



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

EUDES GUSTAVO CONSTANTINO CUNHA

**ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS, NÍVEIS SÉRICOS E PARÂMETROS
CLÍNICO-LABORATORIAIS DA GALECTINA-3 EM PACIENTES COM
ESCLEROSE SISTÊMICA**

Recife
2018

EUDES GUSTAVO CONSTANTINO CUNHA

**ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS, NÍVEIS SÉRICOS E PARÂMETROS
CLÍNICO-LABORATORIAIS DA GALECTINA-3 EM PACIENTES COM
ESCLEROSE SISTÊMICA**

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

Área de Concentração: Desenvolvimento pré-clínico de produtos bioativos

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

Coorientadores: Prof^o. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo

Prof^a. Dr^a. Andréa Tavares Dantas

Recife
2018

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Cunha, Eudes Gustavo Constantino

Associação de polimorfismos, níveis séricos e parâmetros clínico-laboratoriais da galectina-3 em pacientes com esclerose sistêmica / Eudes Gustavo Constantino Cunha - 2018.

122 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Maira Galdino da Rocha Pitta

Coorientadores: Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo

Andréa Tavares Dantas

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica. Recife, 2018.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Autoimunidade 2. Vasculopatia 3. Fibrose

I. Pitta, Maria Galdino da Rocha (orient.) II. Rêgo, Moacyr Jesus Barreto de melo (coorient.) III. Dantas, Andréa Tavares (coorient.) IV. Título

616.544

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-174

EUDES GUSTAVO CONSTANTINO CUNHA

**Associação de polimorfismos, níveis séricos e parâmetros clínico-laboratoriais
da galectina-3 em pacientes com esclerose sistêmica**

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

Aprovada em: 28/05/2018.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof^a. Dr^a. Maria Danielly Lima de Oliveira (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro (Examinadora externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra (Examinador externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Aos meus pais, irmão e amigos dedico com toda gratidão.

O coração do homem planeja o seu caminho, mas o Senhor lhe dirige os passos (BÍBLIA, Provérbios 16:9).

RESUMO

A esclerose sistêmica (ES) é uma doença autoimune complexa caracterizada pela vasculopatia, desregulação imunológica e fibrose. Altos índices de morbidade e mortalidade estão associados à ES, principalmente devido ao acometimento fibrótico de pele e órgãos internos. A etiopatogênese da ES não é bem elucidada, porém acredita-se que fatores ambientais ligados à carga genética possam desencadear a doença. A galectina-3 é a única lectina do tipo químera pertencente ao grupo das galectinas, que pesa cerca de 30kDa e possui afinidade por ligantes β -galactosídeos. Codificada pelo gene *LGALS3*, a Gal-3 possui atividade conhecida em processos biológicos fundamentais, na auto-tolerância, inflamação e fibrose. Devido às funções pró-fibróticas da Gal-3, este trabalho buscou avaliar a possível associação de polimorfismos no gene *LGALS3* com níveis séricos de Gal-3 e manifestações clínicas em pacientes com ES. Um estudo caso-controle foi realizado com 88 pacientes e 151 controles pareados por sexo e idade. O DNA genômico foi extraído de sangue total pela técnica do fenol-clorofórmio e então os polimorfismos de base única (SNP) *LGALS3* rs4652 (+292) A>C, rs1009977 G>T e o rs2075601 C>T foram analisados por PCR em tempo real, utilizando sondas alelo específicas Taqman[®]. As amostras de soro foram dosadas por ELISA sanduíche. Os valores estatísticos foram significantes quando $p < 0,05$. Os resultados obtidos revelam que o *LGALS3* rs4652 não está associado com a doença. Entretanto, as frequências alélicas e genótípicas dos SNPs intrônicos *LGALS3* rs1009977 e rs2075601 revelaram que os genótipos heterozigotos rs1009977 (G/T) [OR= 0,27 (0,10-0,73) IC 95%; $p=0,0047$] e rs2075601 (C/T) [OR= 0,30 (0,13-0,66) IC 95%; $p=0,001$], assim como o modelo dominante de ambos *LGALS3* rs1009977 (G/T + T/T) [OR= 0,37(0,14-0,98) IC 95%; $p=0,0307$] e *LGALS3* rs2075601 (C/T + T/T) [OR=0,33 (0,14-0,74) IC 95%; $p=0,004$] podem estar associados com proteção à doença. Os níveis da Gal-3 estavam alterados em relação ao genótipo polimórfico (C/C) do *LGALS3* rs4652 em pacientes ($p=0,0382$) e controles ($p=0,0051$). Adicionalmente, o modelo dominante (A/C + C/C) do *LGALS3* rs4652 também apresentou menores níveis séricos da Gal-3 em controles ($p=0,0174$). Assim, foi observado que o genótipo polimórfico (C/C) do *LGALS3* rs4652 pode causar uma diminuição dos níveis de Gal-3 na população geral do estudo, embora nenhuma correlação direta com a doença foi encontrada. Paralelamente, o *LGALS3* rs1009977 apresentou um

aumento da Gal-3 no modelo dominante em relação ao genótipo selvagem, porém essa variação foi observada apenas no grupo controle ($p=0,0115$). O *LGALS3* rs2075601 não mostrou variações estatisticamente significantes na comparação com os níveis da Gal-3. Os níveis de Gal-3 sérica não diferiram entre pacientes e controles, bem como associações da Gal-3 com manifestações clínicas da doença não foram encontradas. Contudo, observou-se que os pacientes que faziam uso de glicocorticoides apresentaram maiores níveis de Gal-3 do que os que não se submeteram a esse tratamento. Nosso estudo foi importante para a avaliação genética e sérica da Gal-3 em pacientes com ES, contudo novos estudos são necessários para melhor elucidar os mecanismos envolvidos na relação dos polimorfismos do *LGALS3* com a ES.

Palavras-chave: Autoimunidade. Vasculopatia. Fibrose. Gal-3. SNP.

ABSTRACT

Systemic sclerosis (SSc) is a complex autoimmune disease characterized by vasculopathy, immune dysregulation and fibrosis. High morbidity and mortality rates are associated with SSc, mainly due to fibrotic involvement of skin and internal organs. The etiopathogenesis of SSc is not well elucidated, but it is believed that environmental factors linked to genetic burden can trigger the disease. Galectin-3 is the only chimeric-like belonging to the galectin group, which weighs about 30 kDa and has affinity for β -galactosides binders. Encoded by the *LGALS3* gene, Gal-3 has known activity in fundamental biological processes, in self-tolerance, inflammation and fibrosis. Due to the pro-fibrotic functions of Gal-3, this work aimed to evaluate the possible association of polymorphisms in the *LGALS3* gene with serum levels of Gal-3 and clinical manifestations in SSc patients. A case-control study was performed with 88 patients and 151 matched controls by sex and age. Genomic DNA was extracted from whole blood by the phenol-chloroform technique and then the single-base polymorphisms (SNP) *LGALS3* rs4652 (+292) A>C, rs1009977 G>T and rs2075601 C>T were analyzed by real time-PCR, using Taqman® specific allele probes. Serum samples were dosed by sandwich ELISA assay. Statistical values were significant when $p < 0.05$. The results obtained reveal that *LGALS3* rs4652 is not associated with the disease. However, the allelic and genotypic frequencies of *LGALS3* intronic SNPs rs1009977 and rs2075601 revealed that heterozygous genotypes rs1009977 (G/T) [OR = 0.27 (0.10 - 0.73) 95% CI; $p = 0.0047$] and rs2075601 (C/T) [OR = 0.30 (0.13 - 0.66) 95% CI; $p = 0.001$], as well as the dominant model of both *LGALS3* rs1009977 (G/T + T/T) [OR = 0.37 (0.14 - 0.98) 95% CI; $p = 0.0307$] and *LGALS3* rs2075601 (C/T + T/T) [OR = 0.33 (0.14 - 0.74) 95% CI; $p = 0.004$] may be associated with disease protection. Gal-3 levels were altered regarding the *LGALS3* rs4652 polymorphic genotype (C/C) in SSc patients ($p = 0.0382$) and controls ($p = 0.0051$). In addition, the dominant model (A/C + C/C) of *LGALS3* rs4652 also presented lower Gal-3 levels in controls ($p = 0.0174$). Thus, it was observed that the *LGALS3* rs4652 polymorphic genotype (C/C) may cause a decrease in Gal-3 levels in general population of the study, although no direct correlation with the disease was found. In parallel, *LGALS3* rs1009977 showed an increase in Gal-3 for dominant model in relation to the wild genotype, but this variation was observed only in the control group ($p = 0.0115$). *LGALS3* rs2075601

did not show statistically significant variations when compared to Gal-3 levels. Serum levels of Gal-3 did not differ between patients and controls, as well as Gal-3 associations with clinical manifestations of the disease were not found. Nevertheless, it was observed that patients taking glucocorticoids had higher levels of Gal-3 than those who did not undergo this treatment. Our study was important for genetic and serum evaluation of Gal-3 in SSc patients, however, new studies are needed to better elucidate the mechanisms involved in the relationship of the *LGALS3* polymorphisms with SSc.

Keywords: Autoimmunity. Vasculopathy. Fibrosis. Gal-3. SNP.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais manifestações clínicas da esclerose sistêmica.....	27
Figura 2 - Fatores predisponentes e mecanismos da esclerose sistêmica.....	33
Figura 3 - Estrutura esquemática das galectinas.....	39
Figura 4 - Partes do gene que codificam o domínio de reconhecimento de carboidrato (DRC) e a cauda N-terminal.....	40
Figura 5 - Estrutura esquemática da galectina-3.....	41
Figura 6 - Estrutura e rede de interação galectina-3-carboidrato.....	43
Figura 7 - Localização dos SNPs <i>LGALS3</i> rs4652, rs4644, rs1009977 e rs2075601.....	54
Figura 8 - Comparação entre o escore de Rodnan e os genótipos dos polimorfismos <i>LGALS3</i> rs4652, rs1009977 e rs2075601 em pacientes com esclerose sistêmica.....	61
Figura 9 - Comparação entre o nível sérico da galectina-3 e os genótipos do polimorfismo <i>LGALS3</i> rs4652 em pacientes com esclerose sistêmica.....	62
Figura 10 - Comparação entre o nível sérico da galectina-3 e os genótipos do polimorfismo <i>LGALS3</i> rs4652 no grupo controle.....	62
Figura 11 - Comparação entre o nível sérico da galectina-3 e os genótipos do polimorfismo <i>LGALS3</i> rs1009977 em pacientes com esclerose sistêmica.....	63
Figura 12 - Comparação entre o nível sérico da galectina-3 e os genótipos do polimorfismo <i>LGALS3</i> rs1009977 no grupo controle.....	63
Figura 13 - Comparação entre o nível sérico da galectina-3 e os genótipos do polimorfismo <i>LGALS3</i> rs2075601 em pacientes com esclerose sistêmica.....	64
Figura 14 - Comparação entre o nível sérico da galectina-3 e os genótipos do polimorfismo <i>LGALS3</i> rs2075601 no grupo controle.....	64
Figura 15 - Comparação entre o nível sérico da galectina-3 e os genótipos do polimorfismo <i>LGALS3</i> rs4652 na população.....	65
Figura 16 - Comparação entre o nível sérico da galectina-3 e os genótipos do polimorfismo <i>LGALS3</i> rs1009977 na população.....	66

