largamente atribuída às células T devido a sua infiltração em um grande número de órgãos e glândulas afetadas. As células B, por outro lado, foram inicialmente classificadas como tendo um papel menor, as quais atuariam mais como braço efetor do processo autoimune através da produção excessiva de autoanticorpos anti-Ro/SSA e anti-La/SSB (Delaleu *et al.*, 2008; Hamza *et al.*, 2012). Aproximadamente três quartos dos pacientes com SS possuem autoanticorpos anti-Ro e/ou anti-La no soro e muitos desses pacientes possuem também níveis elevados de imunoglobulinas (hipergamaglobulinemia) (Hernández-Molina *et al.*, 2011). Uma proporção considerável de pacientes com anticorpos anti-Ro/La possuem envolvimento orgânico sistêmico, incluindo neuropatia, rash cutâneo (púrpura e vasculite), doença pulmonar intersticial, acidose renal tubular e anormalidades hematológicas. Ainda, há um aumento de 44 vezes do risco de linfoma de células B em pacientes com SS (Bowman *et al.*, 2012).

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

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

– as células Th17 – na imunopatogênese de várias desordens autoimunes, incluindo a SS (Mavragani *et al.*, 2010).

Estudos recentes sugerem uma superregulação de IL-17 e IL-23, mas uma associação com manifestações clínicas específicas ainda não foi estabelecida (Sakai *et al.*, 2008; Reksten *et al.*, 2009; Roescher *et al.*, 2010).

As células Th17 secretam citocinas que pertencem à família da IL-17, que controla várias citocinas, incluindo o fator de transformação de crescimento beta (TGF- β) e as citocinas 21, 23 e 6. Em pacientes com síndrome de Sjogren primária (SSp), níveis sorológicos de IL-17 e de células Th17 e as citocinas relacionadas são dominantes no tecido da glândula salivar e fortemente correlacionado com seus escores histológicos (Nguyen *et al.*, 2008; Sakai *et al.*, 2008; Katsifis *et al.*, 2009; Mavragani *et al.*, 2010; Roescher *et al.*, 2010).

Apesar de vários estudos, os fatores etiopatogênicos que levam a perda do balanço imune e permitem a infiltração massiva nas glândulas exócrinas de pacientes com SS permanecem desconhecidos. Nesse contexto, células T regulatórias que expressam CD4, CD25 e a proteína FoxP3, também TGF- β dependente, são potentes supressores da resposta imune aberrante e também teriam papéis na patogênese da SS (Roescher *et al.*, 2010). Enquanto que na infiltração inicial e moderada um controle compensatório das células T-reg em resposta à expansão das células Th17 parece ocorrer, em lesões avançadas as células T-reg parecem falhar ao controlar a injúria tecidual (Mavragani *et al.*, 2010; Youniou *et al.*, 2011).

2.2 FATORES ETIOLÓGICOS DA SÍNDROME DE SJOGREN

A etiologia da SS permanece desconhecida. De acordo com a crença predominante, a SS é resultado de interações do meio com um fundo genético. Dada a evidência convincente da ativação intrínseca do epitélio em vários órgãos-alvo como evidenciado pela expressão inapropriada das moléculas MHC, superexpressão de moléculas coestimulatórias e a habilidade da produção de citocinas, o termo “epitelite autoimune” foi proposto nos anos 90. Entretanto, a ativação epitelial continua sem ser elucidada (Mavragani *et al.*, 2010; Tzioufas *et al.*, 2012;).

Além da associação pré-estabelecida entre os alelos HLA e a SS, a avaliação da síndrome está limitada a poucos estudos que foram realizados para mostrar os fatores de risco envolvendo o lúpus eritematoso sistêmico (LES). Polimorfismos nos genes de IRF-5 e STAT4, ambos relacionados ao IFN tipo I, foram associados com a suscetibilidade à doença. Pesquisas recentes sugerem que o aumento no número de cópias de dois genes relevantes à regulação imunológica, tais como FCGR3B e CCL3L1 podem mostrar suscetibilidade ao LES e SS (Mavragani *et al.*, 2010; Voulgarelis *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2013).

Autoimunidade e infecção viral são campos próximos e relacionados, e os vírus têm sido propostos como agentes etiológicos de doenças sistêmicas autoimunes. Os principais candidatos são os herpesvírus, tais como Epstein-Barr (EBV) e citomegalovírus, e o vírus da Hepatite C (HCV) (Ramos-Casals *et al.*, 2008).

A falta de estrógeno parece predispor o surgimento da doença, uma vez que há grande predominância da doença em mulheres. Isso é sugerido devido à ocorrência da doença na perimenopausa (Mostafa *et al.*, 2012; Tzioufas *et al.*, 2012).

2.3 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA SÍNDROME DE SJOGREN

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

A infiltração linfocítica na glândula lacrimal pode resultar em diminuição da produção de lágrima e deficiência em sua composição, o que pode levar,

consequentemente, ao dano na córnea e epitélio conjuntival, uma condição conhecida como ceratoconjuntivite *sicca* (CCS) (Tzioufas *et al.*, 2012). Como resultado da CCS, pacientes com SS podem apresentar sensação de corpo estranho, irritação, fotosensibilidade e secreções espessas no canto interno do olho, todas levando ao desconforto e possibilidade de deficiência visual com incapacidade funcional considerável. Além disso, complicações oculares incluindo ulceração ocular e cicatrizes, ceratite bacteriana e infecções palpebrais podem ocorrer (Mavragani *et al.*, 2010).

As manifestações musculoesqueléticas tais como artralgias, mialgias, fibromialgias e poliatropatia não-erosiva intermitente, afetando principalmente pequenas articulações, são comuns em pacientes com SS. O fenômeno de Raynaud afeta um terço dos pacientes com SSp e usualmente precede as manifestações *sicca* por muitos anos e está associado com aumento da prevalência de manifestações extraglandulares (Delaleu *et al.*, 2008).

Pacientes com SS não só apresentam diferentes graus de dismotilidade esofágica, principal manifestação do refluxo gastroesofágico, como também parecem ser propensos a desenvolver refluxo laringo-faríngeo, uma nova entidade causada pelo refluxo do conteúdo gástrico para o trato aerodigestivo superior, causando sintomas locais. Ao contrário do refluxo gastroesofágico clássico, esofagite, azia ou queixas de regurgitação são sintomas raros, tornando o diagnóstico difícil. Entre as opções de tratamento estão a supressão de ácido gástrico e modificações de estilo de vida (Mavragani *et al.*, 2010).

Doença renal em pacientes com SS podem se manifestar tanto predominantemente como doença tubular ou como doença glomerular no contexto de vasculite sistêmica. Acidose hiperclorêmica hipocalêmica, a mais grave manifestação da disfunção tubular pode ser tratada com potássio e bicarbonato de sódio por via oral. Glomerulonefrite, mais comumente associada com crioglobulinemia e hipocomplementemia é tratada principalmente com prednisona e ciclofosfamida em caso de doença refratária. O fígado também pode ser afetado em uma pequena porcentagem de pacientes com SSp com elevadas enzimas do fígado, anticorpos antimitocondriais e lesões histopatológicas em estágio I de cirrose biliar primária. Hepatite autoimune também pode requerer o uso de prednisona e azatioprina (Mavragani *et al.*,

2010; Roescher *et al.*, 2010; Hernández-Molina *et al.*, 2011; Youniou *et al.*, 2011).

Envolvimento neurológico periférico é considerado muito comum em pacientes com SS, mas o envolvimento do sistema nervoso central é controverso, com uma variedade de manifestações clínicas incluindo acidente vascular cerebral, mielite transversa e manifestações psiquiátricas. A doença do sistema nervoso periférico se manifesta como neuropatia sensorial periférica, mononeurite múltipla ou neuropatia sensorial pura. Fadiga de etiologia não esclarecida afeta aproximadamente 50% dos pacientes com SS. No entanto, hipotireoidismo, fibromialgia, linfoma e depressão devem ser considerados (Mavragani *et al.*, 2010; Toida *et al.*, 2010).

Dispareunia secundária é observada em 40% de mulheres na pré-menopausa com SSp quando comparado com 3% do grupo controle. Lubrificantes vaginais podem ser usados, enquanto que cremes com cortisona devem ser evitados. Em mulheres na pós-menopausa, preparações de estrógeno são recomendadas (Mavragani *et al.*, 2010).

Vasculites na SS podem ocorrer tanto na forma cutânea localizada, manifestada principalmente como púrpura palpável (vasculite leucocitoclástica) ou uma vasculite sistêmica necrotizante, envolvendo artérias de porte médio ou pequeno de vários órgãos relatados na presença de crioglobulinemia (Voulgarelis *et al.*, 2010).

Desordens linfoproliferativas são as complicações mais sérias da síndrome de Sjogren, ocorrendo em cerca de 5% dos pacientes. A prevalência aumentada dessas desordens, principalmente o linfoma não-Hodgkin, pode ser explicada devido à hiperatividade das células B característica da SS. Além disso, a SS apresenta a maior incidência de desordens linfoproliferativas e do risco de linfoma (Peri *et al.*, 2012).

2.4 CRITÉRIOS CLASSIFICATÓRIOS DA SÍNDROME DE SJOGREN

A complexidade das características clínicas dos pacientes com SSp e SSs tornou difícil, ao longo dos anos, identificar um grupo homogêneo de pacientes com um etiopatogênese comum ou prognóstico para, por fim, elaborar um critério

classificatório para a doença. Essa é provavelmente a razão mais importante que explica porque muitos critérios classificatórios foram propostos para a SS (Baldini et al., 2012).

Atualmente, o critério Americano-Europeu de Consenso de 2002 é o mais utilizado para pacientes com SSp e SSs. Dada a sua alta sensibilidade e especificidade, ele tem sido largamente empregado na prática clínica para o diagnóstico dessa doença. Neste critério, deve-se preencher pelo menos 4 dos 6 critérios para completar o diagnóstico de SSp, sendo um deles sorologia positiva para os autoanticorpos anti-Ro e anti-La ou biópsia de glândula salivar menor positiva (Vitali et al., 2002). Esse diagnóstico também se baseia em características objetivas e subjetivas de boca seca (xerostomia) e olho seco (xeroftalmia) (Reksten et al., 2009;). O diagnóstico de envolvimento ocular é conseguido através da mensuração da produção de lágrima e estabilidade do filme de lágrima (usando teste de Schirmer e teste da quebra de lágrima, respectivamente) e pela coloração da córnea usando o teste de Rosa de Bengala – é um teste mais específico para diagnosticar xeroftalmia que o teste de Schirmer, pois avalia o dano do epitélio (Manoussakis et al., 2010). Para o diagnóstico de xerostomia, o paciente é avaliado através da quantidade produzida de saliva em repouso por 15 minutos. Pacientes com menos de 1,5ml por 15 minutos são considerados positivos para esse critério. Além do fluxo salivar em repouso, o envolvimento de glândula salivar pode ser avaliado através de sialografia da parótida e cintilografia (Vitali et al., 2002).

Em 2012, um novo critério foi proposto pelo Colégio Americano de Reumatologia (Quadro 1). Esse critério é centrado em apenas três características objetivas: ceratoconjutivite sicca diagnosticada através de coloração ocular maior ou igual a 3, biópsia de glândula salivar menor exibindo sialodenite focal linfocítica com escore de 1 ou mais focos por 4mm^2 , adjacente ao parênquima normal, e sorologia positiva para os autoanticorpos anti-Ro e anti-La ou para fator reumatoide (Shiboski et al., 2012). De acordo com esse critério, o paciente possui SS quando apresentar pelo menos 2 das 3 características clínicas citadas anteriormente (Rasmussen et al., 2014).

Com o intuito de comparar os critérios de 2002 e de 2012, foi realizada recentemente uma pesquisa em uma coorte de 646 pacientes. Os dois critérios

classificatórios obtiveram resultados concordantes na maioria dos casos e exames genéticos também realizados nesta pesquisa sugerem que não há diferenças claras entre os dois critérios sob a perspectiva biológica e clínica. Os autores ressaltam, ainda, a importância de avanços no diagnóstico que, para isso, irão requerer um melhor entendimento dos mecanismos patogênicos da presente doença (Rasmussen *et al.*, 2014).

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

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

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

2.5 ARTRITE REUMATOIDE

A artrite reumatoide (AR) é uma doença sistêmica autoimune que causa dano nas articulações, assim como complicações extra-articulares (He *et al.*, 2013). Afeta 1% da população mundial, com uma incidência três vezes maior em mulheres quando comparada aos homens, possuindo a população brasileira prevalência semelhante à da população mundial, aproximando-se de 1% (Zalewska *et al.*, 2013). A AR tende a surgir a partir da quarta década de vida, apresentando um pico de incidência na quinta década (Louzada-Júnior *et al.*, 2007).

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

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

Além das manifestações articulares, o envolvimento sistêmico pode causar sintomas como perda de peso, febre baixa, fadiga, nódulos reumatóides, serosite e vasculite. O acometimento da coluna cervical com a subluxação atlanto-axial (deslocamento das primeiras vértebras da coluna cervical) pode ocasionar quadros mais graves. Geralmente, manifesta-se por dor que “caminha” para a região occipital e dificuldade para mexer o pescoço. A severidade da AR pode se alterar com o tempo, mas sua cronicidade resulta

mais comumente em desenvolvimento progressivo de graus variados de destruição articular, deformidade e morte prematura (Khurana *et al.*, 2005).