Figura 17 - Comparação entre o nível sérico da galectina-3 e os genótipos do polimorfismo <i>LGALS3</i> rs2075601 na população.....	66
Figura 18 - Comparação dos níveis séricos da galectina-3 nos grupos de pacientes e controles sadios.....	67
Figura 19 - Correlação entre o tempo de doença e os níveis séricos da galectina-3 em pacientes com esclerose sistêmica.....	68
Figura 20 - Correlação entre o escore de Rodnan e os níveis séricos da galectina-3 em pacientes com esclerose sistêmica.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Critérios de classificação para a esclerose sistêmica.....	31
Tabela 2 - Polimorfismos selecionados para o estudo.....	54
Tabela 3 - Parâmetros clínicos e demográficos de pacientes com esclerose sistêmica e o grupo controle.....	58
Tabela 4 - Frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos <i>LGALS3</i> rs4652, rs4644, rs1009977 e rs2075601 em pacientes com esclerose sistêmica e no grupo controle.....	60
Tabela 5 - Comparação entre os níveis séricos da galectina-3 e as manifestações clínicas em pacientes com esclerose sistêmica.....	69
Tabela 6 - Comparação dos níveis séricos da galectina-3 frente aos medicamentos administrados aos pacientes com esclerose sistêmica.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -SMA	Actina de músculo liso-alfa, do inglês <i>alpha-smooth muscle actin</i>
ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
AIA	Artrite induzida por antígeno, do inglês <i>Artrite antigen-induced</i>
AR	Artrite reumatoide
ANA	Anticorpos antinucleares
Anti-Scl70	Anticorpo anti-DNA topoisomerase I
ARA	Anticorpo anti-RNA polimerase
ATG5	<i>Autophagy Related 5</i>
AKT	<i>Serine/Threonine Kinase 1</i>
BANK1	<i>B-cell scaffold protein with ankyrin repeats 1</i>
BCC	Bloqueador de canal de cálcio
BRA	Bloqueador do receptor de angiotensina
c-Abl	<i>C-Abl Oncogene 1, Receptor Tyrosine Kinase</i>
CBP-35	<i>Carbohydrate-binding protein 35</i>
CCN2	<i>CCN family member 2</i>
CD226	<i>Cluster of differentiation</i>
CENP-A	Proteína do centrômero A, do inglês <i>Centromere protein A</i>
CENP-B	Proteína do centrômero B, do inglês <i>Centromere protein B</i>
CENP-C	Proteína do centrômero C, do inglês <i>Centromere protein C</i>
CRE	Crise Renal Esclerodérmica
CSK	<i>C-Terminal Src Kinase</i>
CTGF	Fator de crescimento do tecido conectivo, do inglês <i>Connective tissue growth factor</i>
DL	Desequilíbrio de ligação
DNASE1L3-	<i>Deoxyribonuclease 1 Like 3-PX Domain Containing</i>
PXK	<i>Serine/Threonine Kinase Like</i>
DPI	Doença pulmonar intersticial
DRC	Domínio de reconhecimento de carboidrato
EGR1	<i>Early Growth Response 1</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
ERK1	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinase 1</i>

ERK2	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinase 2</i>
ES	Esclerose sistêmica
ESd	Esclerose sistêmica cutânea difusa
ESI	Esclerose sistêmica cutânea limitada
EULAR	<i>European League Against Rheumatism</i>
FAK1	Focal adhesion kinase 1
FOXP3	<i>Forkhead Box P3</i>
FRy	Fenômeno de Raynaud
Gal-3	Galectina 3
GC	Glicocorticoide
GWAS	Estudos de associação amplo do genoma, do inglês <i>Genome-Wide Association Study(ies)</i>
HAP	Hipertensão Arterial Pulmonar
HLA	Antígeno leucocitário humano, do inglês <i>Human leukocyte antigen</i>
HWP	Princípio de Hardy-Weinberg, do inglês <i>Hardy–Weinberg principle</i>
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1, do inglês <i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
IECA	Inibidor da Enzima Conversora de Angiotensina
IFN-γ	Interferon gama
IKZF3	<i>Ikaros family zinc finger protein 3</i>
IL	Interleucina
IL-1R	Receptor da IL-1
IL-12A	Interleucina 12A
IL-12RB1	Receptor da IL-12 subunidade beta 1, do inglês <i>Interleukin 12 Receptor Subunit Beta 1</i>
IL-23R	Receptor da IL-23
IQR	Intervalo interquartil
IRAK1	<i>Interleukin-1 receptor-associated kinase 1</i>
IRF5	Interferon regulatory factor 5
IRF8	Interferon regulatory factor 8
JNK	<i>C-Jun N-Terminal Kinases</i>
Kb	<i>Kilobyte(s)</i>
KCNA5	<i>Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily A Member 5</i>

kDa	Quilo Dalton, do inglês <i>Kilo Dalton</i>
L	Lectina
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
LGALS3	<i>Lectin, galactose binding, soluble 3</i>
MAF	Frequência do alelo menor, do inglês <i>Minor Allele Frequency</i>
MCP1	Proteína quimiotática de monócitos, do inglês <i>Monocyte chemotactic protein</i>
MCF	Metacarpofalangeanas
MEC	Matriz extracelular
MECP2	<i>Methyl-CpG-binding protein 2</i>
MHC	Complexo maior de histocompatibilidade, do inglês <i>Major histocompatibility complex</i>
mRNA	RNA mensageiro
miRNA	Micro RNA
MMP	Matriz metaloproteinase
NOTCH4	<i>Neurogenic locus notch homolog 4</i>
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas, do inglês <i>Platelet-derived growth factor</i>
PLCL2	<i>Phospholipase C Like 2</i>
PTPN22	<i>Protein Tyrosine Phosphatase, Non-receptor type 22</i>
qPCR	Reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real
SEVAG	Clorofórmio – Álcool isoamílico 24:1
Smad-1	<i>Sma- and Mad-related protein 1</i>
Smad-2	<i>Sma- and Mad-related protein 2</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SSp	Síndrome de Sjögren primária
STAT4	<i>Signal transducer and activator of transcription 4</i>
TAK1	<i>TGF-β-activated kinase</i>
TC	Tomografia computadorizada
TGF- β	Fator Transformador do Crescimento Beta, do inglês <i>Transforming Growth Factor Beta</i>
TGI	Trato gastrointestinal
Th	T auxiliar, do inglês <i>helper</i>

TKM1	Tris-HCl, KCl MgCl ₂ , EDTA
TKM2	Tris-HCl, KCl MgCl ₂ , EDTA NaCl
TNF	Fator de Necrose Tumoral, do inglês <i>Tumor necrosis factor</i>
TNFAIP3	<i>Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3</i>
TNFSF4	<i>TNF Superfamily Member 4</i>
TNIP1	<i>TNFAIP3 Interacting Protein 1</i>
Treg	T regulatório
TREH-DDX6	<i>Trehalase-DEAD-Box Helicase 6</i>
VCAM1	Molécula de adesão celular vascular 1, do inglês <i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular, do inglês <i>Vascular endothelial growth factor</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
1.1	JUSTIFICATIVA.....	21
1.2	OBJETIVOS.....	21
1.2.1	Objetivo Geral.....	21
1.2.2	Objetivos Específicos.....	22
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1	ESCLEROSE SISTÊMICA.....	23
2.1.1	Etiopatogênese.....	23
2.1.2	Manifestações clínicas.....	26
2.1.3	Autoanticorpos.....	29
2.1.4	Diagnóstico.....	30
2.1.5	Tratamento farmacológico.....	31
2.1.6	Fisiopatogenia.....	32
2.1.6.1	Vasculopatia.....	33
2.1.6.2	Desregulação imunológica.....	34
2.1.6.3	Fibrose.....	36
2.2	GALECTINA-3.....	38
2.2.1	Gal-3 em doenças inflamatórias e autoimunes.....	44
2.2.2	SNPs de Gal-3 em doenças inflamatórias e autoimunes.....	46
3	METODOLOGIA.....	48
3.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	48
3.2	POPULAÇÃO E LOCAL DO ESTUDO.....	48
3.2.1	Critérios de inclusão e exclusão dos pacientes.....	49
3.2.2	Critérios de inclusão e exclusão dos voluntários sadios.....	49
3.3	DEFINIÇÃO DAS VARIÁVEIS CLÍNICAS.....	49
3.4	COLETA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	50
3.5	QUANTIFICAÇÃO SÉRICA DE GAL-3.....	51
3.6	EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO.....	52
3.7	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE DNA DAS AMOSTRAS.....	53
3.8	SELEÇÃO DOS POLIMORFISMOS.....	53

3.9	GENOTIPAGEM POR PCR EM TEMPO REAL.....	54
3.9.1	qPCR.....	55
3.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	55
4	RESULTADOS.....	57
4.1	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	57
4.2	ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS NOS GRUPOS CASO E CONTROLE.....	59
4.3	ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMO E O ESCORE DE RODNAN.....	60
4.4	ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMO E NÍVEL SÉRICO DE GAL-3.....	61
4.5	NÍVEIS SÉRICOS DE GAL-3 E ASSOCIAÇÃO COM DADOS CLÍNICOS DE PACIENTES COM ESCLEROSE SISTÊMICA.....	67
5	DISCUSSÃO.....	71
6	CONCLUSÃO.....	77
	REFERÊNCIAS.....	78
	APÊNDICE A – ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA HUMAN IMMUNOLOGY.....	88
	APÊNDICE B – TCLE PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS.....	103
	APÊNDICE C – TCLE PARA ADULTOS IMPOSSIBILITADOS DE ASSINAR.....	106
	ANEXO A - FICHA CLÍNICA.....	109
	ANEXO B – PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP.....	112

1 INTRODUÇÃO

A esclerose sistêmica (ES) é uma doença heterogênea complexa de caráter autoimune, que atinge o tecido conjuntivo com quadro de vasculopatia, desregulação imunológica e fibrose tecidual. De acordo com a extensão da lesão de pele, a doença pode ser classificada nos fenótipos difuso ou limitado (GABRIELLI; AVVEDIMENTO; KRIEG, 2009; ALLANORE, 2015). Com baixos índices de incidência e prevalência, exibindo variações na epidemiologia a depender da localização geográfica, a ES é considerada uma doença rara a qual acomete mais mulheres do que homens na proporção de 7:1 numa faixa de idade que varia de 30 a 50 anos (GU et al., 2008; RANQUE; MOUTHON, 2010; ZIMMERMANN; PIZZICHINI, 2013; ELHAI et al., 2014).

A patogênese da ES ainda não está bem elucidada, contudo estudos apontam vários agentes etiológicos potencialmente capazes de causar a doença, além da carga genética do indivíduo (ALLANORE, 2015; DENTON; KHANNA, 2017). Os fatores ambientais mais apontados como gatilhos para a ES são: sílica, amianto, solventes orgânicos e vírus (ZIMMERMANN; PIZZICHINI, 2013; MARIE; GEHANNO, 2015; DENTON; KHANNA, 2017). Por outro lado, o componente genético exerce forte contribuição na susceptibilidade com diversos *locus* genéticos descritos (SALAZAR; MAYES, 2015).

Os aspectos genéticos da ES vêm sendo bastante estudados por diferentes abordagens. Estudos de associação ampla do genoma (GWAS) vêm apontando novos *loci* associados a susceptibilidade à ES e até mesmo a manifestações específicas da doença (RAMOS; SILVER; FEGHALI-BOSTWICK, 2015; SALAZAR; MAYES, 2015; DE MARTINIS et al., 2016; MURDACA et al., 2016; ZUO et al., 2016). As alterações mais comuns no código genético e, por conseguinte, apontadas como marcadores em diversas doenças autoimunes são os SNPs (inglês, *single nucleotide polymorphism*). Estes polimorfismos podem conferir mudanças na expressão gênica, nos RNAs e também nos produtos finais do gene, as proteínas (SALAZAR; MAYES, 2015). Desde a última década, novos estudos envolvendo SNPs de galectinas vem surgindo em doenças autoimunes, como exemplo, a artrite reumatoide (AR) (HU et al., 2011; DE BOER et al., 2012; ATABAKI et al., 2017). Dentre os genes estudados, está o da galectina-3 (Gal-3), *LGALS3*, com os SNPs

mais relevantes rs4652, rs4644 e rs1009977 (HU et al., 2011; DE BOER et al., 2012; ATABAKI et al., 2017, KAUR et al., 2017). Os dois primeiros SNPs, *LGALS3* rs4652 e rs4644, são exônicos localizados nas regiões +292 e +191, respectivamente. Já o rs1009977 está situado no íntron 2 do gene *LGALS3*.

A Gal-3 é a única galectina do tipo quimera, apresentando estruturalmente uma unidade de domínio de reconhecimento de carboidrato (DRC) e uma cauda N-terminal estendida por uma prolina ou glicina (DUMIC; DABELIC; FLÖGEL, 2006). Com funções chave em processos importantes à biologia celular, como regulação da apoptose, endocitose, proliferação, ciclo celular, auto-tolerância e mediação de respostas imunes, a Gal-3 é expressa em muitas células imunocompetentes e inflamatórias (DUMIC; DABELIC; FLÖGEL, 2006; HSU; CHEN; LIU, 2009; KARLSSON et al., 2009; RADOSAVLJEVIC et al., 2012; CHUNG et al., 2013). Além destas funções, a Gal-3 age no processo de fibrose ativando miofibroblastos via TGF- β (do inglês, *transforming growth factor beta*) (HENDERSON et al., 2006; MACKINNON et al., 2012). Em modelos animais, a Gal-3 esteve associada a importantes mecanismos, como fibrose e inflamação. Em um modelo experimental de artrite induzida por antígeno, os camundongos Gal-3^{-/-} apresentaram diminuição da inflamação e de citocinas pró-inflamatórias (FORSMAN et al., 2011). Em fibroblastos adventícios pulmonares de ratos, a inibição da Gal-3 reduziu a deposição de MEC (matriz extracelular) mediada por TGF- β 1 (WANG et al., 2016). Em dois modelos de lesão renal, a inibição da Gal-3 reduziu o quadro fibrótico (MARTINEZ-MARTINEZ et al., 2016). Embora alguns resultados publicados sejam contraditórios, a Gal-3 mostrou-se relevante na ES. Em pacientes com ES, as concentrações séricas de Gal-3 estavam associadas a indivíduos que apresentavam úlceras digitais e elevada pressão ventricular sistólica direita. Além disso, os níveis de Gal-3 sérica estavam associados a um maior escore de Rodnan, indicando correlação com a gravidade da doença (TANIGUCHI et al., 2012). Em outro estudo, a concentração sérica da Gal-3 estava maior no grupo de pacientes com ES comparada com o grupo controle (KOCA et al., 2014). Além disso, foi visto que, diferente do resultado de Taniguchi et al. (2012), os níveis séricos da Gal-3 não haviam sido correlacionados com os índices de gravidade e atividade da doença. (TANIGUCHI et al., 2012; KOCA et al., 2014).

Sob este contexto, o presente trabalho avaliou a possível influência de polimorfismos rs4652, rs1009977 e rs2075601 do gene *LGALS3* na susceptibilidade e parâmetros clínico-laboratoriais da ES, além de avaliar os níveis séricos da Gal-3 e sua associação com os polimorfismos.

1.1 JUSTIFICATIVA

A ES é uma doença autoimune crônica, caracterizada principalmente por fibrose progressiva de múltiplos órgãos internos e da pele. É uma patologia que apresenta altas taxas de morbimortalidade entre outras doenças da mesma classe. Os mecanismos pelos quais a doença se origina e evolui ainda não estão bem elucidados e, por esta razão, torna-se importante novos estudos, dentre eles, os estudos de associação genética.

A Gal-3 mostrou estar ligada a diversas doenças autoimunes, demonstrando um importante papel na fisiopatologia delas. Doenças como a artrite reumatoide (AR) e o lúpus eritematoso sistêmico (LES), possuem mais resultados disponíveis na literatura científica em comparação com a ES, demonstrando a necessidade de pesquisas sobre a Gal-3. Estudos evidenciaram que a Gal-3 apresenta um considerável potencial pró-fibrótico, o que sugere sua participação na fisiopatologia de doenças fibróticas como a ES.

Tendo em vista a potencial participação da Gal-3 na fisiopatologia da ES e considerando a ausência de estudos que avaliem os polimorfismos do gene da Gal-3 (*LGALS3*) em pacientes com ES, investigamos a associação destes polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) com os parâmetros clínico-laboratoriais, comparar os níveis da Gal-3 sérica em amostras de pacientes e no grupo controle, e investigar a possível associação dos SNPs selecionados com a concentração sérica da Gal-3.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Analisar a possível associação de polimorfismos no gene *LGALS3* com níveis séricos de galectina-3 e com manifestações clínicas em pacientes com esclerose sistêmica.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Determinar a frequência dos SNPs rs4652, rs1009977 e rs2075601 do gene *LGALS3* em pacientes com esclerose sistêmica e em controles sadios;
- Investigar se há associação entre o score de Rodnan e os genótipos dos pacientes, encontrados para os SNPs *LGALS3* rs4652, rs1009977 e rs2075601;
- Investigar se há associação entre os níveis de galectina-3 e os genótipos dos pacientes e controles sadios, encontrados para os SNPs *LGALS3* rs4652, rs1009977 e rs2075601;
- Avaliar a associação dos níveis séricos de galectina-3 com dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com esclerose sistêmica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ESCLEROSE SISTÊMICA

A esclerose sistêmica (ES) é uma doença autoimune sistêmica que afeta o tecido conjuntivo e causa, em longo prazo, fibrose de pele e órgãos internos (GABRIELLI; AVVEDIMENTO; KRIEG, 2009).

Os dados epidemiológicos acerca da ES são imprecisos, pois por se tratar de uma doença rara, seu surgimento é variado em diversos países e populações exibindo médias de 7 a 700 casos por milhão (RANQUE; MOUTHON, 2010; ELHAI et al., 2014). No Brasil, o único registro epidemiológico disponível sobre a ES demonstrou incidência de 11,9 e prevalência de 105,5 casos por milhão por habitantes, para a população de Campo Grande – Mato Grosso do Sul (HORIMOTO et al., 2016). A doença em questão atinge mais pessoas do sexo feminino em detrimento do masculino, na proporção de 7 mulheres: 1 homem, com predomínio na faixa de idade de 30 a 50 anos (GU et al., 2008; ZIMMERMANN; PIZZICHINI, 2013).

2.1.1 Etiopatogênese

Ainda não está esclarecido qual o gatilho para o desenvolvimento da doença, contudo acredita-se que fatores ambientais combinados com carga genética sejam os grandes responsáveis pelo aparecimento da doença (ZIMMERMANN; PIZZICHINI, 2013; SALAZAR; MAYES, 2015; DENTON; KHANNA, 2017).

Dados da literatura sugerem diversos fatores ambientais como agentes relacionados à ES, como por exemplo, a exposição à sílica e solventes orgânicos (ZIMMERMANN; PIZZICHINI, 2013). Ainda compõem a lista de fatores: infecções virais por papilomavírus humano (HPV), hepatite B (HBV), parvovirus B19, citomegalovirus (CMV), pesticidas, quimioterápicos e, até mesmo, radiação ultravioleta (DIOT et al., 2002; ARNSON et al., 2009; ZIMMERMANN; PIZZICHINI, 2013; DENTON; KHANNA, 2017). Em adição, amianto, tabagismo, e partículas de diesel são também apontados como possíveis gatilhos para a doença (DOSPINESCU; JONES; BASU, 2013; MARIE; GEHANNO, 2015; DE MARTINIS et al., 2016).

Embora não se tenha certeza sobre a influência de alguns destes fatores no desencadeamento dos primeiros sintomas, acredita-se que possa existir uma ação positiva ao desenvolvimento doença por parte destes fatores. No caso do tabagismo, particularmente, há maior consenso que esta prática está mais ligada à severidade da doença e não ao aparecimento dos sintomas (DOSPINESCU; JONES; BASU, 2013), funcionando como um mantenedor dos problemas circulatórios e pulmonares (STICHERLING, 2012).

Relacionado aos fatores genéticos, estudos apontaram para a presença de polimorfismos em regiões específicas associadas à ES. Estas alterações no código genético podem conferir proteção ou susceptibilidade à doença, ou mais especificamente, a manifestações clínicas e progressão da doença (SALAZAR; MAYES, 2015; DE MARTINIS et al., 2016; ZUO et al., 2016). Estudos recentes apontaram alguns *locus* como o HLA-DPA1 e HLA-DPB1 que podem estar associados à doença, com cerca de 15 regiões descritas como relevantes para o início da doença (RAMOS; SILVER; FEGHALI-BOSTWICK, 2015; BOSSINI-CASTILLO; LÓPEZ-ISAC; MARTÍN, 2015).

Estima-se que apenas 15% dos genes relacionados à susceptibilidade a doenças autoimunes tenham sido descobertos. As doenças autoimunes compartilham vias de autoimunidade, pois apresentam alterações genéticas semelhantes, desta forma, importantes proteínas codificadas por genes envolvidos em processos inflamatórios e autoimunes podem ser marcadores para diferentes desordens de caráter autoimune, incluindo a ES (JIN et al., 2014; CECCARELLI; AGMON-LEVIN; PERRICONE, 2016).

Sabendo que o modelo da herança mendeliana (monogênica) não se aplica à realidade de ES (SALAZAR; MAYES, 2015), os estudos GWAS (*Genome-Wide Association Studies*) relatados apontaram várias áreas genéticas ligadas à ES, incluindo regiões codificantes e não codificantes. Radstake et al. (2011) apontaram o *locus* CD247 (rs2056626) como uma região de susceptibilidade à doença. Contrariamente, um estudo funcional revelou que o SNP CD247 rs2056626 não estava associado à susceptibilidade à ES na população chinesa (WANG et al., 2014). Bossini-Castillo et al. publicaram um estudo multicêntrico no qual expõem o haplótipo TGC (SNPs rs763361, rs34794968 e rs727088) do gene do CD226 relacionado com risco à fibrose pulmonar em pacientes com ES (BOSSINI-

CASTILLO et al., 2012). Dois estudos relataram que os afro-americanos têm maior susceptibilidade do que as populações caucasianas ao desenvolvimento da doença nos EUA (LAING et al., 1997; MAYES et al., 2003). GWAS e Imunochips revelaram novos *locus* que podem ser associados à susceptibilidade ou a fenótipos clínicos da ES (GORLOVA et al., 2011; MAYES et al., 2014; MURDACA et al., 2016; RAMOS; SILVER; FEGHALI-BOSTWICK, 2015).