As manifestações sistêmicas associadas, entre elas a síndrome de Sjogren que entre vários estudos como o de Aliko e colaboradores (2010), por exemplo, sugerem uma alta prevalência de sintomas de secura ocular e oral em pacientes com AR (Garetto *et al.*, 2005). A prevalência da SSs em pacientes com AR varia consideravelmente, dependendo da região geográfica. Em estudo realizado na população grega e inglesa, a SSs foi diagnosticada em 43% e 17% dos pacientes com AR, demonstrando a variação geográfica dessa doença (Drosos *et al.*, 1992).

Em pesquisa realizada por Haga *et al* (2012), 28% dos pacientes com AR apresentaram queixa de pelo menos um sintoma *sicca*. Em outro estudo semelhante realizado por Uhlig *et al* (1999), essa porcentagem foi maior, 60,7% dos pacientes com AR apresentaram pelo menos uma queixa de sintoma *sicca*. Sugere-se que os sintomas *sicca* estão associados com uma alta atividade da AR, e já foi demonstrado que existe uma correlação entre a redução da produção salivar e atividade da AR (Uhlig *et al.*, 1999; Young *et al.*, 2007).

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

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

Uma das respostas patológicas mais precoces na AR é a geração de

novos vasos sanguíneos sinoviais, sendo, portanto, considerada uma doença angiogênese-dependente. O evento é acompanhado de transferência de fluidos e infiltração de leucócitos polimorfonucleares para dentro da sinóvia (García-Carrasco *et al.*, 2006). A sinóvia reumatoide ativada destrói a cartilagem na junção osso-cartilagem, possuindo várias maneiras diferentes pelas quais essa cartilagem é degradada, entretanto a mais comum é a invasão direta desse tecido pelas células sinoviais (García-Carrasco *et al.*, 2006; Toussirot *et al.*, 2007).

Ao mesmo tempo em que a degradação da cartilagem acontece, ocorre também a destruição celular do osso subcondral (Toussirot *et al.*, 2007). As células clásticas ósseas e cartilaginosas são ativadas por citocinas sinoviais (TNF- α , RANKL, Catepsina K) e catepsinas B e L, as quais aumentam a capacidade destrutiva das metaloproteinases em destruir o osso. As células T e as células localizadas no estroma da medula óssea produzem o *receptor activator of nuclear KB ligand* (RANKL), o qual é essencial para a diferenciação, ativação e sobrevida dos osteoclastos. O resultado do curso da doença na AR é de destruição óssea e articular progressiva com ausência de qualquer sinal de reparo em resposta à inflamação (García-Carrasco *et al.*, 2006).

Não existe teste único que confirme a artrite reumatoide. Testes iniciais laboratoriais devem incluir contagem completa de células sanguíneas, fator reumatoide, velocidade de hemossedimentação e proteína-C reativa. O anticorpo peptídeo anticíclico citrulinado apresenta uma alta especificidade, porém só está presente em menos de 60% dos pacientes com artrite reumatoide (Makithia *et al.*, 2011).

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

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

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

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

2.6 O PAPEL DA RESPOSTA TH17

Estudos durante os últimos 20 anos têm esclarecido o papel do epitélio na regulação da resposta inflamatória local dos tecidos das glândulas salivares menores em pacientes com síndrome de Sjogren. Apesar da etiologia da SS ainda permanecer desconhecida, sabe-se que a composição do infiltrado celular local varia de acordo com a severidade da lesão, com células T predominando em lesões moderadas e células B em lesões severas (Athanasios *et al.*, 2012). Glândulas salivares de pacientes com SS mostram infiltrado significativo de células mononucleares, predominantemente linfócitos T CD8+, que possivelmente promove apoptose de células acinares. Entretanto, as células T CD4+ (helper - Th) participam da etiologia diferenciando-se em Th1, Th2 e Th17, que passam a produzir citocinas (Pertovaara *et al.*, 2006).

As citocinas são proteínas que regulam a resposta inflamatória e imunológica por meio de propriedades diversas; primeiramente, as citocinas são pleiotrópicas e, portanto, atuam em vários tipos celulares distintos. Também executam normalmente uma função em rede, de modo que possuem atividades redundantes onde várias citocinas atuam de modo semelhante. Por fim, são capazes de exercer efeito local mediado por receptor (Magnusson *et al.*, 2001).

A necessidade de compreensão dos mecanismos imunológicos responsáveis pelas lesões teciduais em diversas enfermidades inflamatórias crônicas e o desenvolvimento de estudos sobre populações de LT efetores levaram à caracterização de LT produtores de IL-17 e IL-23, denominados linfócitos Th17 (Magnusson *et al.*, 2001; O'Shea *et al.*, 2008). Estudos realizados em doenças autoimunes como artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico, psoríase, esclerose múltipla, esclerose sistêmica, doença inflamatória intestinal, espondilite anquilosante e artrite idiopática juvenil demonstraram a presença de níveis elevados de produtos inflamatórios relacionados à via efetora Th17 ou mesmo a sua participação direta nos mecanismos fisiopatogênicos (Souza *et al.*, 2010).

A IL-17 foi descrita em 1995/96 como uma citocina proinflamatória produzida por células Th17 e ganhou grande publicidade recentemente quando em 2005-2006 a fonte da IL-17, as células Th17, foi identificada em ratos. A chave do experimento foi que a adição de IL-17 nas células mesenquimais/fibroblastos foi capaz de aumentar a produção de IL-6 e outras citocinas proinflamatórias, mostrando imediatamente a sua ligação com a inflamação. Ao mesmo tempo, IL-17 induz maturação de neutrófilos, uma indicação de sua participação em mecanismos de defesa aguda do hospedeiro. Esse resultado mostrou a ligação entre IL-17 e a biologia dos neutrófilos (Miossec *et al.*, 2009).

IL-17 foi descoberta sob o nome de CTLA-8, produto de um gene sem função clara. Sua ligação com a artrite reumatoide (AR) foi imediatamente estabelecida, uma vez que sinoviócitos obtidos de membrana sinovial em pacientes com AR foram usados nos primeiros experimentos. Os resultados sugeriram uma contribuição em potencial de IL-17 na patogênese da AR e, mais tarde, foi estendido para outras doenças crônicas inflamatórias (Miossec *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2010).

Desde a sua identificação, a IL-17 foi descrita como uma citocina derivada das células Th17 que é altamente expressa em desordens autoimunes e é capaz de ativar células epiteliais durante a resposta inflamatória (Louten *et al.*, 2009). Além disso, linfócitos T CD4+ infiltrados em glândulas salivares de pacientes com SS predominantemente expressam IL-17 (também conhecida como IL-

17A). Essas observações sugerem que células Th17 estão envolvidas na patogênese da SS (Azusa *et al.*, 2008). Apesar do aparente envolvimento do Th17 no surgimento e/ou desenvolvimento da SS, não se pode esquecer da importância das vias Th1 e Th2. Similarmente à IL-17, a expressão de IL-17F tem sido associada a numerosas doenças inflamatórias, mas IL-17F apresenta atividade menor que IL-17 (Xiaofen *et al.*, 2010).

As células CD4+ auxiliares são consideradas importantes para a resposta imune a organismos infecciosos e na promoção de doenças autoimunes. Para conduzir a sua função total, células Th secretam uma variedade de citocinas que podem ser subdivididas em três diferentes tipos: interferon- γ (IFN- γ) secretado por Th1; IL-4, IL-5 e IL-14 secretadas por Th2 e IL-17 secretada por células Th17. Células Th17 foram identificadas como células T auxiliares distintas de células Th1 e Th2 e são células efetoras chave em uma variedade de doenças autoimunes, tais como esclerose múltipla, artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico e psoríase (Azusa *et al.*, 2008; Xiaofen *et al.*, 2010).

Os mecanismos de patogênese e padrão de resposta inflamatória predominantes nesta forma da doença necessitam ser melhor compreendidos, uma vez que há uma clara sobreposição com o perfil inflamatório e imunológico da doença de base.

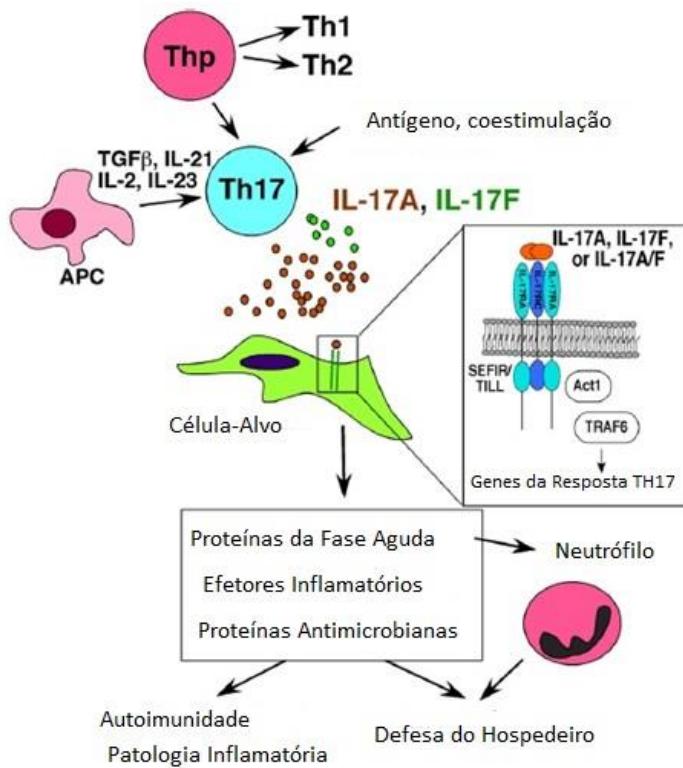


Figura 1 – Diferenciação das células Th17 (Gaffen *et al.*, 2008).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Analisar a influência dos polimorfismos IL-17A, -197G/A e IL-17F, 7488T/C na susceptibilidade à síndrome de Sjogren secundária à artrite reumatoide.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a presença e distribuição dos polimorfismos IL-17A, -197G/A e IL-17F, 7488T/C em pacientes com SSs à artrite reumatoide.
- Analisar a influência dos polimorfismos IL-17A, -197G/A e IL-17F, 7488T/C na secreção salivar e lacrimal, bem como nos sintomas de olho seco e boca seca em pacientes com SSs à artrite reumatoide.
- Avaliar a presença de associação entre os polimorfismos IL-17A, -197G/A e IL-17F, 7488T/C com marcadores clínicos de atividade de AR e SSs.

4. METODOLOGIA

4.1 DESENHO DO ESTUDO E DIVISÃO DOS GRUPOS

Trata-se de um estudo epidemiológico e observacional com procedimento laboratorial, composto por 206 indivíduos de ambos os sexos com idade maior que 18 anos e distribuídos em 3 grupos: grupo AR – Artrite Reumatoide (n=100), grupo SSs – síndrome de Sjogren secundária à Artrite Reumatoide (n=31) e grupo C – controle (n=75). A amostra foi obtida por conveniência.

Todos os pacientes do grupo AR e SSs são provenientes do Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE). O grupo controle é composto por indivíduos sem histórico de doença autoimune e sem queixa de xerostomia ou xeroftalmia e provenientes do Serviço de Estomatologia da UFPE. Todos os envolvidos na pesquisa consentiram previamente a sua inclusão no estudo por meio de assinatura do TCLE (APÊNDICE 2), após aprovação do projeto de pesquisa no CEP-UFPE sob CCAE 10221112.3.0000.5208. Foram rigorosamente seguidos todos os aspectos éticos, especificamente determinados pelas diretrizes e normas da Resolução nº 196 de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde.

4.2 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE

Grupo AR (n=100)

Critérios de inclusão:

1. Pacientes de ambos os gêneros com idade acima de 18 anos, portadores de artrite reumatoide de acordo com os critérios de classificação do Colégio Americano de Reumatologia (Arnett *et al.*, 1988) (Quadro 2);
2. Consentir a sua participação na pesquisa através da assinatura do TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido).

Grupo SSs (n=31)

Critérios de inclusão:

1. Pacientes de ambos os gêneros, com idade acima de 18 anos, portadores de AR e com diagnóstico de SSs, de acordo com os critérios de classificação do Grupo Americano e Europeu de Consenso (Vitali *et al.*, 2002) (Quadro 1);
2. Consentir sua participação na pesquisa por meio da assinatura do TCLE.

Critérios de exclusão (Grupos AR e SSs):

1. Pacientes submetidos a radioterapia prévia em região de cabeça e pescoço
2. Soropositivos para o vírus HVC;
3. Soropositivos para o vírus HIV;
4. Portadores de Linfoma;
5. Portadores de sarcoidose;
6. Portadores de doença do enxerto contra o hospedeiro;
7. Pacientes em uso recente de medicamentos com propriedades anticolinérgicas.