Polimorfismos na região do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) – considerada a mais polimórfica do genoma humano e conhecido por codificar os antígenos leucocitários humanos (HLA) de classe I e II, situada no cromossomo 6 – revelaram grande impacto na susceptibilidade à ES, sendo o HLA de classe II o mais associado com ES (SALAZAR; MAYES, 2015; MURDACA et al., 2016). Em populações com ancestralidade europeia, os alelos DRB1*0802 e DQA1*0501 foram associados à mortalidade. Adicionalmente, o *locus* HLA-DQB1 foi associado à presença de autoanticorpos anticentrômero e o *loci* HLA-DPA1/B1 com anticorpos anti-Scl70 (MURDACA et al., 2016).

Regiões não-MHC também são apontadas nos estudos recentes. Tais estudos mostraram evidências de associação da ES com as regiões: TREH-DDX6, PPAR- γ , IL-12A, IL-12RB1, IL-1R, ATG5, DNASE1L3-PXK, IRF5, IRF8, IKZF3, STAT4, BANK1, TNIP1, TNFAIP3, TNFSF4, PTPN22, CSK, NOTCH4, CD226, IRAK1, FOXP3, MECP2, VCAM1 e PLCL2 (BOSSINI-CASTILLO et al., 2015; RAMOS; SILVER; FEGHALI-BOSTWICK, 2015, SALAZAR; MAYES, 2015; MURDACA et al., 2016). Outras regiões genéticas como IL23R, KCNA5, MMP-12 possuem evidência de associação com a ES e por esta razão continuam sendo estudadas (AGARWAL, 2010). Recentemente, um estudo brasileiro revelou que polimorfismos no gene da matriz metaloproteinase [MMP1 -1607 (rs1799750), MMP3 -1171 (rs3025058)] não estavam associados com susceptibilidade a ES, contudo, foi encontrada associação com a presença de anticorpos antinúcleo, calcinose e doença pulmonar intersticial (RECH et al., 2016).

Mesmo com as identificações realizadas através de GWAS, ainda é fundamental a realização de estudos funcionais que sejam capazes de apontar ou reafirmar o impacto de determinados fatores genéticos na susceptibilidade à ES em diferentes populações, com a finalidade de esclarecer especificamente as causas

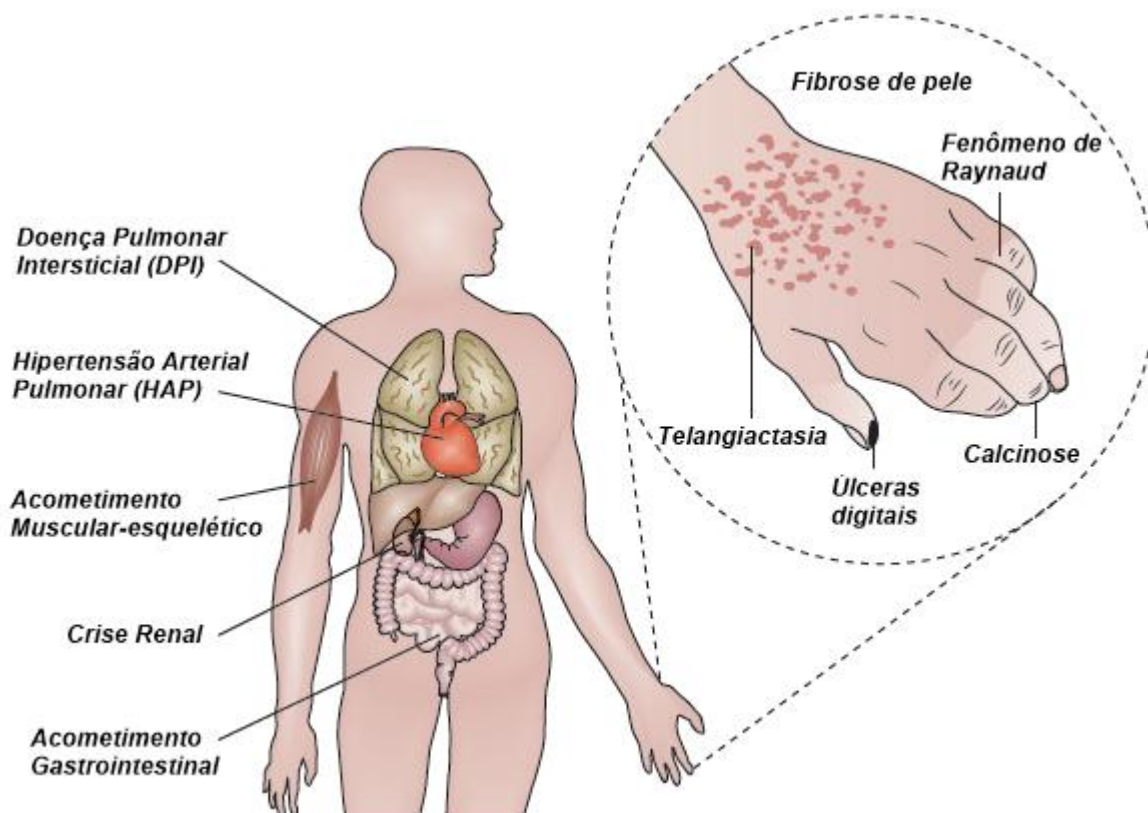
das disparidades étnico-específicas inerentes às doenças com herança genética, especialmente a ES (RAMOS; SILVER; FEGHALI-BOSTWICK, 2015).

2.1.2 Manifestações clínicas

Os pacientes acometidos pela ES são classificados em dois fenótipos diferentes de acordo com a extensão do comprometimento de pele: cutânea limitada (ESI) e cutânea difusa (ESd). Em linhas gerais, os pacientes ESI exibem fibrose limitada a face, pescoço, extremidades distais dos joelhos e cotovelos, e eventuais lesões em órgãos internos. Já os pacientes com a forma ESd, possuem um grau fibrótico mais elevado, possuindo tecido fibrótico que se estende por todo o tegumento, bem como, graves lesões em órgão internos como pulmão, rins e coração (LEROY et al., 1988). Adicionalmente, os pacientes que exibem o fenótipo ESd possuem mais rápida progressão da doença do que os pacientes com ESI. Interessantemente, pacientes com a forma ESI possuem maior índice de acometimento vascular, como o fenômeno de Raynaud (FRy), maior frequência de úlceras digitais e de hipertensão arterial pulmonar (HACHULLA; LAUNAY, 2011).

Na pele dos pacientes, pode aparecer telangiectasia, calcinose, FRy, úlceras digitais e fibrose de pele (Figura 1). A fibrose de pele é a característica mais marcante da doença. A mesma é avaliada pelo escore de Rodnan modificado, o qual possui pontuação máxima de 51 pontos (KRIEG; TAKEHARA, 2009; FURST et al., 1998; ALLANORE, 2015). Em complementação, outros acometimentos de pele como microstomia (diminuição da abertura da boca) e leucomelanodermia (alteração da pigmentação) podem ser encontrados (KRIEG; TAKEHARA, 2009).

Figura 1 - Principais manifestações clínicas da esclerose sistêmica.



Fonte: Allanore, 2015; Modificada.

O FRy é bastante comum nos pacientes com ES podendo ser um dos primeiros sintomas, sendo possível auxiliar no diagnóstico precoce da doença (MEDSGER, 1994; FLAVAHAN et al., 2003). O FRy é resultado dos mecanismos vasoconstritores desencadeados por baixas temperaturas e/ou estresse, sendo observado nas mãos e pés com aparência pálida, seguida por cianose e eritema (FLAVAHAN et al., 2003; ALLANORE, 2015; DENTON; KHANNA, 2017).

As úlceras digitais necessitam de atenção médica, pois prejudicam a função dos dedos, provocam dor e causam susceptibilidade a infecções por agentes externos. Estas úlceras podem ocorrer como consequência de diversos fatores, dentre eles, a falta de oxigenação do tecido devido ao acometimento vascular, bem como a possíveis traumas e calcinose (STEEN et al., 2009). A calcinose apresenta ocorrência de até 25% em pacientes, sua gravidade varia a cada indivíduo e permanece sendo uma complicação desafiadora, pois existem dificuldades no manejo e tratamento deste sintoma (ALLANORE, 2015; DENTON; KHANNA, 2017).

Como característica da doença, órgãos internos também podem ser acometidos. Os órgãos mais afetados são o trato gastrointestinal (TGI), pulmão, rim, coração, e ainda o sistema músculo esquelético (Figura 1).

O envolvimento pulmonar em pacientes com ES tem sido a maior preocupação pelas equipes da saúde atualmente. Fibrose pulmonar ou doença pulmonar intersticial (DPI) e hipertensão arterial pulmonar (HAP) são os principais acometimentos a nível de pulmão e somam quase 50% das causas de morte dos pacientes (ALLANORE, 2015). As complicações resultantes da DPI são mais comuns no subgrupo ESd e avaliadas através da tomografia computadorizada (TC) e do teste de função pulmonar (ALLANORE, 2015; DENTON; KHANNA, 2017). Por outro lado, a HAP é resultante das complicações vasculares e mais comum em pacientes que expressam o fenótipo ESl. Cerca de 15% dos pacientes com ES apresentam HAP, resultante de fatores de risco como maior duração da doença, presença marcante de telangiectasia e presença de autoanticorpos anti-centrômero (ALLANORE, 2015 DENTON; KHANNA, 2017). Ambos acometimentos, DPI e HAP, são grandes responsáveis pela perda da capacidade respiratória e piora significativa da qualidade de vida, bem como a principal causa de mortalidade entre os pacientes (NIKPOUR; BARON, 2014).

A dismotilidade gastrointestinal é resultante das alterações vasculares e fibróticas. O acometimento do TGI possui frequência maior que 80% dentre os pacientes com ES, sendo evidenciado no surgimento dos sinais clínicos disfagia, constipação, diarreia, e refluxo gastroesofágico, causador da esofagite (FORBES; MARIE 2009; NIKPOUR, 2010; ALLANORE, 2015).

O comprometimento músculo-esquelético faz-se presente entre os pacientes com ES, causando artropatia ou miosite com uma notável frequência. Nos casos mais graves, há perda progressiva da força motora, diminuindo ainda mais a qualidade de vida dos pacientes (MORRISROE; NIKPOUR; PROUDMAN, 2015).

O envolvimento renal na ES é representado pela crise renal esclerodérmica (CRE). Acomete aproximadamente 5% dos pacientes, particularmente em pacientes do subgrupo ESd, e apresenta-se na forma de hipertensão arterial e insuficiência renal aguda (MOUTHON et al., 2014). Anos atrás, foi considerada a manifestação mais grave entre os pacientes por causar óbito. Devido à ingestão de glicocorticoides, principalmente em altas doses, a susceptibilidade à CRE aumenta.

Contudo, após o advento dos inibidores da enzima conversora de angiotensina, a mortalidade associada à CRE diminuiu drasticamente de 76 para menos de 10% (BOSE et al., 2015).

2.1.3 Autoanticorpos

Os autoanticorpos revelam sua importância na doença por auxiliar no diagnóstico e serem biomarcadores de complicações órgão-específica (MEIER et al., 2012; VAN DER HOOGEN et al., 2013; MEHRA et al., 2013). Estes anticorpos, ainda, ajudam no rastreio precoce da ES e no direcionamento do prognóstico (DENTON; KHANNA, 2017). Úteis no diagnóstico clínico e subclassificação da ES, os autoanticorpos anticentrômero, anti-DNA topoisomerase I (anti-Scl70) e anti-RNA polimerase (ARA) I e III possuem antígenos intra e extranucleares como alvo de ligação (MEHRA et al., 2013).

Anticorpos anticentrômero têm como antígeno três tipos de proteínas do centrômero: CENP-A, CENP-B e CENP-C (ANDRADE; LESER, 2004). Dentre os pacientes com ES, estes anticorpos são mais encontrados naqueles que possuem a forma limitada da doença (CASTELINO; VARGA, 2013). Tais anticorpos estão associados com maior risco de HAP, contudo pacientes que possuem estes autoanticorpos apresentam menor índice de mortalidade do que os que são positivos para anti-Scl70 (CASTELINO; VARGA, 2013; KAYSER; FRITZLER, 2015).

A presença dos autoanticorpos anti-Scl70 revelam um pior prognóstico para os pacientes, estando relacionada com envolvimento cardíaco, fibrose pulmonar, crise renal, além de estarem associados ao fenótipo ESd numa frequência que varia de 15 a 42% e possuir maior índice de mortalidade dentre os pacientes com ES (CASTELINO; VARGA, 2013; MEHRA et al., 2013; KAYSER; FRITZLER, 2015).

Os anticorpos ARA I e III são considerados altamente específicos para ES e ocorrem numa frequência de 5 a 31% (KAYSER; FRITZLER, 2015). A presença deste autoanticorpo está associada com formas mais severas do fenótipo ESd, além de maior risco a crise renal, sinovite e miosite (CASTRO; JIMENEZ, 2010; CASTELINO; VARGA, 2013; MEHRA et al., 2013; KAYSER; FRITZLER, 2015).

2.1.4 Diagnóstico

O diagnóstico é realizado pelo médico levando em consideração as manifestações clínico-laboratoriais do paciente, ou seja, as primeiras manifestações da doença como alterações vasculares (incluindo o FRy), bem como a presença dos autoanticorpos específicos (SAMPAIO-BARROS et al., 2013; HUDSON; FRITZLER, 2014).

Inicialmente, os pacientes eram classificados de acordo com os critérios da *American College of Rheumatology* (ACR), publicados em 1980. O diagnóstico era fechado, quando se constatava a presença do critério maior: espessamento cutâneo simétrico proximal da pele (proximal às metacarpofalangeanas); ou dois critérios menores: esclerodactilia, úlceras digitais ou reabsorção de falanges distais, e fibrose bilateral na base pulmonar (MASI et al., 1980; LEROY et al., 1988; SAMPAIO-BARROS et al., 2013).

Por não ser sensível o suficiente para diagnosticar com precisão a ES, o ACR em associação com a *European League Against Rheumatism* (EULAR) objetivaram a melhor classificação dos pacientes otimizando a lista de critérios (Tabela 1). Isto foi necessário devido a baixa sensibilidade para incluir pacientes com ES precoce e ES cutâneo limitada (ESI). A lista passou a compreender os três braços de manifestações da doença, vasculopatia, autoimunidade e fibrose; e, pacientes na fase precoce, bem como os que apresentavam o fenótipo ESI (VAN DE HOOGEN et al., 2013).

Tabela 1 - Critérios de classificação para a esclerose sistêmica.

CRITÉRIOS	Maiores	Menores
ACR	Espessamento cutâneo proximal às MCF	Esclerodactilia; Microcicatrices digitais ou perda de substância; Fibrose pulmonar bibasal.
ACR/EULAR	Espessamento cutâneo proximal às MCF	<i>Puffy fingers</i> ou Esclerodactilia; Úlceras digitais ou Microcicatrices de polpa digital; Telangiectasias; Capilaroscopia alterada; HAP ou DPI; FRy; Autoanticorpos.

Fonte: O autor (2018).

ACR= American College of Rheumatology; DPI= doença pulmonar intersticial; EULAR= European League Against Rheumatism; FRy= fenômeno de Raynaud; HAP= hipertensão arterial pulmonar; MCF= metacarpofalangeanas.

2.1.5 Tratamento farmacológico

Devido à complexidade patogênica da doença, o processo de intervenção terapêutica enfrenta barreiras para que seja atingida a eficiência necessária para melhoria dos sintomas evidenciados nos pacientes acometidos. Vale ressaltar que se trata de uma doença, até o presente momento, sem cura ou até mesmo que tenha eficiência o suficiente para reverter o quadro fibrótico da doença (ALLANORE; MATUCCI-CERINIC; DISTLER, 2016; RAJA; DENTON, 2016).

O espectro de medicamentos geralmente utilizados por pacientes com ES compreende os: (1) imunossupressores, (2) glicocorticoides (GC) e (3) vasodilatadores (antagonistas da endotelina, bloqueadores dos canais de cálcio (BCC), inibidores da fosfodiesterase, inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA), e os bloqueadores do receptor da angiotensina II (BRA) (SAMPAIO-BARROS et al., 2013).

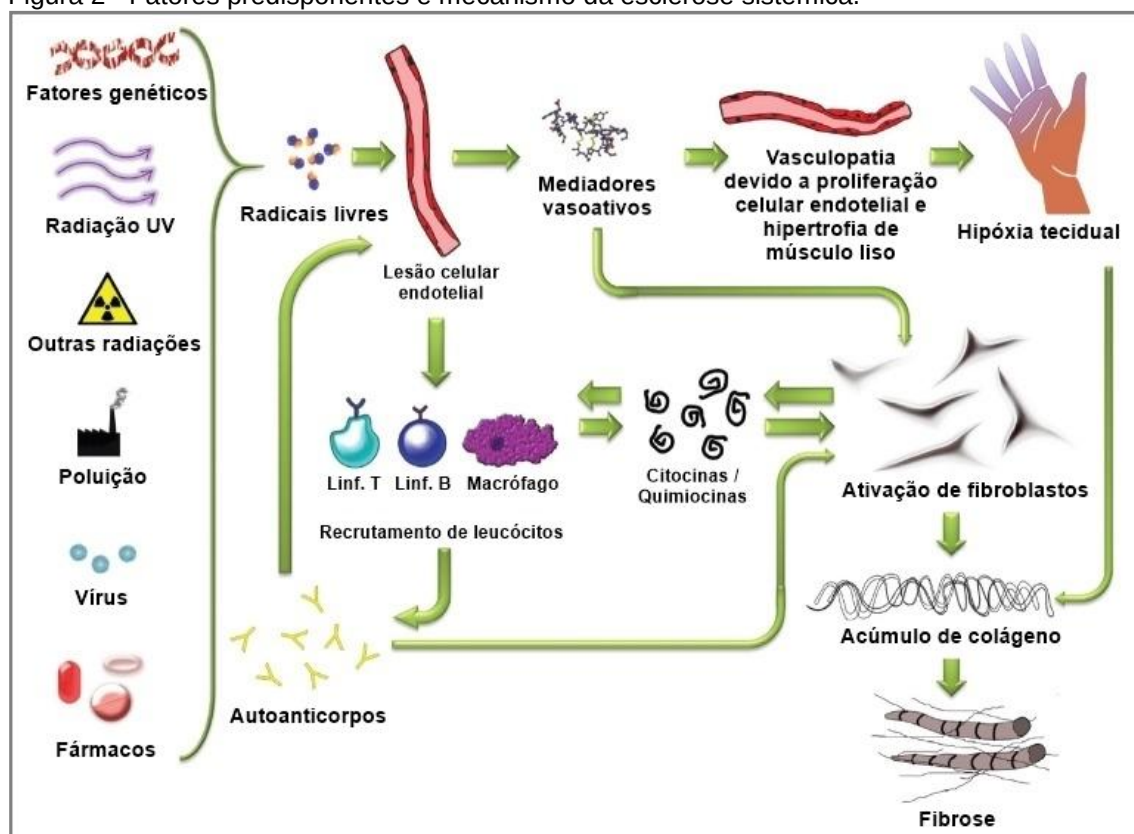
Os imunossupressores são drogas bastante utilizadas em doenças inflamatórias crônicas e autoimunes, entretanto um percentual significativo de pacientes não apresentam resposta, dificultando ainda mais o tratamento (MANNO; BOIN, 2010). Os GC são utilizados por pacientes em tratamento da sinovite, miosite e doença pulmonar intersticial. Contudo, apesar da ação imunomoduladora dos GC, um maior risco à crise renal esclerodérmica foi constatado (SPIES et al., 2011). No

combate aos sintomas causados pelo FRy e as úlceras digitais, são administrados aos pacientes os antagonistas da endotelina, BCC ou inibidores da fosfodiesterase (SAMPAIO-BARROS et al., 2013). Em casos de hipertensão arterial causada pela crise renal, os pacientes fazem uso dos IECA, além dos BRA como tratamento alternativo (DENTON et al., 2009).

2.1.6 Fisiopatogenia

O processo patológico da ES é bastante complexo e envolve muitas células do sistema imune, células vasculares, bem como células e componentes da MEC. Na fisiopatogenia da ES, são vistos três tipos de acometimentos: vascular, autoimune e fibrótico (Figura 2). Estes são os três braços da doença, os quais estão estritamente relacionados por mecanismos ainda pouco elucidados. A forma heterogênea com que estes três principais eventos ocorrem causa os diferentes fenótipos da doença (ZIMMERMANN; PIZZICHINI, 2013; GABRIELLI; AVVEDIMENTO; KRIEG, 2009; BARON, 2016; DENTON; KHANNA, 2017; KUMAR et al., 2017).

Figura 2 - Fatores predisponentes e mecanismo da esclerose sistêmica.



Fonte: VISWANATH; PHISKE; GOPALANI, 2013; Modificado.

2.1.6.1 Vasculopatia

A vasculopatia é causada pelo desequilíbrio entre substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras, e devido às alterações sofridas pelas células responsáveis pela vascularização. Uma das primeiras etapas do processo que finda com a fibrose, o comprometimento vascular é bastante frequente nos pacientes com ES, caracterizado pelo microambiente antiendotelial, que leva a um quadro reduzido de vascularização percebido pelos sinais clínicos associados à vasculopatia (NAVARRO; BUSTOS, 2006; STICHERLING, 2012). Devido à má oxigenação (isquemia), resultando em hipóxia tecidual, o dano nas estruturas dos vasos sanguíneos pode ser tão intenso a ponto de provocar necrose e ser necessária a amputação de membros ou parte deles (MARVI; CHUNG, 2010; TEJERA SEGURA; FERRAZ-AMARO, 2015).

O mecanismo pelo qual ocorre o comprometimento vascular envolve espécies reativas de oxigênio, moléculas de adesão (ICAM-1 e E-selectina), vasoconstritores (endotelina-1) e vasodilatadores (óxido nítrico e prostaciclina), proteases - como a

granzima A -, autoanticorpos e diversas células que os produzem. Em conjunto, estas células e seus produtos provocam nos microvasos aumento dos espaços intercelulares, aumento de permeabilidade facilitando a diapedese, ativação da coagulação e fatores fibrinolíticos, aumentando o risco a trombose, e edema no espaço extracelular (MARVI; CHUNG, 2010; STICHERLING, 2012; STERN; DENTON, 2015).