Grupo Controle (n=75)

Critérios de inclusão:

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

Critérios de exclusão:

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

4.3 AVALIAÇÃO CLÍNICA

Para avaliação dos pacientes cadastrados no Serviço de Reumatologia do HC-UFPE e com diagnóstico de AR, os pesquisadores responsáveis tiveram acesso aos prontuários dos pacientes elegíveis que se enquadram nos critérios de inclusão.

O questionário da pesquisa (APÊNDICE 1) foi realizado para obtenção de dados sócio-demográficos e relativos à história clínica da doença. Neste questionário, os pacientes responderam às perguntas para avaliação de xerostomia e xeroftalmia. Para avaliação da xerostomia, os pacientes responderam positivamente a uma das seguintes perguntas que compõem o critério Americano-Europeu de Consenso (Vitali *et al.*, 2002):

- *Você tem sensação de boca seca diariamente há mais de três meses?*
- *Você teve aumento recorrente ou persistente de glândulas salivares na fase adulta?*
- *Você sente necessidade de ingerir líquidos para auxiliar a deglutição de alimentos secos?*

Já para avaliação da xeroftalmia, os pacientes responderam positivamente a uma das três perguntas seguintes:

- *Você tem desconforto olhos secos de modo diário e persistente nos últimos 3 meses?*
- *Você tem sensação recorrente de areia nos olhos?*
- *Você utiliza substitutos lacrimais mais de 3 vezes por dia?*

Fluxo Salivar em Repouso (FSR)

Após preenchimento dos dados, seguiu-se a coleta de saliva para avaliação do fluxo salivar em repouso (FSR) através da obtenção da saliva total não-estimulada. A coleta ocorreu da seguinte forma segundo método desenvolvido por Navazesh, Christensen e Brightman (1992): o exame foi realizado no período da tarde, entre 14:00 e 17:00h, e o paciente foi orientado a

não ingerir alimentos, beber ou fumar por um período mínimo de 90 minutos antes da coleta. Após estarem sentados confortavelmente, os pacientes foram orientados a levar a cabeça levemente para frente, deglutar e então deixar a saliva escorrer da boca em um recipiente plástico milimetrado durante o período de 15 minutos. A taxa de FSR é determinada pelo valor total dividido por 15, sendo expressa em mililitros por minuto. Valores abaixo de 1,5mL (ou 0,1mL/min) foram considerados positivos.

Teste de Schirmer

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

Isolamento de DNA

Procedeu-se, também, coleta de células descamadas da mucosa oral para isolamento do DNA das células humanas e avaliação dos polimorfismos genéticos. Foi adotado o protocolo proposto por Aidar & Line (2007), no qual o paciente é orientado a realizar um bochecho com 5 ml de sacarose (3%) por 60 segundos, raspando-se as mucosas contra a língua, sendo a saliva coletada em tubo de centrifugação de 15ml. A este tubo, é adicionado 3 ml de solução de TNE diluído em etanol 66%. Após a coleta, o material é estocado a -20°C até ser utilizado, por um período máximo de 15 dias. Após os processamentos iniciais de coleta da saliva, o DNA foi extraído com o kit Qiamp DNA Blood Minikit (Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com as recomendações do fabricante.

Biópsia de glândula salivar menor

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

Processamento do Sangue

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

Genotipagem dos genes da resposta Th17

Os genes IL-17A (rs2275913) e IL-17F (rs763780) foram genotipados pela técnica de PCR em tempo real através da utilização do sistema de sondas TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA) com os ensaios ID C_15879983_10 e C_2234166_10, respectivamente. Foram pesquisadas as seguintes sequências alvo para avaliação de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP): o gene IL-17A, alelo 197G/A (rs2275913) e sequência forward 5'-

ATTTCTGCCCTCCCATT-3' e reverse 5'-CCCAGGAGTCATCGTTGTTT-3', e o gene IL-17F, alelo 7488T/C (rs763780) com sequência forward 5'-GCAGAGCACTGGTAAGGAG-3' e reverse 5'-CTGCATCAATGCTCAAGGA-3'.

As reações da PCR (Reação em cadeia da polimerase) foram preparadas utilizando o conjunto de reagentes TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) com o seguinte protocolo de reação: 6,25 µL de água, 1,25 µL de primer/sonda, 12,5 µL de Master Mix e 5 µL de DNA, sendo 25 µL o volume final. Utilizou-se como protocolo de ciclagem um total de 40 ciclos: 10 minutos a 95°C, e ciclagem de 15 segundos a 92°C e 1 minuto a 60°C. As reações foram realizadas no termociclador Rotor gene Q (Qiagen, Alemanha).

Análise Estatística

Para análise dos dados foram obtidas distribuições absolutas, percentuais e as medidas estatísticas: média, desvio padrão e mediana (Técnicas de estatística descritiva) e foram utilizados os testes estatísticos: F (ANOVA) para medidas repetidas com comparações de Bonferroni ou LSD no caso de incoerência entre os resultados do teste e as comparações de Bonferroni, t-Student pareado e Mc-Nemar (Técnicas de estatística inferencial).

A digitação dos dados e a obtenção dos cálculos estatísticos foram realizadas no programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) na versão 15. A margem de erro utilizada na decisão dos testes estatísticos foi 5,0%.

REFERÊNCIAS

- Aidar M, Line SRP (2007). A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. *Braz Dent J* **2**: 148-152.
- Aliko A, Ciancaglini R, Alushi A et al (2010). Sicca symptoms, and lacrimal and salivary flow in Albanian patients with rheumatoid arthritis. *J Oral Pathol Med* **39**: 651–656.
- Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA et al (1988). The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **31**: 315-324.
- Athanasiou GF, Efstathia KK, Haralampus MM (2012). Pathogenesis of Sjogren's syndrome: What we know and what we should learn. *J Autoimmun* doi:10.1016/j.jaut.2012.01.002: 1-5.
- Azusa S, Yumiko S, Toshinobu K et al (2008). Identification of IL-18 and Th17 cells in salivary glands of patients with Sjogren's syndrome, and amplification of IL-17-mediated secretion of inflammatory cytokines from salivary gland cells by IL181. *J Immun* **81**: 2898-2906.
- Baldini C, Talarico R, Tzioufas AG et al (2012). Classification criteria for Sjogren's syndrome: A critical review. *J Autoimm* **39**: 9-14.
- Bedell SE, Bush BT (1985). Erythrocyte sedimentation rate: from folklore to facts. *Am J Med* **78**: 1001-1007.
- Bijsterveld OPV (1969). Diagnostic tests in the sicca syndrome. *Arch Ophthalmol* **82**: 10-14.
- Bowman SJ (2012). Biologic therapies in primary Sjogren's syndrome. *C Pharmac Biotech* **13**: 1970-2008.
- Carmona L, González-Alvaro I, Balsa A et al (2003). Rheumatoid arthritis in Spain: occurrences of extra-articular manifestations and estimates of disease severity. *Ann Rheum Dis* **62**: 897–900.
- Deák M, Szvetnik A, Balog A et al (2013). Neuroimmune interactions in Sjogren's syndrome: Relationship of exocrine gland dysfunction with autoantibodies to muscarinic acetylcholine receptor-3 and mental health status parameters. *Neuroimmun* **20**: 79–86.
- Delaleu N, Jonsson MV, Appel S et al (2008). New concepts in the pathogenesis of Sjogren's syndrome. *Rheum Dis Clin N Am* **34**: 833-845.
- Drosos AA, Lanchbury JS, Panayi GS (1992) Rheumatoid arthritis in Greek and British patients. A comparative clinical, radiology and serology study. *Arthritis Rheum* **35**: 45–748.

- Gaffen SL (2008). An overview of IL-17 function and signaling. *Cyt* **43**: 402-407.
- García-Carrasco M, Fuentes-Alexandro S, Escárcega RO et al (2006). Pathophysiology of Sjogren's Syndrome. *Arch Med Res* **37**: 921-932.
- Garett F (2005). Epstein-Barr Virus (EBV) VCA IgG, EBNA IgG, EBV IgM, EA IgG: una diagnosi accurata delle diverse fasi dell'infezione. *L As* **1**: 129-135.
- Haga JH, Naderi Y, Moreno A et al (2012). A study of the prevalence of sicca symptoms and secondary Sjogren's syndrome in patients with rheumatoid arthritis, and its association to disease activity and treatment profile. *Int J Rheum* **15**: 284-288.
- Hamza N, Nicollaas A, Bos C et al (2012). B-cell populations and sub-populations in Sjogren's syndrome. *Press Med* **41**: 471-483.
- He J, Ding Y, Feng M et al (2013). Characteristics of Sjogren's syndrome in rheumatoid arthritis. *Rheum* **52**: 1084-1089.
- Hernández-Molina G, Leal-Alegre G, Michel-Peregrina, M (2011). The meaning of anti-Ro and anti-La antibodies in primary Sjogren's syndrome. *Autoimmun Rev* **10**: 123-125.
- Huang Y, Cheng Q, Jiang C et al (2013). The immune factors involved in the pathogenesis, diagnosis and treatment of Sjogren's syndrome. *Clin Dev Immun* **5**: 1-7.
- Ice JA, Li H, Adrianto I et al (2012). Genetics of Sjogren's syndrome in the genome-wide association era. *J Autoimmun* **39**: 57-63.
- Kamimura T, Sato H, Iwamoto M et al (2005). Sjogren's syndrome associated with chronic hepatitis C, severe thrombocytopenia, hypertrophic cardiomyopathy, and diabetes mellitus. *Intern Med* **44**: 657-661.
- Katsifis GE, Rekka S, Moutsopoulos NM et al (2009). Systemic and local interleukin-17 and linked cytokines associated with Sjogren's syndrome immunopathogenesis. *Am J Pathol* **3**: 1167-1177.
- Khurana R, Berney SM (2005). Clinical aspects of rheumatoid arthritis. *Pathophys* **12**: 153-165.
- Louten J, Boniface K, Malefyt RW (2009). Development and function of Th17 in health and disease. *J Allergy Clin Immunol* **5**: 1004-1011.
- Louzada-Junior P, Souza BDB, Toledo RA et al (2007). Descritiva das características demográficas e clínicas de pacientes com artrite reumatóide no Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Bras Reumatol* **2**: 84-90.
- Magnusson V, Nakken B, Bolstad AI et al (2001). Cytokine polymorphism in

systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome. *Scand J Immunol* **54**: 55-61.

Makithia V, Stephen A, Geraci MD (2011). Rheumatoid arthritis: diagnosis and management. *Am J Med* **120**: 936-939.

Manoussakis MN, Kapsogeorgou EK (2010). The role of intrinsic epithelial activation in the pathogenesis of Sjogren's syndrome. *J Autoimmun* **35**: 219-224.

Mavragani CP, Moutsopoulos HM (2010). The geoepidemiology of Sjogren's syndrome. *J Autoimmun* **9**: 305-310.

Miossec P (2009). IL-17 and Th17 cells in human inflammatory diseases. *Mic Infec* **11**: 625-630.

Mostafa S, Seamon V, Azzarolo AM (2012). Influence of sex hormones and genetic predisposition in Sjogren's syndrome: A new clue to the immunopathogenesis of dry eye disease. *Exp Eye Res* **96**: 88-97.

Naazesh M, Christensen C, Brightman V (1992). Clinical criteria for the diagnosis of salivary gland hypofunction. *J Dent Res* **7**: 1363-1369.

Nakayamada S, Fukimoto T, Nonomura A et al (2009). Usefulness of initial histological features of stratifying Sjogren's syndrome responders to mizoribine therapy. *Rheum* **48**: 1279-1282.

Nguyen CQ, Hu MH, Li Y et al (2008). Salivary gland tissue expression of interleukin-23 and interleukin-17 in Sjogren's syndrome. *Art & Rheum* **3**: 734-743.

O'Shea JJ, Hunter CA, Germain RN (2008). T cell heterogeneity: firmly fixed, predominantly plastic or merely malleable? *Nat Immunol* **9**: 450-453.

Peri YP, Agmon-Levin N, Theodor E et al (2012). Sjogren's syndrome, the old and the new. *B Pract Res Clin Rheum* **26**:105-117.

Pertovaara M, Antonen J, Hurme M (2006). Th2 cytokine genotypes are associated with a milder form of primary Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis* **65**: 666-670.

Ramos-Casals M, García-Carrasco M, Brito Zeron MP et al (2002). Viral etiopathogenesis of Sjogren's syndrome: role of hepatitis C virus. *Autoimmun Rev* **1**: 238-43.

Ramos-Casals M, Muñoz S, Zerón PB (2008). Hepatitis C virus and Sjogren's syndrome: Trigger or mimic? *Rheum Dis Clin N Am* **34**: 869-884.

Rasmussen A, Ice J, Li H et al (2014). Comparison of the American-European Consensus Group Sjögren's syndrome classification criteria to newly proposed

American College of Rheumatology criteria in a large, carefully characterised SICCA cohort. *Ann Rheum Dis* **73**: 31-38.

Reksten TR, Jonsson MV, Szyszko EA et al (2009). Cytokine and autoantibody profiling related to histopathological features in primary Sjogren's syndrome. *Rheumat* **48**: 1102-1106.

Roescher N, Tak PP, Illei GG (2010). Cytokines in Sjogren's syndrome: potential therapeutic targets. *Ann Rheum Dis* **69**: 945-948.

Sakai A, Sugawara Y, Kuroishi T et al (2008). Identification of IL-18 and Th17 cells in salivary glands of patients with Sjogren's syndrome, and amplification of IL-17-mediated secretion of inflammatory cytokines from salivary gland cells by IL-18. *J Immunol* **181**: 2898-2906.

Souza AWS, Júnior DM, Araújo JAP et al (2010). Sistema Imunitário- Parte III. O delicado equilíbrio no sistema imunológico entre os pólos de tolerância e autoimunidade. *Rev Bras Reumatol* **6**: 665-694.

Toida M, Nanya Y, Takeda-Kawaguchi T et al (2010). Oral complaints and stimulated salivary flow rate in 1188 adults. *J Oral Pathol Med* **39**: 407-419.

Toussirot E, Roudier J (2007). Pathophysiological links between rheumatoid arthritis and the Epstein-Barr virus: an update. *J Bon Sp* **5**: 418–426.

Turesson C, O'Fallon WM, Crowson CS et al (2003). Extra-articular disease manifestations in rheumatoid arthritis: incidence trends and risk factors over 46 years. *Ann Rheum Dis* **62**: 722-727.

Tzioufas AG, Tatouli IP, Moutsopoulos HM (2012). Autoantibodies in Sjogren's syndrome: Clinical presentation and regulatory mechanisms. *Press Med* **9**: 451-460.

Uhlig T, Kvien TK, Jensen JL et al (1999). Sicca symptoms, saliva and tear productions, and disease variables in 636 patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **58**: 415–422.

Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R et al (2002). Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis* **61**: 554-558.

Voulgarelis M, Tzioufas AG (2010). Pathogenetic mechanisms in the initiation and perpetuation of Sjogren's syndrome. *Nat Rev Rheumatol* **6**: 529-537.

Waldburguer JM (2008). Rheumatoid arthritis- epidemiology, pathology and pathogenesis. *P Rheum Dis* **3**: 122-132.

Xiaofen S, Cintia SP, De-Quan L et al (2010). Desiccating stress promotes Th17 differentiation by ocular surface tissues through a dendritic cell-mediated pathway. *Assoc Res Vis Ophthalm* **32**: 105-112.

Youinou P, Pers JO (2011). Disturbance of cytokine networks in Sjogren's syndrome. *Art Res & Ther* **13**: 1-10.

Young A, Koduri G (2007) Extra-articular manifestations and complications of rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* **21**: 909–927.

Zalewska A, Kans M, Waszkiewicz N et al (2013). Rheumatoid arthritis patients with xerostomia have reduced production of key salivary constituents. *Oral Med* **4**: 483-490.

5. ARTIGO

Avaliação da Associação dos Polimorfismos dos Genes IL-17A e IL-17F com Artrite Reumatoide e Síndrome de Sjogren

RUNNING TITLE:

*Polimorfismos dos Genes IL-17A e IL-17F na Artrite Reumatoide e
Síndrome de Sjogren*

Camila Nunes Carvalho¹

1- Mestranda. Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Universidade Federal de Pernambuco

Autor correspondente:

Camila Nunes Carvalho
Rua Engenheiro Vasconcelos Bittencourt, n. 149, apto. 208, Várzea
Recife-PE CEP: 50.740-180
+55 81 9950-3786
nunes.carvalho.camila@hotmail.com

5.1 RESUMO

Introdução: A resposta Th17 desempenha papel chave em diversas doenças inflamatórias e autoimunes, no entanto sua participação na síndrome de Sjogren (SS) ainda permanece incerta. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi avaliar a influência dos polimorfismos da resposta Th17 na susceptibilidade e severidade da síndrome de Sjogren secundária (SSs) a artrite reumatoide (AR). **Materiais e Métodos:** Foi avaliada uma amostra composta por 206 pacientes de ambos os sexos, com idade maior que 18 anos e distribuídos em três grupos: artrite reumatoide (AR- 100 pacientes), síndrome de Sjogren secundária à artrite reumatoide (SSs – 31 pacientes) e controles saudáveis (C - 75 pacientes). Todos os pacientes foram submetidos à avaliação clínica e mensuração do fluxo salivar em repouso, teste de Schirmer; alguns pacientes portadores de AR foram ainda submetidos à biópsia de glândula salivar menor para definição do diagnóstico de SSs. Amostras de saliva foram coletadas para isolamento do DNA e genotipagem dos genes da resposta Th17, IL-17A -197G/A e IL-17F 7488T/C. **Resultados:** Os polimorfismos genéticos não foram associados com a suscetibilidade à AR e SSs ($p>0,05$). Também não se observou influência destes na atividade de AR e nos indicadores clínicos da SS. **Conclusão:** Os polimorfismos IL-17A -197G/A e IL-17F 7488T/C não se mostraram relacionados à suscetibilidade e atividade da AR e SSs na população estudada.

Palavras-chave: Polimorfismo Genético. Interleucina 17. Artrite Reumatoide. Síndrome de Sjogren.

5.2 ABSTRACT

Introduction: The Th17 response plays a key role in several inflammatory and autoimmune diseases, however their involvement in Sjogren's syndrome (SS) remains uncertain. **Objective:** The aim of this study was to evaluate the influence of polymorphisms of Th17 response in susceptibility and severity of Sjogren's syndrome secondary (sSS) to rheumatoid arthritis (RA). **Materials and Methods:** A sample of 206 patients of both sexes, with more than 18 years and divided into three age groups was evaluated: Rheumatoid arthritis (RA - 100 patients), Sjogren's syndrome secondary to rheumatoid arthritis (sSS – 31 patients) and healthy controls (C - 75 patients). All patients underwent clinical evaluation, measurement of salivary flow and Schirmer's test; some RA patients were undergoing minor salivary gland biopsy for diagnostic definition of sSS. Saliva samples were collected for DNA isolation and genotyping of Th17 response genes, IL -17A – 197G/A and IL -17F 7488T/C. **Results:** Genetic polymorphisms were not associated with susceptibility to RA and sSS ($p > 0.05$). Also no effect was observed in these RA activity and clinical indicators of SS. **Conclusion:** IL -17A – 197G/A and IL - 17F 7488T/C polymorphisms were not related to susceptibility and sSS and RA activity in the studied population.

Keywords: Genetic Polymorphism. Interleukin 17. Rheumatoid Arthritis. Sjogren's Syndrome.

5.3 INTRODUÇÃO

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

A SS é classicamente categorizada em primária (SSp), quando ocorre isoladamente, ou como secundária (SSs) quando em associação com outra doença autoimune sistêmica, tal como lúpus eritematoso sistêmico (LES) ou artrite reumatoide (AR). A prevalência de SSs varia de acordo com a doença associada, sendo da ordem de 9 a 19% no LES, e de 4 a 31% na AR. Apesar de sua ocorrência relativamente comum, a SS é usualmente subdiagnosticada, subtratada e pouco compreendida, e a forma secundária é frequentemente considerada como evolução sintomática da patologia de base e não uma doença associada (Rozman *et al.*, 2004; Mavragani *et al.*, 2007).

Apesar de alguns eventos patológicos chaves da SS serem bem conhecidos, sua etiologia ainda permanece incerta. Algumas linhas de evidência sugerem que SS resulta da interação de agentes ambientais com um grau variável de predisposição genética levando a alteração patológica do padrão de resposta imune. As citocinas são mediadores importantes na inflamação e nas reações imunes e, nos últimos anos, seu papel específico na SS tem sido extensivamente estudado. A desregulação da síntese/secréção de citocinas contribui tanto para as manifestações exócrinas quanto para as manifestações sistêmicas da síndrome de Sjogren. Nas glândulas, observa-se superexpressão de citocinas proinflamatórias (IFN α e γ , TNF, IL-12 e 18 em conjunto com outras citocinas importantes na ativação de células B e T, tais com IL-6). Por outro lado, outras importantes citocinas proinflamatórias, tais como IL-4 e fator de transformação de crescimento β (TGF- β) estão expressas em níveis baixos (Roescher *et al.*, 2010). No soro, IL-6 e IL-17 se apresentam em níveis altos (Katsifis *et al.*, 2009; Roescher *et al.*, 2010) e uma grande quantidade destas citocinas e de IL-12 e IL-18 estão associadas à inflamação e diminuição da função glandular, bem como à linfogênese (Roescher *et al.*, 2010).

Algumas linhas de evidência sugerem uma contribuição de um subtipo de células T mais recentemente descoberto – as células Th17 – na imunopatogênese de várias desordens autoimunes, incluindo a SS (Mavragani *et al.*, 2010). Essas células foram identificadas como células T auxiliares distintas das células Th1 e Th2 e são descritas como efetoras chave em uma variedade de doenças autoimunes, tais como esclerose múltipla, artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico e psoríase (Deák *et al.*, 2013). A resposta Th17 produz a citocina IL-17 e a sua adição nas células mesenquimais/fibroblastos é capaz de aumentar a produção de IL-6 e outras citocinas proinflamatórias, mostrando imediatamente a sua ligação com a inflamação. Ao mesmo tempo, IL-17 induz maturação de neutrófilos, uma indicação de sua participação em mecanismos de defesa aguda do hospedeiro. Esse resultado mostrou a ligação entre IL-17 e a biologia dos neutrófilos (Miossec *et al.*, 2009). Contudo, apesar dos esforços recentes os eventos que promovem a perda do balanço imune e favorecem a infiltração linfocitária nas glândulas exócrinas de pacientes com SS ainda permanecem pouco compreendidos.

Na SS, linfócitos T CD4+ infiltrados em glândulas salivares expressam predominantemente IL-17 (também conhecida como IL-17A), sugerindo sua participação na patogênese da SS (Hernández-Molina *et al.*, 2011). As células T regulatórias promovem um controle compensatório da expansão das células Th17 no início do processo de infiltração linfocitária, e este controle parece ser menos efetivo em lesões mais avançadas que promovem injúria tecidual (Mavragani *et al.*, 2010, Youinou *et al.*, 2011). Outros estudos sugerem uma superregulação de IL-17 e IL-23 na SS, mas uma associação com manifestações clínicas específicas ainda não foi estabelecida (Sakai *et al.*, 2008; Roescher *et al.*, 2010; Reksten *et al.*, 2011).

Neste contexto, os mecanismos de patogênese e padrão de resposta inflamatória predominantes na forma secundária da doença necessitam ser melhor compreendidos. Baseado nisso e considerando que a identificação de polimorfismos da interleucina 17 na síndrome de Sjögren secundária não foi estudada até agora, o objetivo desse estudo foi investigar a possível associação entre IL-17A (-197G/A) e IL-17F (7488T/C) na SSs. Genótipos e frequências alélicas também foram comparados com as características clínicas da SSs e AR.

5.4 METODOLOGIA

Foi realizado um estudo epidemiológico e observacional com procedimento laboratorial, composto por 206 pacientes de ambos os sexos com idade maior que 18 anos e distribuídos em 3 grupos: grupo AR – Artrite Reumatoide (n=100), grupo SSs – Síndrome de Sjogren secundária à Artrite Reumatoide (n=31) e grupo C – controles saudáveis (n=75). Todos os pacientes dos grupos AR e SS foram provenientes do Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE) e a amostra obtida foi por conveniência. O grupo controle foi composto por indivíduos saudáveis sem evidência ou histórico de doença autoimune nem relato de xerostomia ou xeroftalmia. Todos os envolvidos na pesquisa consentiram previamente a sua inclusão no estudo por meio de assinatura do TCLE, após aprovação do mesmo no CEP-UFPE sob CCAE 10221112.3.0000.5208.

O diagnóstico de artrite reumatoide foi baseado no critério determinado pelo Colégio Americano de Reumatologia (Arnet et al., 1988) e o diagnóstico da síndrome de Sjogren secundária foi estabelecido através do critério do Colégio Americano-Europeu de Consenso (Vitali et al., 2002). Foram excluídos do estudo pacientes com história de radioterapia na região de cabeça e pescoço, infecção por HIV, sarcoidose, amiloidose, doença do enxerto contra hospedeiro, infecção por HCV e em uso de drogas anticolinérgicas.

Avaliação dos pacientes

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

Do mesmo modo, para avaliação da xeroftalmia, o paciente respondeu positivamente a uma das três perguntas seguintes: *Você tem desconforto olhos secos de modo diário e persistente nos últimos 3 meses? Você tem sensação*

recorrente de areia nos olhos? Você utiliza substitutos lacrimais mais de 3 vezes por dia?

Avaliação do Fluxo Salivar em Repouso e Teste de Schirmer

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

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

Biópsia de Glândula Salivar Menor

Para os pacientes que relataram xerostomia e/ou xeroftalmia com fluxo salivar menor que 0,1 ml/min ou teste de Schirmer menor que 5mm/5min, foi realizada biópsia de glândulas salivares menores. Este procedimento consiste de uma pequena incisão de 1,5 a 2,0 cm na mucosa labial inferior lateralmente 1 cm à linha média, onde foram retiradas de 4 a 7 glândulas salivares menores

para avaliação histopatológica com o objetivo de confirmar o diagnóstico da síndrome de Sjogren. Após a remoção do espécime cirúrgico, o mesmo foi fixado em solução a 10% de formol neutro tamponado e encaminhado para processamento para posterior análise por um patologista oral. Os casos foram considerados positivos quando observados um ou mais focos de 50 ou mais linfócitos em 4mm².