Devido às funções alteradas das células envolvidas no processo angiogênico, a dificuldade de neovascularização é um ponto importante a ser observado. Patologicamente, as células vasculares endoteliais aumentam o nível de expressão de moléculas de adesão em sua superfície. Estas moléculas de adesão, a saber, endotelina-1, ICAM e E-selectina, facilitam o processo de migração leucocitária (diapedese), favorecendo a inflamação e a inibição da síntese do fator de crescimento endotelial e produção de fatores de crescimento pró-fibróticos como o TGF- β , VEGF (do inglês, *vascular endothelial growth factor*), CTGF (do inglês, *connective tissue growth factor*) e PDGF (do inglês, *platelet-derived growth factor*) (LIAKOULI et al., 2011; STICHERLING, 2012; STERN; DENTON, 2015).

2.1.6.2 Desregulação imunológica

Os linfócitos T são responsáveis pela vasta produção de citocinas vista na patogenia da ES. A subpopulação de linfócitos Th1 (*T-helper*), por exemplo, secreta altos níveis de interferon-gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina-2 (IL-2), citocinas importantes na fisiopatologia da doença (GIZINSKI; FOX, 2014). O IFN- γ possui papel regulador da produção de quimiocinas, além de estar relacionado com manifestações específicas da ES (BALANESCU et al., 2015; CHIZZOLINI et al., 2006; DANTAS et al., 2015). As principais citocinas Th2 implicadas na ES são a IL-4 e IL-13, que mais se relacionam com o processo de fibrose, já que ambas aumentam a síntese de colágeno por fibroblastos da MEC (CHIZZOLINI et al., 2006). Responsável por ampliar a resposta Th2 e suprimir as demais subpopulações, a IL-4 age favorecendo o processo de fibrose (CHIZZOLINI et al., 2011; BARAUT et al., 2012; GIZINSKI; FOX, 2014). A IL-6 se mostrou em níveis elevados em pacientes com ES, especialmente no fenótipo ESd. Seu papel envolve desde a diferenciação de células Th0 (naïve) em Th17 à promoção da

fibrose por estimulação de fibroblastos (SATO; HASEGAWA; TAKEHARA, 2001; GEYER; MÜLLER-LADNER, 2011).

Na ES, as células Th17 estão mais relacionadas com a promoção da inflamação. Estes linfócitos têm a IL-17 como sua citocina de assinatura e, ainda, produz e secreta outras interleucinas como a IL-21, IL-22 e IL-23 (CHIZZOLINI; BOIN, 2015). A IL-17 foi relacionada com a promoção da produção de sinalizadores pró-inflamatórios (BREMBILLA et al., 2013). De maneira geral, linfócitos Th17 são caracterizados por promover a inflamação e também limitar a deposição de colágeno por um mecanismo que depende parcialmente de IL-17, TNF e IFN- γ (BREMBILLA et al., 2013).

Os linfócitos T regulatórios (Treg) são conhecidos pelo seu papel na manutenção da tolerância do sistema imune a antígenos próprios. Como em doenças autoimunes ocorre uma perda desta tolerância, acredita-se que os Treg possam estar funcionalmente defeituosos ou em números reduzidos (STERN; DENTON, 2015; CHIZZOLINI; BOIN, 2015). Slobodin e Rimar (2016), revisando a ação dos linfócitos Treg na ES, observaram que estas células podem ser convertidas em células efectoras do perfil Th17 ou Th2, produzindo citocinas proinflamatórias e fibróticas. Os autores ainda sugerem que existam fatores solúveis específicos que inibem a função Treg em pacientes com ES (SLOBODIN; RIMAR, 2017).

Também envolvidos na fisiopatogenia da ES, os linfócitos B são mais conhecidos pela sua produção de autoanticorpos (STEEN, 2008). Alguns destes anticorpos como o anti-Scl70, anticentrômero e anti-RNA polimerase são utilizados como marcadores específicos para a doença, outros ainda possuem ação patogênica como o anti-fibroblasto e anti-fibrilina-1 (ZIMMERMANN; PIZZICHINI, 2013; KAYSER; FRITZLER, 2015).

As células B, também, desempenham importantes funções além da produção de anticorpos, como apresentação de antígeno, organogênese linfoide, diferenciação de células T efectoras, além de influenciar a função de células dendríticas (SATO et al., 2005). A expressão dos receptores de superfície CD19 e CD85 de células B da pele revelam ativação duradoura destes linfócitos durante a doença (ZIMMERMANN; PIZZICHINI, 2013). Testes *in vitro* mostraram que a subpopulação de linfócitos B periféricos provenientes de pacientes secretam

grandes quantidades de IL-6 e TGF- β , contribuindo para ativação de fibroblastos e fibrose de pele (SATO et al., 2005; DUMOITIER et al., 2017).

Embora os linfócitos sejam os principais representantes do sistema imune na ES, monócitos, macrófagos, mastócitos, e células dendríticas também têm sua participação na fisiopatologia da doença por exercerem importantes funções, como apresentação de antígeno e secreção de mediadores químicos da inflamação (ALLANORE, 2015; DOWSON et al., 2017). Infiltrado de células mononucleadas foram encontrados em estágios iniciais da ES, as quais estavam associadas com o aumento de síntese de colágeno por fibroblastos (GU et al., 2008; DOWSON et al., 2017). Em suma, os perfis de linfócitos Th1 e Th17, estão associados com um quadro mais inflamatório e inicial da doença, enquanto que o perfil Th2 quando aumenta seu *pool* de citocinas causa uma supressão da resposta Th1 e dirige, via citocinas e quimiocinas, o curso da doença para o estabelecimento do quadro fibrótico (BARAUT et al., 2010).

2.1.6.3 Fibrose

O processo de fibrose, embora presente durante o momento inicial da doença é estabelecido como resultado dos mecanismos do dano vascular e do direcionamento Th2 (VARGA; ABRAHAM, 2007). A isquemia tecidual persistente e a resposta imune anormal culminam em uma alta taxa de proliferação de miofibroblastos, síntese de colágeno e fibrose tecidual cutânea e visceral, vistas na ES (NAVARRO; BUSTOS, 2006). Com mecanismos complexos, o curso da doença leva o paciente a um estágio fibrótico que pode ser totalmente incapacitante. Desta forma, a fibrose é considerada o resultado mais grave e impactante na qualidade de vida dos pacientes. Para que a fibrose aconteça, uma variedade de células (fibroblastos, miofibroblastos, células endoteliais, pericitos, células de músculo liso, células-tronco mesenquimais, células epiteliais, células linfoides, e células apresentadoras de antígenos) trabalhem em conjunto, bem como os componentes da MEC. Os principais componentes da MEC são os colágenos fibrilares tipo I e II, colágeno tipo VII, fibrilas elastinas, fibrilina e as enzimas que realizam as ligações cruzadas do colágeno. Dentre as células importantes para o estabelecimento e manutenção da fibrose, destacam-se os fibroblastos e os miofibroblastos

(CHIZZOLINI et al., 2011; STICHERLING, 2012; ZIMMERMANN; PIZZICHINI, 2013; HO et al., 2014; KENDALL; FEGHALI-BOSTWICK, 2014).

Os fibroblastos são células essenciais para reparação do dano tecidual. Em condições normais estas células produzem a quantidade de fibras suficiente para o reparo do tecido de conexão e eventuais excessos são corrigidos pelas MMPs. Entretanto, o *pool* de mediadores pró-fibróticos, em especial a IL-4, IL-6, IL-13, IL-17, IL-33, PDGF, CTGF e TGF- β propicia o estado de hiperativação dos fibroblastos (BHATTACHARYYA; WEI; VARGA, 2011; HO et al., 2014; KENDALL; FEGHALI-BOSTWICK, 2014).

Dentre os mediadores pró-fibroticos relacionados com a ES, o TGF- β é considerado o principal. Este potente e pleiotrópico fator de crescimento é produzido e secretado por células T, monócitos, plaquetas e fibroblastos na forma de um complexo latente, o qual somente é ativado quando ocorre lesão tecidual. Além de outras funções, o TGF- β é um importante mitógeno que age via receptor do PDGF em fibroblastos e na ES aumenta a expressão de CTGF. As respostas pró-fibróticas do TGF- β podem ser mediadas vias intracelulares de sinalização Smad-dependente (Smad-1 e Smad-2) ou Smad-independente, isto é, por outras vias não-Smad como ERK1/ERK2, TAK1, AKT, JNK e p38, EGR1, FAK1 e c-Abl. (GABRIELLI; AVVEDIMENTO; KRIEG, 2009; BHATTACHARYYA; WEI; VARGA, 2011; ZIMMERMANN; PIZZICHINI, 2013; STERN; DENTON, 2015; ALLANORE, 2015).

O TGF- β não somente é importante para os fibroblastos e miofibroblastos, mas também o é para as células T (Th17, Th2, Treg), pois age em conjunto com outras citocinas como IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17 (CHIZZOLINI et al., 2015). Em continuação, o PDGF é secretado por plaquetas, macrófagos, células endoteliais e fibroblastos que funciona como estimulantes para células mesenquimais. Semelhante ao TGF- β , o PDGF possui importante papel na cicatrização, inflamação, angiogênese e fibrose. O CTGF (ou CCN2), por sua vez, é expresso em altos níveis em doenças fibróticas, é um importante efetor na via do TGF- β e possui importantes funções na cicatrização, angiogênese e fibrose. Este mediador encontra-se elevado em soro de pacientes com ES, é caracterizado por promover fibrose, agindo sinergicamente com o TGF- β (KENDALL; FEGHALI-BOSTWICK, 2014; ALLANORE, 2015; STERN; DENTON, 2015).

Os miofibroblastos são fibroblastos especializados que possuem capacidade de contração e expressam α -SMA (*alpha-smooth muscle actin*). Eles podem ser derivados de uma variedade de tipos celulares, como fibroblastos, pericitos, células endoteliais e células epiteliais, e possuem uma alta capacidade de secretar componentes da MEC e TGF- β (GABRIELLI; AVVEDIMENTO; KRIEG, 2009; GEYER; MÜLLER-LADNER, 2011; HO et al., 2014; KENDALL; FEGHALI-BOSTWICK, 2014).