Atividade de AR

Para avaliação da atividade de AR foi utilizado o Disease Activity Score 28 (DAS28), que utiliza o número de articulações dolorosas e edemaciadas, avaliação da atividade da doença realizada pelo reumatologista e pelo paciente, além da velocidade de hemossedimentação. A doença foi classificada em remissão ou atividade leve (DAS28≤2,6), e atividade moderada e severa (DAS28>2,6), de acordo com Fransen *et al.*, 2004.

Coleta de Saliva e Isolamento do DNA

Procedeu-se também a coleta de saliva para isolamento do DNA das células humanas e avaliação dos polimorfismos genéticos. Foi adotado o protocolo proposto por Aidar & Line (2007), no qual o paciente foi orientado a realizar um bochecho com 5 ml de sacarose (3%) por 60 segundos, raspando-se as mucosas contra a língua, sendo a saliva coletada em tubo de centrifugação de 15ml. A este tubo, é adicionado 3 ml de solução de TNE diluído em etanol 66%. Após a coleta, o material foi estocado a -20°C até o isolamento do DNA, realizado após um período máximo de 15 dias. Após os processamentos iniciais de coleta da saliva, o DNA foi extraído com o kit Qiamp DNA Blood Minikit (Qiagen, Hilden, Alemanha), de acordo com as recomendações do fabricante.

Genotipagem dos genes da resposta Th17

Os genes IL-17A (rs2275913) e IL-17F (rs763780) foram genotipados pela técnica de PCR em tempo real através da utilização do sistema de sondas TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA) com os ensaios ID C_15879983_10 e C_2234166_10, respectivamente. Foram pesquisadas as seguintes sequências alvo para avaliação de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP): o gene IL-17A, alelo -197G/A (rs2275913) e sequência forward 5'-ATTTCTGCCCTTCCCATT-3' e reverse 5'-CCCAGGAGTCATCGTTGTT-

3', e o gene IL-17F, alelo 7488T/C (rs763780) com sequência forward 5'-GCAGAGCACTGGTAAGGAG-3' e reverse 5'-CTGCATCAATGCTCAAGGA-3'.

As reações da PCR foram preparadas utilizando o conjunto de reagentes TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) com o seguinte protocolo de reação: 6,25 µL de água, 1,25 µL de primer/sonda, 12,5 µL de Master Mix e 5 µL de DNA, sendo 25 µL o volume final. Utilizou-se como protocolo de ciclagem um total de 40 ciclos: 10 minutos a 95°C, e ciclagem de 15 segundos a 92°C e 1 minuto a 60°C. As reações foram realizadas no termociclador Rotor gene Q (Qiagen, Alemanha).

Análises estatísticas

Para análise dos dados foram obtidas distribuições absolutas, percentuais e as medidas estatísticas: média, desvio padrão e mediana (Técnicas de estatística descritiva) e foram utilizados os testes estatísticos: F (ANOVA) para medidas repetidas com comparações de Bonferroni ou LSD no caso de incoerência entre os resultados do teste e as comparações de Bonferroni, t-Student pareado e Mc-Nemar (Técnicas de estatística inferencial).

A digitação dos dados e a obtenção dos cálculos estatísticos foram realizadas no programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) na versão 15. A margem de erro utilizada na decisão dos testes estatísticos foi 5,0%.

5.5 RESULTADOS

Pacientes

Foram incluídos no estudo 206 pacientes, sendo 20 homens e 186 mulheres, com idades variando de 18 a 86 anos e média de 51,43 anos. Os grupos foram compostos por: grupo AR – 100 pacientes, sendo 93 mulheres (93%), grupo SSs – 31 pacientes, todas mulheres (100%) e grupo C – 75 pacientes, sendo 62 mulheres (82,7%). A idade do grupo AR teve média de 52,22 anos, variando de 19 a 80 anos; o grupo SSs apresentou média de 56,22 anos, variando de 37 a 77 anos, e o grupo C uma idade média de 48,32 anos variando de 18 a 86 anos.

Características Clínicas

Quando os critérios classificatórios foram avaliados, o grupo SSs agrupou maior parte dos pacientes com queixa de xerostomia e xeroftalmia ($n=28$, 90,3%; $n=22$, 71%, $p<0,001$ e $p<0,007$, respectivamente,), teste de Schirmer positivo ($n=31$, 100%, $p<0,001$), fluxo salivar em repouso reduzido ($n=27$, 87,1%, média 0,071ml/min, $p<0,001$) e biópsia com infiltrado inflamatório glandular compatível com SS ($n=12$, 52,17%, $p<0,001$). Os pacientes do grupo AR apresentaram xerostomia e xeroftalmia em frequência semelhante aos controles saudáveis. Do mesmo modo, as taxas de fluxo salivar em repouso e teste de Schirmer não diferiram entre estes grupos (dados não mostrados).

Marcadores da AR

Os marcadores de atividade de AR (VHS, número de articulações edemaciadas e doloridas e DAS28) não mostraram diferença entre os grupos AR e SSs (Tabela 1). A média da VHS mostrou-se discretamente maior no grupo SSs (36,35mm/h) que no grupo AR (34,07mm/1h) ($p= 0,688$). Na avaliação das articulações dolorosas e edemaciadas, também não foi verificada diferença entre os dois grupos ($p= 0,685$ e $0,582$, respectivamente). O mesmo ocorreu na avaliação do DAS28, com $p= 0,924$ (Tabela 1).

Tabela 1. Avaliação da associação entre as variáveis numéricas velocidade de hemossedimentação (VHS), articulações dolorosas e edemaciadas e escore de atividade da doença (DAS28) e os grupos SSs e AR.

Variável	Grupo		Valor de p
	SSs	AR	
	Média ± DP (Mediana)	Média ± DP (Mediana)	
• VHS	$36,35 \pm 23,87$ (28,00)	$34,07 \pm 22,67$ (29,00)	$p^{(1)} = 0,688$
• Articulações dolorosas	$5,61 \pm 8,32$ (2,00)	$6,74 \pm 9,32$ (2,50)	$p^{(1)} = 0,685$
• Articulações edemaciadas	$2,58 \pm 3,53$ (2,00)	$2,57 \pm 4,31$ (1,00)	$p^{(1)} = 0,582$
• DAS28	$4,24 \pm 1,43$ (4,33)	$4,32 \pm 1,64$ (4,15)	$p^{(1)} = 0,924$

(1): Através do teste de Mann-Whitney.

Avaliação dos Polimorfismos da IL-17A e IL-17F

Os genótipos e frequência alélica dos genes IL-17A -197G/A e IL-17F 7488T/C não apresentaram associação com a susceptibilidade a AR ou SS ($p=0,528$, $p=0,240$, respectivamente, Tabela 2). A avaliação do papel destes polimorfismos nos marcadores clínicos e laboratoriais destas doenças também não se mostrou estatisticamente relevante (Tabela 3).

Tabela 2. Avaliação da associação entre genótipos e frequência alélica dos genes IL-17A -197G/A e IL-17F 7488T/C e a susceptibilidade a AR e SSs.

Variável	Grupo						Grup o Total	Valor de p
	SSs		AR		Controle			
	n	%	n	%	n	%	n	%
• IL-17A								
GG	18	58,1	56	56,0	49	65,3	123	59,7
GA	12	38,7	38	38,0	20	26,7	70	34,0
AA	1	3,2	6	6,0	6	8,0	13	6,3
• IL-17F								
TT	26	83,9	87	87,0	69	92,0	182	88,3
TC	5	16,1	10	10,0	3	4,0	18	8,7
CC	-	-	3	3,0	3	4,0	6	2,9
TOTAL	31	100,0	100	100,0	75	100,0	206	100,0
• Nº de alelos – IL-17A								
G	48	77,4	150	75,0	118	78,7	316	76,7
A	14	22,6	50	25,0	32	21,3	96	23,3
• Nº de alelos – IL-17F								
T	57	91,9	184	92,0	141	94,0	382	92,7
C	5	8,1	16	8,0	9	6,0	30	7,3
TOTAL	62	100,0	200	100,0	150	100,0	412	100,0

(1): Através do teste Exato de Fisher.

(1): Através do teste Exato de Fisher.
 (2): Através do teste Qui-quadrado de Pearson.

Tabela 3. Avaliação da associação entre genótipos e frequência alélica dos genes IL-17A -197G/A e IL-17F 7488T/C e as características clínicas da AR e SSs.

Positivo	54	64,3	27	32,1	3	3,6	$p^{(2)} = 0,313$	73	86,9	10	11,9	1	1,2	$p^{(2)} = 0,230$
Negativo	69	56,6	43	35,2	10	8,2		109	89,3	8	6,6	5	4,1	
Total	123	59,7	70	34,0	13	6,3		182	88,3	18	8,7	6	2,9	
• DAS28														
<2,6														
	14	70,0	5	25,0	1	5,0	$p^{(2)} = 0,398$	19	95,0	1	5,0	-	-	$p^{(2)} = 0,675$
$\geq 2,6$														
	60	54,1	45	40,5	6	5,4		94	84,7	14	12,6	3	2,7	
• Xerostomia														
Positivo														
	35	51,5	30	44,1	3	4,4	$p^{(2)} = 0,329$	60	88,2	7	10,3	1	1,5	$p^{(2)} = 0,760$
Negativo														
	39	61,9	20	31,7	4	6,3		53	84,1	8	12,7	2	3,2	
• Xeroftalmia														
Positivo														
	36	55,4	25	38,5	4	6,2	$p^{(2)} = 0,959$	16	30,8	19	42,2	3	18,8	$p^{(2)} = 0,624$
Negativo														
	38	57,6	25	37,9	3	4,5		36	69,2	26	57,8	13	81,3	
• SSs														
Sim														
	18	58,1	12	38,7	1	3,2	$p^{(1)} = 0,835$	26	83,9	5	16,1	-	-	$p^{(2)} = 0,440$
Não														
	56	56,0	38	38,0	6	6,0		87	87,0	10	10,0	3	3,0	
Total	74	56,5	50	38,2	7	5,3		113	86,3	15	11,5	3	2,3	
• Biópsia														
Positivo														
	7	58,3	4	33,3	1	8,3	$p^{(2)} = 0,308$	11	91,7	1	8,3	-	-	$p^{(2)} = 0,539$
Negativo														
	22	57,9	16	42,1	-	-		28	73,7	8	21,1	2	5,3	
Total	29	58,0	20	40,0	1	2,0		39	78,0	9	18,0	2	4,0	

(1): Através do teste Qui-quadrado de Pearson.

(2): Através do teste Exato de Fisher.

5.6 DISCUSSÃO

A avaliação da SS com a AR tem sido pouco estudada, e a influência do perfil inflamatório da exocrinopatia na atividade e progressão da AR ainda não é conhecida. Neste contexto, o presente estudo avaliou o papel dos polimorfismos

IL-17A-197GA e IL-17F7499TC na susceptibilidade a AR e SS, bem como na atividade de AR. Ainda, a atividade da AR foi comparada entre os pacientes portadores de AR exclusiva e AR associada a SS. Os polimorfismos estudados não mostraram associação com as características clínicas da AR e SSs, nem com a susceptibilidade a estas doenças. Também não se observou diferenças entre a atividade de AR nos grupos analisados. No nosso conhecimento, estes polimorfismos ainda não foram avaliados na SS, e os estudos do papel da resposta Th17 e IL-17 têm sido focados na forma primária da doença.

No presente estudo, a SSs foi observada exclusivamente em mulheres, confirmando a forte predileção pelo sexo feminino classicamente descrita (Delaleu *et al.*, 2008; Hamza *et al.*, 2012; Icô *et al.*, 2012; Tzioufas *et al.*, 2012). Segundo estudo previamente realizado em uma população da Eslovênia, a média de idade dos pacientes com síndrome de Sjogren primária foi de 52,2 anos (Tomsic *et al.*, 1999). No presente estudo, a média de idade dos pacientes com a forma secundária da doença foi de 56,22 anos, sugerindo que a SSs tende a se manifestar mais tarde.

Neste estudo foi observado que os pacientes do grupo SSs agruparam todos os sintomas *sicca*, de modo que pacientes com AR exclusiva mostraram função exócrina e níveis de xerostomia e xeroftalmia semelhantes aos pacientes saudáveis. Mesmo considerando a possibilidade de circular reasoning (onde aspectos incluídos num critério de classificação são posteriormente analisados de modo isolado, sendo um bias de avaliação importante), deve-se considerar que a SS é diagnosticada com base em múltiplos indicadores, e sua identificação entre portadores de uma collagenose evidencia que o cluster de sintomas *sicca* fazem parte da doença. Ainda, a atividade de AR não se mostrou diferente entre os pacientes com e sem SS, podendo sugerir que a síndrome é uma doença distinta e associada a AR, conforme previamente relatado (Souza *et al.*, 2014).

Mesmo sendo baseadas em múltiplos critérios, a classificação da SS considera a presença de um padrão específico de infiltrado inflamatório periductal nas glândulas salivares como um marco significativo na doença. Daniels *et al.* (2011) reforçou recentemente a importância da biópsia de glândula salivar menor para o diagnóstico de SS, descrevendo sua alta especificidade. A presença do foco linfocítico, juntamente com a presença de autoanticorpos, é

considerada chave para o diagnóstico dessa doença, apesar de não ser capaz de estabelecer o diagnóstico se considerada isoladamente (Stewart *et al.*, 2008; Daniels *et al.*, 2011; Tavoni *et al.*, 2012). No presente estudo, pouco mais da metade dos pacientes com SS apresentou infiltrado inflamatório glandular compatível com SS. No entanto, deve ser considerado que todos os pacientes incluídos nesta pesquisa estavam sob terapia imunossupressora quando a biópsia foi realizada, de modo que uma possível interferência do tratamento no padrão de infiltrado inflamatório glandular deve ser considerada. Resultado semelhante foi encontrado em pesquisa realizada por Pereira *et al.* (2013) com 38 pacientes com suspeita de SS, na qual apenas 48% dos pacientes apresentaram biópsia de glândula salivar positiva para SS. Segundo o estudo, a maioria dos pacientes também estava sob terapia imunossupressora anteriormente à biópsia. Em um dos poucos estudos que avaliou a evolução do infiltrado inflamatório no curso do tratamento da SS, Zandbelt *et al.* (2011) encontrou alterações nos parâmetros histológicos (quantidade de focos linfocitários) em pacientes com SS antes e após a terapia com corticosteroides, sugerindo que a biópsia de glândula salivar menor pode ser útil também para o monitoramento da atividade da doença.

As citocinas produzidas pelas células Th17, principalmente as interleucinas 17A e 17F, são moléculas proinflamatórias potentes, envolvidas ativamente na inflamação tecidual através da indução da expressão de outras citocinas proinflamatórias. A IL-17A está envolvida na mobilização, maturação e migração de neutrófilos ao sítio de injúria (Nguyen *et al.*, 2011). Ainda, níveis altos de IL-17A foram detectados na sinóvia inflamada de pacientes com artrite reumatoide, sugerindo um papel importante dessas células na patogênese da AR. Além disso, as células Th17 parecem influenciar a osteoclastogênese em modelos de ratos com artrite, conforme encontrado em estudo anterior (Sato *et al.*, 2006). Em estudo realizado com 123 pacientes japoneses com AR, foi observada associação entre polimorfismos na IL-17A e a progressão radiográfica da doença (Furuya *et al.*, 2007). Contudo, apesar das células Th17 serem detectadas na sinóvia e em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com AR, a quantidade dessas células não é elevada quando comparado com controles saudáveis (Yamada *et al.*, 2007).

Polimorfismos funcionais usualmente aumentam a síntese proteica e promovem consequente elevação nos níveis séricos do produto proteico (Mavragani *et al.*, 2010). Espinoza *et al.* (2011) reportaram que genótipos 197A alelo positivo (genótipos GA/AA) secretariam mais IL-17 que as células 197A alelo-negativas. Apesar dos mecanismos básicos não serem ainda claros, os estudos mostram que o polimorfismo genético na região promotora da IL17 (rs2275913 – G197A) está associado com suscetibilidade em várias doenças inflamatórias e autoimunes, incluindo artrite reumatoide, colite ulcerativa, câncer gástrico e de mama (Arisawa, 2008; Nordang *et al.*, 2009; Shibata *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2012). Esse polimorfismo está localizado no fator nuclear de células T ativadas, o qual é um regulador crítico do promotor IL-17 (Liu *et al.*, 2004). Portanto, é concebível que o SNP rs2275913 exerce efeito na regulação transcripcional da IL-17, o que resulta em uma secreção mais eficiente dessa interleucina (Espinoza *et al.*, 2011).

Apesar deste polimorfismo ter sido associado à suscetibilidade a várias doenças autoimunes, no presente estudo não foi encontrada associação com a artrite reumatoide nem com a síndrome de Sjogren secundária, sugerindo que esse polimorfismo parece não ser fator de risco para estas doenças. Nordang e colaboradores (2009) avaliaram em 950 pacientes com artrite reumatoide a associação entre susceptibilidade a doença e vários SNPs da IL-17A, e observaram apenas uma fraca influência do polimorfismo rs2275913 na susceptibilidade a AR ($p=0,02$, OR = 1,17) em uma população norueguesa. Em outro estudo realizado com 438 pacientes japoneses, os autores concluem que o polimorfismo G197A pode afetar a iniciação da artrite reumatoide, mas não a progressão da doença ou sua severidade (Espinoza *et al.*, 2011). Contudo, esta associação ainda não foi avaliada nas formas clínicas da síndrome de Sjogren.

O polimorfismo da IL-17F (7488T/C) se mostra igualmente associado a uma maior suscetibilidade a várias doenças inflamatórias, incluindo asma, doença inflamatória do intestino, doença de Crohn e doença de Behçet (Ramsey *et al.*, 2005; Arisawa *et al.*, 2008; Seiderer *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009; Paradowska-Gorycka *et al.*, 2010). Assim como a IL-17A, IL-17F é produzida pelas células T ativadas e induz a expressão de citocinas e quimiocinas, podendo participar dos processos de destruição e inflamação na artrite

reumatoide. A IL-17F se encontra elevada durante a artrite reumatoide, além de apresentar também altos níveis nas células mononucleares do sangue periférico quando comparado com pacientes controles (Sarkar *et al.*, 2014).

Os resultados do presente estudo não mostraram diferenças entre os grupos de pacientes com artrite reumatoide, síndrome de Sjogren secundária à artrite reumatoide e controles saudáveis com relação à distribuição genotípica e frequência alélica do polimorfismo da interleucina 17F (T7488C). O estudo realizado por Paradowska-Gorycka e colaboradores (2010) também não encontrou diferenças significantes nas frequências alélicas e distribuição genotípica deste mesmo polimorfismo do gene da IL-17F entre pacientes com artrite reumatoide, nem observou associação com a atividade da doença (número de articulações dolorosas e edemaciadas, DAS28, VHS, entre outros parâmetros). Da mesma forma que a IL-17A, também não existe estudos semelhantes para a IL-17F e sua relação com a síndrome de Sjogren.

Apesar dos resultados observados neste estudo estarem em consonância com o que foi publicado anteriormente, alguns aspectos devem ser considerados. Primeiramente, o efeito dos polimorfismos avaliados na susceptibilidade a AR e SS parece ser pequeno, se existente, de modo que o tamanho desta amostra pode não ter sido grande o suficiente para detectar uma possível associação. Estudos semelhantes realizados com amostras consideravelmente maiores encontraram nenhuma ou apenas uma fraca associação com a AR. Outra questão é que a avaliação de duas doenças com modelos de patogêneses associados à ativação de citocinas inflamatórias, por vezes semelhantes, pode dificultar a compreensão de uma delas quando considerada isoladamente. Apesar de ser um modelo mais complexo, torna-se um desafio interessante compreender os efeitos da associação na atividade e progressão das doenças associadas. Por fim, a população brasileira é composta de diferentes grupos étnicos devido à migração e consequente recombinação genética. Desse modo, identificar alelos que apresentam baixa frequência nessa população torna-se mais difícil.

6. CONCLUSÃO

Em conclusão, a resposta Th17 apresenta um papel importante na patogênese da AR e SSs, porém os polimorfismos pesquisados não foram relacionados com a susceptibilidade e atividade destas doenças. Estudos adicionais que avaliem os níveis sorológicos e expressão gênica das interleucinas da resposta Th17 serão interessantes para ajudar a compreensão do papel via de modulação na patogênese da AR e SS.

REFERÊNCIAS

- Aidar M, Line SRP (2007). A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. *Braz Dent J* **18**: 148-152.
- Anaya JM, Mantilla RD, Correa PA (2005). Immunogenetics of primary Sjogren's syndrome in Colombians. *Semin Arthritis Rheum* **34**: 735–743.
- Arisawa T, Tahara T, Shibata T et al (2008). The influence of polymorphisms of interleukin-17A and interleukin-17F genes on the susceptibility to Ulcerative colitis. *J Clin Immunol* **28**: 44–49.
- Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA et al (1988). The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **31**: 315-324.
- Athanasiou GF, Efthathia KK, Haralampus MM (2012). Pathogenesis of Sjögren's syndrome: What we know and what we should learn. *J Autoimmun* doi:10.1016/j.jaut.2012.01.002.
- Bedell SE, Bush BT (1985). Erythrocyte sedimentation rate: from folklore to facts. *Am J Med* **78**: 1001-1007.
- Bijsterveld OPV (1969). Diagnostic tests in the sicca syndrome. *Arch Ophthalmol* **82**: 10-14.
- Chen B, Zeng Z, Hou J et al (2009). Association of interleukin-17F 7488 single nucleotide polymorphism and inflammatory bowel disease in the Chinese population. *Scand J Gastroenterol* **44**: 720-726.
- Chiara B, Rosaria T, Athanasiou GF et al (2012). Classification criteria for Sjögren's syndrome: A critical review. *J Autoimmun* **39**: 9-14.
- Chi W, Zhu X, Yang P et al (2008). Upregulated IL-23 and IL-17 in Behcet patients with active uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **49**: 3058-3064.
- Daniels TE, Cox D, Shibuski CH et al (2011). Associations between salivary gland histopathologic diagnoses and phenotypic features of Sjögren's Syndrome among 1,726 registry participants. *Arthritis Rheum* **63**: 2021-30.
- Deák M, Szvetnik A, Balog A et al (2013). Neuroimmune interactions in Sjögren's syndrome: Relationship of exocrine gland dysfunction with autoantibodies to muscarinic acetylcholine receptor-3 and mental health status parameters. *Neuroimmunom* **20**: 79–86.
- Delaleu N, Jonsson MV, Appel S et al (2008). New concepts in the pathogenesis of Sjögren's syndrome. *Rheum Dis Clin N Am* **34**: 833-845.

- Dorner T, Lipsky PE (2002). Abnormalities of B cell phenotype, immunoglobulin gene expression and the emergence of autoimmunity in Sjogren's syndrome. *Arthritis Res* **4**:360–371.
- Espinoza JL, Takami A, Nakata K et al (2011). A genetic variant in the IL-17 promoter is functionally associated with acute graft-versus host disease after unrelated bone marrow transplantation. *PloS ONE* **6**: 1-8.
- Fransen J, Creemers MCW, Van Riel PLCM (2004). Remission in rheumatoid arthritis: agreement of the disease activity score (DAS28) with the ARA preliminary remission criteria. *Rheumatol* **43**: 1252-1255.
- Furuya T, Hakoda M, Ichikawa N et al. (2007). Associations between HLA-DRB1, RANK, RANKL, OPG, and IL-17 genotypes and disease severity phenotypes in Japanese patients with early rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* **26**: 2137–2141.
- Hamza N, Nicollaas A, Bos C et al (2012). B-cell populations and sub-populations in Sjogren's syndrome. *Press Med* **41**: 471-483.
- Hernández-Molina G, Leal-Alegre G, Michel-Peregrina M (2011). The meaning of anti-Ro and anti-La antibodies in primary Sjogren's syndrome. *Autoimmun Rev* **10**: 123-125.
- Hulkonen J, Pertovaara M, Anttonen J et al (2001). Genetic association between interleukin-10 promoter region polymorphisms and primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* **44**: 176–179.
- Hymowitz SG, Filvaroff EH, Yin J et al (2001). IL-17s adopt a cysteine knot fold: structure and activity of a novel cytokine, IL-17F, and implications for receptor binding. *EMBO J* **20**: 5332–5341.
- Ice JA, Li H, Adrianto I et al (2012). Genetics of Sjogren's syndrome in the genome-wide association era. *J Autoimmun* **39**: 57-63.
- Jonsson R, Vogelsan P, Volchenkov R et al (2011). The complexity of Sjogren's syndrome: Novel aspects on pathogenesis. *Immun Let* **141**: 1-9.
- Katsifis GE, Rekka S, Moutsopoulos NM et al (2009). Systemic and local interleukin-17 and linked cytokines associated with Sjogren's syndrome immunopathogenesis. *Am J Pathol* **3**: 1167-1177.
- Liu XK, Lin X, Gaffen SL (2004). Crucial role for nuclear factor of activated T cells in T cell receptor-mediated regulation of human interleukin-17. *J Biol Chem* **10**: 52762–52771.
- Mavragani CP, Moutsopoulos HM (2007). Conventional therapy of Sjogren's syndrome. *Crit Rev Allerg Immunol* **32**: 284–291.

Mavragani CP, Moutsopoulos HM (2010). The geoepidemiology of Sjogren's syndrome. *J Autoimmun* **9**: 305-310.

Mitsias DI, Tzioufas AG, Veiopoulou C et al (2002). The Th1/Th2 cytokine balance changes with the progress of the immunopathological lesion of Sjogren's syndrome. *Clin Exp Immunol* **128**: 562–568.