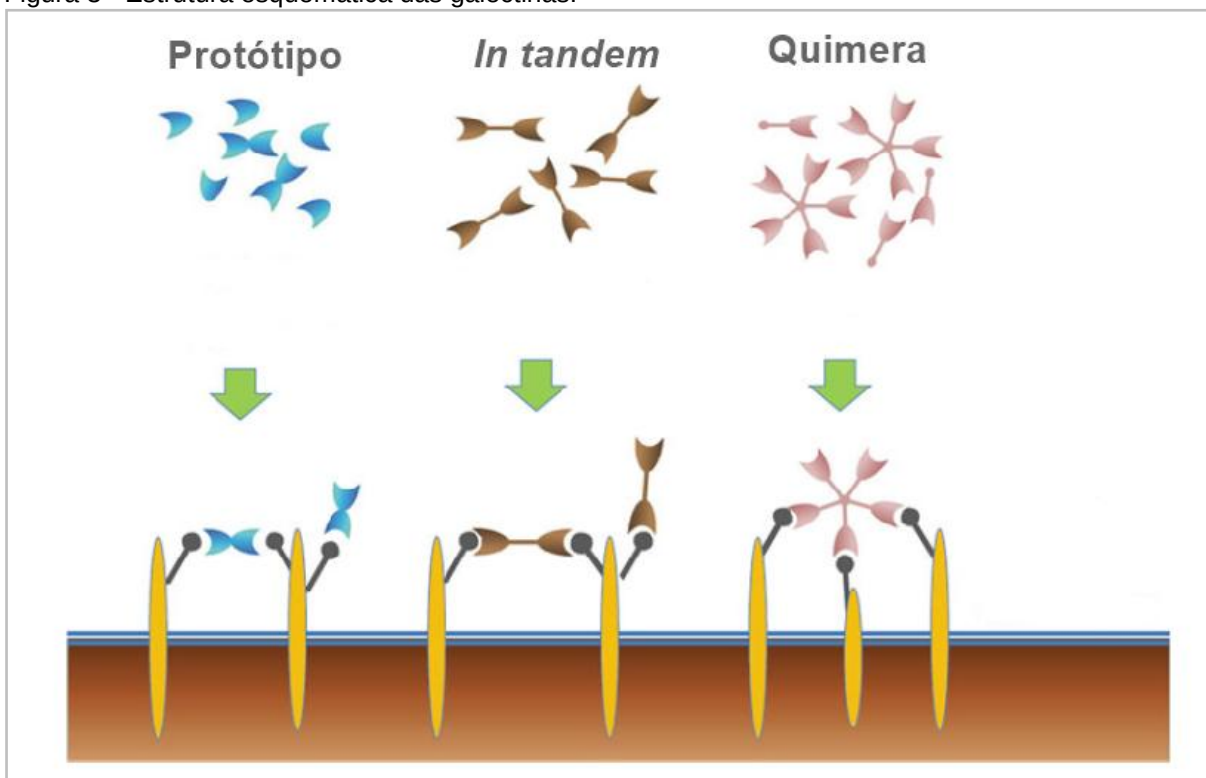
Com função mediadora na inflamação e participação na autoimunidade, as galectinas, em especial a Gal-3, vêm sendo estudadas no contexto das doenças inflamatórias crônicas, câncer e doenças autoimunes, dentre elas a ES (DUMIC; DABELIC; FLÖGEL, 2006; LIU; RABINOVICH, 2010; RADOSAVLJEVIC et al., 2012).

2.2 GALECTINA-3

As galectinas, inicialmente chamadas de lectinas tipo-S, são conhecidas por apresentarem um peso de 30kDa, possuírem alta afinidade de ligação a carboidratos β -galactosídeos, além de apresentarem uma sequência conservada de 130 aminoácidos no seu DRC. Este domínio é composto por duas folhas- β antiparalelas com cerca 130 aminoácidos – algumas galectinas apresentam alguns aminoácidos a mais (BARONDES et al., 1994; HIRABAYASHI; KASAI, 1993; VARKI et al., 2009).

Atualmente, em mamíferos, a família das galectinas possui 15 membros (1 a 15), sendo subdivididas em 3 subtipos – protótipo, *in tandem* e químera - de acordo com as diferenças estruturais do DRC (Figura 3). As galectinas são encontradas em várias regiões da célula como citoplasma e núcleo celular, além de estarem presentes extracelularmente, exercendo em cada uma dessas regiões funções distintas. Diferentes formas de apresentação são possíveis às galectinas: monômeros, dímeros, oligômeros, formando redes galectina-glicoproteína na superfície externa da membrana celular (DUMIC; DABELIC; FLÖGEL, 2006; RABINOVICH et al., 2007).

Figura 3 - Estrutura esquemática das galectinas.

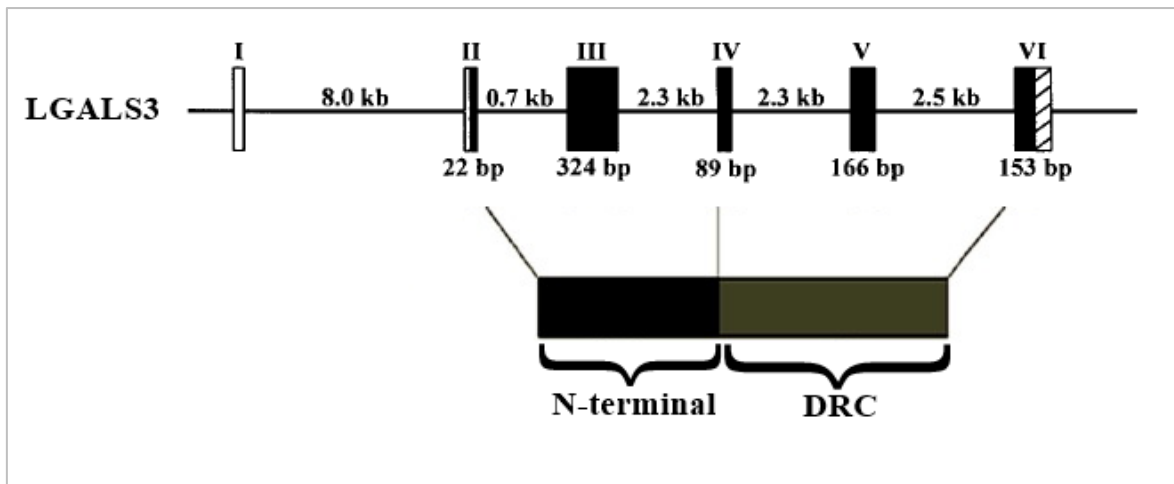


Fonte: Gao et al., 2013; Modificada.

O grupo protótipo é caracterizado por galectinas que possuem entre 14 e 18kDa, têm apenas um DRC e uma pequena região N-terminal. As galectinas que compõem este grupo (galectinas 1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 4 e 15) são encontradas em monômeros e dímeros. O segundo grupo nomeado de *in tandem* compreendem as galectinas 4, 6, 8, 9 e 12 as quais apresentam na sua estrutura dois diferentes DRCs ligados por um peptídeo (Figura 3) (GUPTA, 2012).

Sendo a única galectina do tipo quimera, a Gal-3 é codificada pelo gene *LGALS3* (*Lectin, Galactoside-Binding, Soluble, 3*), localizado no braço longo do cromossomo 14 (14q22.3), composto por 6 éxons e 5 íntrons resultando em aproximadamente 17 Kb de todo o genoma humano (ATABAKI et al., 2017; KAUR et al., 2017). Como apresentado na figura 4, o éxon 3 codifica a região N-terminal, enquanto os éxons 4, 5 e 6 codificam o DRC. A parte inicial do gene, representa a região não traduzida do gene na posição do éxon 1 e parte do éxon 2, este abrangendo o sítio de iniciação da tradução. Após a tradução do mRNA, a galectina produzida fica armazenada no citoplasma, até que exerça funções no citosol, núcleo ou seja secretada para o meio extracelular (YANG; RABINOVICH; LIU, 2008).

Figura 4 - Partes do gene que codificam o domínio de reconhecimento de carboidrato (DRC) e a cauda N-terminal.



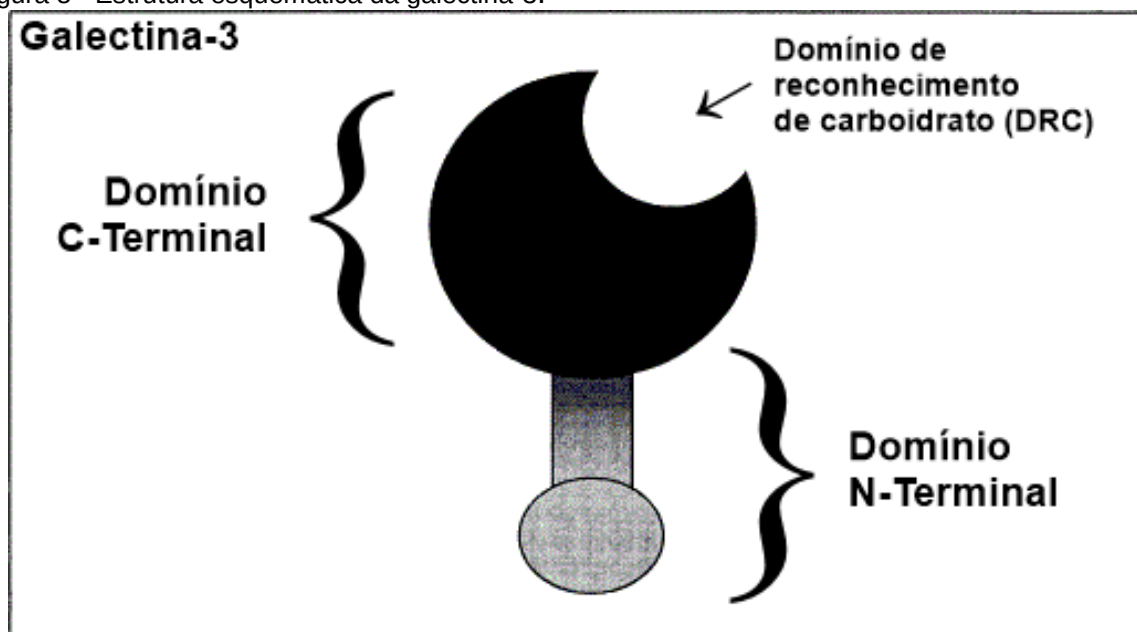
Fonte: Kaur et al., 2017; Modificada.

Nota: Os éxons são representados pelas barras verticais éxons, enquanto os íntrons são representados pelas barras horizontais.

A degradação da Gal-3 é feita através da ligação com as MMPs, as quais se ligam a uma sequência *colágeno-like* na estrutura da galectina (DUMIC; DABELIC; FLÖGEL, 2006). A Gal-3 liga-se principalmente a resíduos de N-acetilactosamina, contudo, essa proteína monomérica também pode se ligar a lipídeos e peptídeos através de subsítios de ligação, sendo inibida pela molécula da lactose (DUMIC; DABELIC; FLÖGEL, 2006).

Outros sinônimos encontrados para a Gal-3 são: Mac-2, L-29, CBP-35, L-31, e proteína ligadora de IgE. A figura 5 apresenta o DRC da Gal-3, formado na extremidade C-terminal da proteína. Na porção N-terminal a Gal-3 possui uma repetição de 9 aminoácidos e uma sequência de 12 peptídeos com resíduos de prolina e glicina, possibilitando a formação de oligômeros e redes de interação galectina-glicoproteína (KRZEŚLAK; LIPÍŃSKA, 2004; DUMIC; DABELIC; FLÖGEL, 2006; RABINOVICH et al., 2007; KAUR et al., 2017). Esta porção encontra-se relacionada à atividade biológica da Gal-3 na apoptose, pois a mutação no resíduo 6 da serina afeta sua atividade anti-apoptótica, e além disso, esse domínio é crucial para a secreção da Gal-3 para o meio extracelular, mais precisamente devido aos resíduos 89 a 96 contendo prolina (DUMIC; DABELIC; FLÖGEL, 2006; HU et al., 2017).

Figura 5 - Estrutura esquemática da galectina-3.



Fonte: PRICCI et al., 2000; Modificada.