Naazesh M, Christensen C, Brightman V (1992). Clinical criteria for the diagnosis of salivary gland hypofunction. *J Dent Res* **71**:1363-1369.

Nguyem CQ, Hu MH, Li Y et al (2008). Salivary gland tissue expression of interleukin-23 and interleukin-17 in Sjogren's syndrome. *Arth & Rheum* **58**: 734-743.

Nordang GBN, Viken MK, Hollis-Moffatt JE et al (2009). Association analysis of the interleukin 17A gene in Caucasian rheumatoid arthritis patients from Norway and New Zealand. *Rheum* **48**: 367-370.

Paradowska-Gorycka A, Wojtecka-Lukasik E, Trefler J et al (2010). Association between IL-17F gene polymorphisms and susceptibility to and severity of rheumatoid arthritis (RA). *Scan J Immun* **72**: 134–141.

Pereira DL, Vilela VS, dos Santos TCRB et al (2013). Clinical and laboratorial profile and histological features on minor salivary glands from patients under investigation for Sjögren's syndrome. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* doi:10.4317/medoral.19486

Ramos-Casals M, Muñoz S, Zerón PB (2008). Hepatitis C virus and Sjogren's syndrome: Trigger or mimic? *Rheum Dis Clin N Am* **34**: 869-884.

Ramsey CD, Lazarus R, Camargo Jr CA et al (2005). Polymorphisms in the interleukin 17F gene (IL17F) and asthma. *Gen Immun* **6**: 236–241.

Reksten TR, Jonsson MV, Szyszko EA et al (2009). Cytokine and autoantibody profiling related to histopathological features in primary Sjogren's syndrome. *Rheum* **48**: 1102-1106.

Roescher N, Tak PP, Illei GG (2010). Cytokines in Sjogren's syndrome: potential therapeutic targets. *Ann Rheum Dis* **69**: 945-948.

Rozman B, Novljan MP, Hocevar A et al (2004). Epidemiology and diagnostics of primary Sjogren's syndrome. *Reumatizam* **51**: 9-12.

Sakai A, Sugawara Y, Kuroishi T et al (2008). Identification of IL-18 and Th17 cells in salivary glands of patients with Sjogren's syndrome, and amplification of

IL-17-mediated secretion of inflammatory cytokines from salivary gland cells by IL-18. *J Immunol* **181**: 2898-2906.

Sarkar S, Justa S, Brucks M et al (2014). IL-17A, F and AF in inflammation: a study in collagen induced arthritis and rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* doi: 10.1111/cei.12376.

Sato K, Suematsu A, Okamoto K et al (2006). Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med* **203**: 2673–2682.

Seiderer J, Elben I, Diegelmann J et al (2008). Role of the novel Th17 cytokine IL-17F in inflammatory bowel disease (IBD): upregulated colonic IL-17F expression in active Crohn's disease and analysis of the IL17F p.His161Arg polymorphism in IBD. *Inflamm B Dis* **14**: 437–445.

Shibata T, Tahara T, Hirata I et al (2009). Genetic polymorphism of Interleukin-17A and -17F genes in gastric carcinogenesis. *H Immun* **70**: 547–551.

Souza TR, Carvalho ATT, Duarte AP et al (*in press*). Th1 and th2 polymorphisms in Sjogren's syndrome and rheumatoid arthritis. *J Oral Pathol Med* doi: 10.1111/jop.12149.

Stewart CM, Bhattacharyya I, Berg K et al (2008). Labial salivary gland biopsies in Sjogren's syndrome: still the gold standard? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **16**: 392-402.

Tavoni AG, Baldini C, Bencivelli W et al (2012). Minor salivary gland biopsy and Sjogren's syndrome: comparative analysis of biopsies among different Italian rheumatologic centers. *Clin Exp Rheumatol* **30**: 929-933.

Tomsic M, Logar M, Grmek T et al (1999). Prevalence of Sjogren's syndrome in Slovenia. *Rheumat* **38**: 164-170.

Tzioufas AG, Tatouli IP, Moutsopoulos HM (2012). Autoantibodies in Sjogren's syndrome: Clinical presentation and regulatory mechanisms. *Press Med* **41**: 451-460.

Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R et al (2002). Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis* **61**: 554-558.

Wang L, Jiang Y, Zhang Y et al (2012). Association analysis of IL-17A and IL-17F polymorphisms in Chinese han women with breast cancer. *PLoS ONE* **7**: 1-9.

Yamada H, Nakashima Y, Okazaki K *et al* (2007). Th1 but not Th17 cells predominate in the joints of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **67**: 1299–1304.

Youinou P, Pers JO (2011). Disturbance of cytokine networks in Sjogren's syndrome. *Arthritis Res Ther* **13**: 227-234.

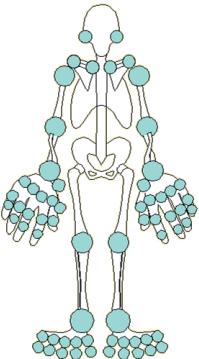
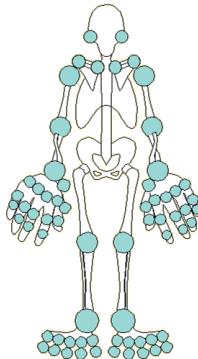
Zandbelt MM, van den Hoogen FHJ, de Wilde PC *et al* (2001). Reversibility of histological and immunohistological abnormalities in sublabial salivary gland biopsy specimens following treatment with corticosteroids in Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis* **60**: 511-513.

APÊNDICES

QUESTIONÁRIO DA PESQUISA

“Caracterização do polimorfismo genético da resposta Th17 e IL-23 na
Síndrome de Sjögren secundária a artrite reumatoide”

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

	Dolorosas		Edemaciadas																																					
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr style="background-color: #cccccc;"> <th style="padding: 5px;">Exames</th> <th style="padding: 5px;">Resultado</th> <th style="padding: 5px;">Data</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>VHS (1h)</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>PCR</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Fator reumatóide (método)</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>FAN</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Anti-CCP</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Anti-Ro</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Anti-La</td><td></td><td></td></tr> <tr><td> </td><td></td><td></td></tr> </tbody> </table>				Exames	Resultado	Data	VHS (1h)			PCR			Fator reumatóide (método)			FAN			Anti-CCP			Anti-Ro			Anti-La															
Exames	Resultado	Data																																						
VHS (1h)																																								
PCR																																								
Fator reumatóide (método)																																								
FAN																																								
Anti-CCP																																								
Anti-Ro																																								
Anti-La																																								
Tratamento																																								
AINH Drogas:	Dose:	Início:	Tempo:																																					
Prednisona	dose	Data de início	Tempo:																																					
Cloroquina	dose	Data de início	Tempo:																																					
Hidroxicloroquina	dose	Data de início	Tempo:																																					
Metotrexate	dose	Data de início	Tempo:																																					
Leflunomida	dose	Data de início	Tempo:																																					
Sulfassalazina	dose	Data de início	Tempo:																																					
Anti-TNF início:	Droga:	Dose:	Tempo:																																					
Vitamina D	dose:	Data de início:	Tempo:																																					
Carbonato de cálcio	dose:	Data de início:	Tempo:																																					
Bifosfonato	dose:	Data de início:	Tempo:																																					
Outros:																																								
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr style="background-color: #cccccc;"> <th style="padding: 5px;">Comorbidades</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td style="padding: 5px;">HAS</td><td style="padding: 5px;">1. Sim</td><td style="padding: 5px;">2. Não</td></tr> <tr><td style="padding: 5px;">Diabetes mellitus</td><td style="padding: 5px;">1. Sim</td><td style="padding: 5px;">2. Não</td></tr> <tr><td style="padding: 5px;">Osteopenia</td><td style="padding: 5px;">1. Sim</td><td style="padding: 5px;">2. Não</td></tr> <tr><td style="padding: 5px;">Osteoporose</td><td style="padding: 5px;">1. Sim</td><td style="padding: 5px;">2. Não</td></tr> <tr><td style="padding: 5px;">Hipotireoidismo</td><td style="padding: 5px;">1. Sim</td><td style="padding: 5px;">2. Não</td></tr> <tr><td style="padding: 5px;">Dislipidemia</td><td style="padding: 5px;">1. Sim</td><td style="padding: 5px;">2. Não</td></tr> <tr><td style="padding: 5px;">Cardiopatia</td><td style="padding: 5px;">1. Sim</td><td style="padding: 5px;">2. Não</td></tr> <tr><td style="padding: 5px;">Depressão</td><td style="padding: 5px;">1. Sim</td><td style="padding: 5px;">2. Não</td></tr> <tr><td style="padding: 5px;">Lúpus</td><td style="padding: 5px;">1. Sim</td><td style="padding: 5px;">2. Não</td></tr> <tr><td style="padding: 5px;">Síndrome de Sjogren</td><td style="padding: 5px;">1. Sim</td><td style="padding: 5px;">2. Não</td></tr> <tr><td style="padding: 5px;">Osteoartrose</td><td style="padding: 5px;">1. Sim</td><td style="padding: 5px;">2. Não</td></tr> <tr><td style="padding: 5px;">Outras:</td><td style="padding: 5px;"> </td><td style="padding: 5px;"> </td></tr> </tbody> </table>				Comorbidades	HAS	1. Sim	2. Não	Diabetes mellitus	1. Sim	2. Não	Osteopenia	1. Sim	2. Não	Osteoporose	1. Sim	2. Não	Hipotireoidismo	1. Sim	2. Não	Dislipidemia	1. Sim	2. Não	Cardiopatia	1. Sim	2. Não	Depressão	1. Sim	2. Não	Lúpus	1. Sim	2. Não	Síndrome de Sjogren	1. Sim	2. Não	Osteoartrose	1. Sim	2. Não	Outras:		
Comorbidades																																								
HAS	1. Sim	2. Não																																						
Diabetes mellitus	1. Sim	2. Não																																						
Osteopenia	1. Sim	2. Não																																						
Osteoporose	1. Sim	2. Não																																						
Hipotireoidismo	1. Sim	2. Não																																						
Dislipidemia	1. Sim	2. Não																																						
Cardiopatia	1. Sim	2. Não																																						
Depressão	1. Sim	2. Não																																						
Lúpus	1. Sim	2. Não																																						
Síndrome de Sjogren	1. Sim	2. Não																																						
Osteoartrose	1. Sim	2. Não																																						
Outras:																																								

Medicamentos em uso:		
DADOS DA DOENÇA DE BASE (AR)		
1 Rigidez matinal pelo menos 1 hora		1. Sim 2. Não
2 Artrite de 3 ou mais áreas		1. Sim 2. Não
3 Artrite de articulações das mãos		1. Sim 2. Não
4 Artrite simétrica		1. Sim 2. Não
5 Nódulos subcutâneos		1. Sim 2. Não
6 Fator reumatóide positivo		1. Sim 2. Não
7 Alterações radiológicas típicas		1. Sim 2. Não
VASm:		VASp:
DAS 28:		HAQ:
Cárie:		
Exame Oral	Lesão: 1. Sim 2 –Não	Cárie:
Candidose: 1. Sim 2 –Não	Língua despapilada: 1. Sim 2 –Não	
Questionário de xerostomia		
1. Sinto minha boca seca <input type="checkbox"/> Nunca <input type="checkbox"/> Quase nunca <input type="checkbox"/> ocasionalmente <input type="checkbox"/> quase sempre <input type="checkbox"/> sempre		
2. Tenho dificuldade em comer alimentos secos <input type="checkbox"/> Nunca <input type="checkbox"/> Quase nunca <input type="checkbox"/> ocasionalmente <input type="checkbox"/> quase sempre <input type="checkbox"/> sempre		
3. Acordo a noite para beber água <input type="checkbox"/> Nunca <input type="checkbox"/> Quase nunca <input type="checkbox"/> ocasionalmente <input type="checkbox"/> quase sempre <input type="checkbox"/> sempre		
4. Minha boca fica seca durante a alimentação <input type="checkbox"/> Nunca <input type="checkbox"/> Quase nunca <input type="checkbox"/> ocasionalmente <input type="checkbox"/> quase sempre <input type="checkbox"/> sempre		
5. Eu molho a boca para facilitar a deglutição <input type="checkbox"/> Nunca <input type="checkbox"/> Quase nunca <input type="checkbox"/> ocasionalmente <input type="checkbox"/> quase sempre <input type="checkbox"/> sempre		
6. Eu como balas e chicletes doces para aliviar a secura da boca <input type="checkbox"/> Nunca <input type="checkbox"/> Quase nunca <input type="checkbox"/> ocasionalmente <input type="checkbox"/> quase sempre <input type="checkbox"/> sempre		
7. Tenho dificuldade em deglutir algumas comidas <input type="checkbox"/> Nunca <input type="checkbox"/> Quase nunca <input type="checkbox"/> ocasionalmente <input type="checkbox"/> quase sempre <input type="checkbox"/> sempre		
8. A pele do meu rosto é ressecada <input type="checkbox"/> Nunca <input type="checkbox"/> Quase nunca <input type="checkbox"/> ocasionalmente <input type="checkbox"/> quase sempre <input type="checkbox"/> sempre		
9. Sinto meus olhos secos <input type="checkbox"/> Nunca <input type="checkbox"/> Quase nunca <input type="checkbox"/> ocasionalmente <input type="checkbox"/> quase sempre <input type="checkbox"/> sempre		
10. Sinto meus lábios secos <input type="checkbox"/> Nunca <input type="checkbox"/> Quase nunca <input type="checkbox"/> ocasionalmente <input type="checkbox"/> quase sempre <input type="checkbox"/> sempre		
11. A parte interna do meu nariz é ressecada <input type="checkbox"/> Nunca <input type="checkbox"/> Quase nunca <input type="checkbox"/> ocasionalmente <input type="checkbox"/> quase sempre <input type="checkbox"/> sempre		
Sintomas oculares		
Sensação de corpo estranho:		sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
Ardência ou queimação:		sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
Sensação de olho seco:		sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
Fotofobia (problema de claridade):		sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
Cansaço visual quando lê ou vê televisão:		sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>

Cansaço visual quando lê ou vê televisão:	sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
Sensação que a acuidade visual varia (flutua):	sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
Produção excessiva de muco:	sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
Sensação de arranhão quando pisca os olhos	sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
Piora com: ar-condicionado: vento: fumaça de cigarro:	sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO – SÍNDROME DE SJOGREN	
1. Sintomas oculares	sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
Você tem desconforto olhos secos de modo diário e persistente nos últimos 3 meses?	sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
Você tem sensação recorrente de areia nos olhos?	sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
Você utiliza substitutos lacrimais mais de 3 vezes por dia?	sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
2. Sintomas orais:	sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
Você tem sensação de boca seca diariamente há mais de três meses?	sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
Você teve aumento recorrente ou persistente de glândulas salivares na fase adulta?	sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
Você sente necessidade de ingerir líquidos para auxiliar a deglutição de alimentos secos?	sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
3. Sinais oculares:	Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/>
Teste de Schimer: OD- _____ mm/5min (<5mm em 5 minutos)	
OE- _____ mm/5min (<5mm em 5 minutos)	
4. Histopatologia:	Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/>
Número de focos: _____	
5. Envolvimento de glândula salivar	Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/>
Fluxo salivar não estimulado: _____ ml/min (<0.5 ml em 5 min)	
6. Auto-anticorpos:	Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/>
Anti SSA:	sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
Anti SSB:	sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
	Resultado: _____
	Resultado: _____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Termo De Consentimento Livre e Esclarecido – Grupos de Estudo

O Sr. (a) está sendo convidado (a) a participar da pesquisa intitulada “Caracterização do polimorfismo genético da resposta Th17 e IL-23 na Síndrome de Sjögren secundária a artrite reumatoide” que será realizado por Camila Nunes Carvalho, mestrandra do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UFPE, o qual também recolherá o seu consentimento, realizará um questionário e colherá os dados necessários para a realização da pesquisa. Este trabalho está sob a coordenação do professor Prof. Dr. Luiz Alcino Monteiro Gueiros.

Justificativa e objetivos: Através desse estudo e de estudos futuros decorrentes deste, poderemos compreender melhor os mecanismos patológicos associados ao desenvolvimento da Síndrome de Sjögren secundária (SSs) a Artrite Reumatóide. Este estudo visa avaliar a resposta de uma célula responsável pela defesa mais específica, chamada de Th17, em pacientes com SS secundária a AR. **Informações: Procedimentos:** Será realizado um **questionário** para obtenção dos relativos ao seu nome, endereço e história clínica da doença. O Sr. (a) passará por um **exame clínico** da boca para determinar o fluxo salivar em repouso por meio de um exame simples e não invasivo. Caso haja diminuição significativa da quantidade de saliva ou queixa de boca seca procederemos uma remoção de glândulas salivares menores do lábio inferior por meio de uma pequena cirurgia (**biópsia**) com o objetivo diagnóstico. O Sr. (a) passará por anestesia local, incisão com lâmina de bisturi, remoção de 5 a 6 glândulas salivares menores e sutura da região. O Sr.(a) receberá informações e orientações pós-operatórias e receberá uma prescrição de analgésicos em caso de desconforto relativos ao procedimento cirúrgico. Será coletada uma **amostra de saliva**, na qual, o Sr.(a) deverá expelir toda a saliva por um período de 5 minutos em um recipiente plástico. Uma **amostra de sangue** será coletada com um tubo de coleta com agulha estéril. Esta pesquisa não é um ensaio clínico, portanto, não há grupo placebo. Não há métodos alternativos existentes para obtenção da informação desejada nesta pesquisa.

Desconfortos, riscos previsíveis e benefícios esperados: O paciente submetido à pesquisa poderá correr o risco de desconforto leve durante o exame clínico, reações adversas relacionados ao procedimento de biópsia, tais como: alergia ao anestésico, complicações hemorrágicas, complicações pós-operatórias, riscos de hematomas e desconfortos durante a coleta de sangue, e além da possibilidade de sofrer constrangimentos durante a anamnese ou durante o procedimento de coleta dos dados sócio-demográficos, porém o pesquisador tentará minimizá-los. Os participantes receberão tratamento médico e odontológico especializado para a doença e as condições de saúde serão avaliadas e o Sr. (a) será orientado (a) de acordo com a necessidade de tratamento individual e encaminhado para as devidas clínicas especializadas. Os dados obtidos através dessa pesquisa serão arquivados em computador pessoal do pesquisador responsável e estarão disponíveis por um prazo de até 5 anos.

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

Garantias: Garantia de esclarecimentos: Os pesquisadores esclarecerão os voluntários quanto a todos os aspectos da pesquisa, antes, durante e após a mesma. Liberdade de recusa à participação ou de retirar o seu consentimento: O Sr. (a) pode escolher não participar de nossa pesquisa, ou desistir da participação, se achar necessário, em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer penalização e sem prejuízo, inclusive do seu atendimento clínico. Sigilo: Seus dados pessoais serão mantidos em sigilo. Ressarcimento e indenização: Não há gastos previstos pela participação na pesquisa e, portanto, não há previsão de ressarcimento, com exceção dos indivíduos que serão convocados, que serão ressarcidos pelos gastos referentes ao seu deslocamento. Não há riscos previsíveis pela participação na pesquisa e, portanto, não há previsão de indenização. Você receberá uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Para contato com os pesquisadores: Msd. Camila Nunes Carvalho e Prof. Luiz Alcino Gueiros, Rua Engenheiro Vasconcelos Bittencourt, 149, apt. 205, Várzea, Recife-PE, Fone: 81 9950-3786. E-mail: nunes.carvalho.camila@hotmail.com / Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife-PE, Fones: 81 2126-8817. Email: lagueiros@ufpe.br. Em caso de dúvidas quanto aos seus direitos como voluntário de pesquisa entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do CCS-UFPE (Avenida das Engenharias, s/n, 1º andar, Cidade Universitária, Recife. Fone: 81- 2126-8588). Eu, _____, RG/CPF/_____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo “Caracterização do polimorfismo genético da resposta Th17 e IL-23 na Síndrome de Sjögren secundária a artrite reumatoide”, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido(a) pelo(a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento.

Recife, ____ de _____. _____.

Assinatura do Paciente

Assinatura do Pesquisador

Assinatura da Testemunha

Assinatura da Testemunha

ANEXOS

PARECER CONSUBSTANIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

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



PARECER CONSUBSTANIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CARACTERIZAÇÃO DO POLIMORFISMO GENÉTICO DA RESPOSTA Th17 E IL-23 NA SÍNDROME DE SJÖGREN SECUNDÁRIA A ARTRITE REUMATÓIDE

Pesquisador: Camila Nunes Carvalho

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 10221112.3.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 211.299

Data da Relatoria: 04/03/2013

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto para dissertação de mestrado do Programa de Pós-graduação em Odontologia, com área de concentração em Clínica Integrada que buscará investigar o padrão de resposta das células Th17 em portadores de Síndrome de Sjögren secundária (SSs) a artrite reumatoide.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral:

Analisar o padrão da resposta Th17 em pacientes portadores de Síndrome de Sjögren secundária a artrite reumatoide.

Objetivos Específicos:

- 1-Avaliar a presença e distribuição dos polimorfismos dos genes IL-17A, IL-17F e IL-23 e sua relação com a presença SSs;
- 2-Avaliar a relação entre frequência alélica dos genes e a presença da Síndrome de Sjögren;
- 3-Avaliar o nível de IL-17A, IL-17F e IL-23 no soro, correlacionando-o os respectivos genótipos;
- 4-Correlacionar os genótipos e níveis sorológicos das citocinas IL-17A, IL-17F e IL-23 com a apresentação clínica da AR e da SSs.

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

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



Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O pesquisador descreve os riscos decorrentes da pesquisa com detalhes, e assegurar os benefícios diretos aos sujeitos que participarão da pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O presente estudo será epidemiológico e observacional, composto por 320 indivíduos de ambos os sexos com idade maior que 18 anos e distribuídos em 3 grupos. O grupo AR será composto por 160 pacientes portadores de artrite reumatoide, divididos em AR sem SS (grupo AR1, n=120) e o grupo AR + SS (grupo SS, n=40) e o grupo C composto por 160 indivíduos saudáveis. Todos os pacientes do grupo AR e SS serão provenientes do Serviço de Reumatologia do Hospital das Cínicas da UFPE (HC-UFPE), e serão submetidos a coleta de saliva, Teste de Shrimer (para quantificação de lágrima), coleta de 5ml de sangue periférico e biópsia de glândula salivar menor para confirmação de diagnóstico de Síndrome de Sjogren. O grupo controle será composto por indivíduos saudáveis pareados para sexo e idade (\pm 5 anos) com os pacientes, e provenientes do Serviço de Estomatologia da UFPE, estes serão submetidos a exame clínico, coleta de saliva, Teste de Schirmer (para quantificação de lágrima), e coleta de 5ml de sangue periférico no Serviço de Estomatologia da UFPE. O material biológico coletado será processado no laboratório de biologia molecular do Serviço de estomatologia da UFPE.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O Pesquisador Responsável obedecendo a resolução Nº 196/96, anexou:

- 1-A Carta de Anuênciā do Laboratório de Biologia Molecular do Serviço de Estomatologia, local onde acontecerá o processamento do material biológico;
- 2- A carta de anuênciā do Serviço de Reumatologia do HC/UFPE autorizando o acesso no regrutamento dos pacientes;
- 3- A declaração de responsabilidade sobre o sigilo e guarda dos dados coletados;
- 4- O TCLE, que está bem redigido e deixa claro todos os riscos e benefícios dos sujeitos;
- 5- A Carta de anuênciā do Serviço de Estomatologia onde serão recrutados os indivíduos saudáveis e serão recebido os pacientes para tratamento odontológico;
- 6- Seu cronograma e orçamento estão adequados para a proposta;
- 7- Os currículos do pesquisador e orientador estão anexados; e
- 8- A folha de rosto encontra-se adequadamente preenchida.

Recomendações:

Sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto preenche os critérios necessários para a sua aprovação.

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

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.740-600

UF: PE

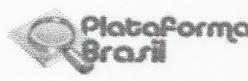
Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

Fax: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br

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



Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado aprova o parecer do protocolo em questão e o pesquisador está autorizado para iniciar a coleta de dados.

Projeto foi avaliado e sua APROVAÇÃO definitiva será dada, após a entrega do relatório final, através da PLATAFORMA BRASIL ou por meio de ofício impresso emitido pelo Comitê de Ética em Pesquisa/UFPE.

Assinatura do Parecer:

RECIFE, 05 de Março de 2013

Assinador por:
GERALDO BOSCO LINDOSO COUTO
(Coordenador)

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

NORMAS DA REVISTA (ORAL DISEASES)

1. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

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

1.2. Format

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

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

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

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

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

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

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

- A title of no more than 100 characters including spaces
- A running title of no more than 50 characters
- 3-6 keywords

- Complete names and institutions for each author
- Corresponding author's name, address, email address and fax number
- Date of submission (and revision/resubmission)

Abstract: is limited to 200 words in length and should contain no abbreviations. The abstract should be included in the manuscript document uploaded for review as well as separately where specified in the submission process. The abstract should convey the essential purpose and message of the paper in an abbreviated form set out under:

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

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

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

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

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

(ii) Experimental subjects: As noted above, experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association Declaration of Helsinki (version 2002) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. Editors reserve the right to reject papers if there are doubts as to

whether appropriate procedures have been used. When experimental animals are used the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort. Experiments should be carried out in accordance with the Guidelines laid down by the National Institute of Health (NIH) in the USA regarding the care and use of animals for experimental procedures or with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in accordance with local laws and regulations.

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

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

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

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

1.4. References

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

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

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

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

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

(i) for journal references:

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

(ii) for book references:

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

c) Authors' names should be arranged thus:

Smith AB and Jones DE

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

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

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

Examples:

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

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

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

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

1.5. Tables, Figures and Figure Legends

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

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

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

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

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

2. AFTER ACCEPTANCE

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

Proof Corrections

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

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

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

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

Early View (Publication Prior to Print)

Oral Diseases is covered by Wiley-Blackwell's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Early View articles are complete and final. They

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

Author Services

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