A secreção da Gal-3 para o meio extracelular pode ocorrer através do processo de exocitose, no qual a galectina é liberada em forma de vesículas. Essas vesículas se fundem com a membrana plasmática e então são liberadas através de evaginações da membrana (HU et al., 2017). A depender do tipo celular, a Gal-3 pode ser secretada por meio da interação com lipídeos da membrana plasmática, ou através de endossomas acidificados carregados por vesículas para a extremidade membranar (SCHNEIDER et al., 2010; HU et al., 2017).

Estudos apontam que a Gal-3 exerce funções biológicas importantes em diversas regiões, podendo estabelecer ligações fundamentais com outras proteínas tanto no citoplasma e núcleo, quanto no meio extracelular (LIU; PATTERSON; WANG, 2002; KRZEŚLAK; LIPÍŃSKA, 2004; DUMIC; DABELIC; FLÖGEL, 2006; HSU et al., 2015). A migração da Gal-3 recém produzida no citoplasma para o núcleo pode se dar através de difusão passiva ou por transporte ativo via poro nuclear (NAKAHARA et al., 2006). Em cada um desses locais, esta lectina pode exercer funções diferentes, dando-lhe a característica de pleiotrópica (DUMIC; DABELIC; FLÖGEL, 2006; LI; LI; GAO, 2014; HSU et al., 2015).

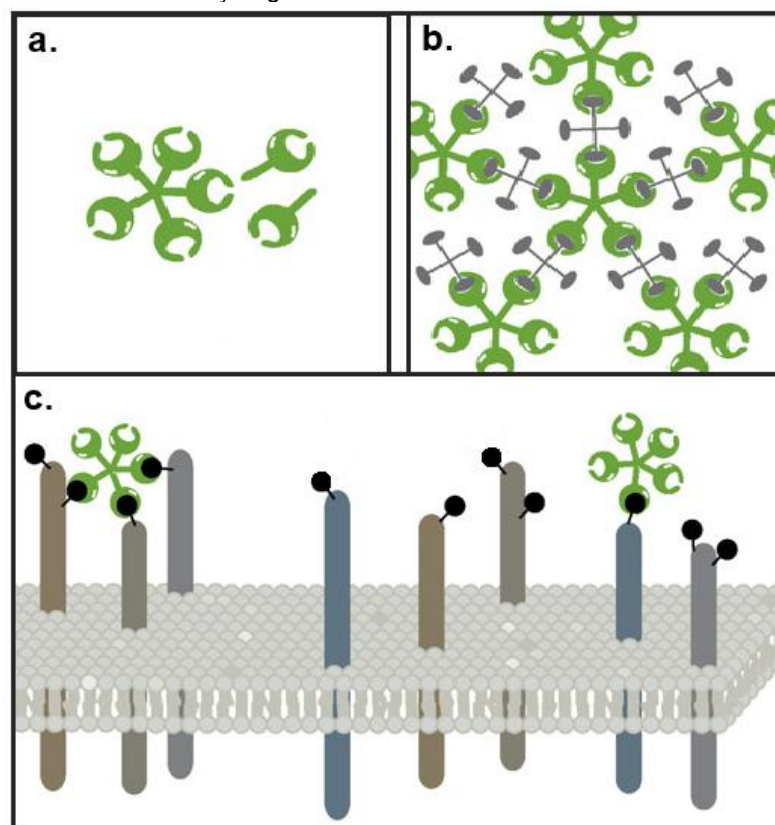
Trabalhos iniciais revelaram que a Gal-1 e a Gal-3 estão em maior quantidade no núcleo e no citoplasma (HSU et al., 2015). Intracelularmente, a Gal-3 é capaz de regular o ciclo celular, o *splicing* de pré-RNAm, crescimento celular, e através das

vias Fas e TNF protege a célula da morte celular programada (DAGHER; WANG; PATTERSON, 1995; LIU; PATTERSON; WANG, 2002; FUKUMORI et al., 2004).

Em modelo animal para rato e camundongos, foi observado que a Gal-3 age como uma citocina em células cerebrais. A sinalização promovida pela Gal-3 promoveu a produção de altos níveis de citocinas pró-inflamatórias como também exibiu um aumento na fosforilação de receptores do tipo tirosina-kinase. Adicionalmente, a expressão e secreção da Gal-3 encontraram-se elevadas em células da glia após estímulo pró-inflamatório de IFN- γ recombinante (JEON et al., 2010).

Extracelularmente a Gal-3 atua como uma proteína matricelular que pode facilitar ou dificultar o processo de adesão dependendo da necessidade celular (OCHIENG; FURTAK; LUKYANOV, 2002; LIU; RABINOVICH, 2010). Ainda, esta proteína medeia transdução de sinal, além de outros processos biológicos importantes como a angiogênese, distúrbios autoimunes, endocitose, e possivelmente a exocitose (OCHIENG; FURTAK; LUKYANOV, 2002; LIU; RABINOVICH, 2010). A Gal-3, assim como outras galectinas, pode formar redes de interação galectina-carboidrato (Figura 6) as quais são importante mecanismo utilizado pelas células para autotolerância (RABINOVICH et al., 2007; LIU; RABINOVICH, 2010).

Figura 6 - Estrutura e rede de interação galectina-3-carboidrato.



a. estrutura da Gal-3 em monômeros e pentâmeros; **b.** redes galectina-carboidrato; **c.** redes galectina-carboidrato na superfície celular
Fonte: RABINOVICH et al., 2007; Modificado.

A Gal-3 está envolvida em processos inflamatórios participando da ativação de células da resposta imune humoral e celular, bem como na resposta inata. Esta galectina é expressa em diversas células imunocompetentes e inflamatórias, como macrófagos, basófilos, células dendríticas, eosinófilos, mastócitos, células NK e linfócitos T e B (DUMIC; DABELIC; FLÖGEL, 2006; RADOSAVLJEVIC et al., 2012). Além disso, a Gal-3 afeta o crescimento e a diferenciação de células imunes, sendo capaz de ativar as células T, monócitos e neutrófilos, bem como inibir a produção de IL-5 em eosinófilos humanos. Na resposta inata, a Gal-3 é considerada como receptor de reconhecimento de padrões (PRRs) devido a capacidade de se ligar a glicanos provenientes de patógenos, papel importante no reconhecimento do antígeno (SANO et al., 2009; RADOSAVLJEVIC et al., 2012). Ademais, Gal-3 pode agir como uma quimocina, auxiliando no recrutamento de macrófagos, e como uma opsonina, contribuindo para a retirada tecidual dos fagócitos apoptóticos (SANO et al., 2000; KARLSSON et al., 2009). *In vitro* a Gal-3 foi capaz de aumentar a

produção de IL-10 em monócitos humanos de sangue periférico humano (CHUNG et al., 2013). Ademais, Gal-3 diminui a apresentação de antígeno de linfócito T e reduz a diferenciação de monócitos em células dendríticas (HSU; CHEN; LIU, 2009; CHUNG et al., 2013).

Jiang e colaboradores (2012) apresentaram efeitos moduladores de fibrose pela Gal-3 *in vivo* em camundongos C57/B6 Gal-3^{-/-}, após o procedimento experimental de ligação do ducto biliar, utilizado para induzir inflamação e fibrose hepática. Nos animais Gal-3^{-/-} foram observados baixos níveis de expressão de marcadores fibróticos como o procolágeno- α 1 e α -SMA, bem como o marcador de inflamação MCP1 (proteína quimiotática de monócitos). Além da fibrose, Gal-3 foi apontada como facilitadora do processo de fagocitose dos corpos apoptóticos pelas células estreladas hepáticas (JIANG et al., 2012). Também em modelo animal, a Gal-3 mostrou-se chave na regulação da ativação de miofibroblastos através do TGF- β , bem como exibiu importante função no mecanismo de fibrose hepática (HENDERSON et al., 2006; MACKINNON et al., 2012). Baixa expressão de colágeno-1 e α -SMA em miofibroblastos de camundongos Gal-3^{-/-} em resposta ao estímulo de TGF- β 1 foi observada. Ainda, no modelo de fibrose pulmonar induzida por bleomicina, um inibidor de Gal-3 atenuou a progressão da fibrose em fase tardia através do bloqueio da ativação da β -catenina via TGF- β 1. Assim, o bloqueio da Gal-3 resultou numa importante contenção à progressão da fibrose pulmonar *in vivo* (MACKINNON et al., 2012).

2.2.1 Gal-3 em doenças inflamatórias e autoimunes

Com importantes funções em processos biológicos, a Gal-3 tem sido evidenciada em doenças inflamatórias e autoimunes. Utilizando um modelo experimental de artrite induzida por antígeno (AIA) em camundongos deficientes de Gal-3 (Gal-3^{-/-}) constatou-se que houve uma diminuição da inflamação e de citocinas pró-inflamatórias, bem como a supressão da AIA. Os resultados apontaram que a Gal-3 exerce um papel patogênico do desenvolvimento e progressão da AIA (FORSMAN et al., 2011). Em modelo de HAP induzida por monocrotalina em ratos, a inibição de Gal-3 foi capaz de reverter a deposição de MEC mediada por TGF- β 1 em fibroblastos adventícios pulmonares (WANG et al., 2016).

Em modelo de artrite induzida por colágeno em camundongos, altas concentrações de Gal-3 sérica foram encontradas, corroborando com outros achados que indicam altas concentração desta glectina, bem como seu papel patogênico da Gal-3 na AR (DE OLIVEIRA et al., 2015). Além da AR, outras doenças como LES, síndrome de Sjögren primária (SSp), hepatite autoimune, dermatite atópica, exibem a participação da Gal-3 no processo patológico (DE OLIVEIRA et al., 2015). Por exemplo, autoanticorpos contra Gal-3 estava em altos níveis em pacientes com glomerulonefrite lúpica e vasculite de pele (KANG et al., 2009; SHI et al., 2015).

Em pacientes com ES, a Gal-3 foi encontrada em altos níveis no soro de indivíduos que apresentavam úlceras digitais e elevada pressão ventricular sistólica direita quando comparados com outros pacientes que não apresentaram estas manifestações (TANIGUCHI et al., 2012).. Também foi observado que o grupo ESd apresentava níveis menores de Ga-I3 que o ESi e controles. Após subestratificação do grupo ESd por tempo de doença, foi visualizado que os pacientes com fenótipo ESd inicial apresentaram níveis de Gal-3 significativamente menores que pacientes ESd tardio. Ainda foi encontrada correlação entre os níveis séricos da Gal-3 com o escore de Rodnan para os pacientes com a forma ESd (TANIGUCHI et al., 2012). Em contrapartida, Koca et al. (2014) observaram que os níveis séricos de Gal-3 estavam mais elevados no grupo de pacientes com ES ao comparar com o grupo sadio, e que os valores séricos de Gal-3 para pacientes com ES ativa estavam maiores se comparados aos portadores da ES inativa. Controversamente aos achados de Taniguchi et al (2012), não foram encontrados níveis menores da glectina nos estágios iniciais da doença. Por fim, ainda pode ser constatado que os níveis séricos da Gal-3 não se correlacionaram com os índices de gravidade e atividade da doença (KOCA et al., 2014).

Ao analisar o processo de fibrose em diversos tecidos como pulmonar, hepático, cardíaco, renal e vascular, foi constatado que a Gal-3 ativa variados fatores pro-fibróticos, exercendo importante papel na fibrogênese (LI; LI; GAO, 2014). Recentemente, aumento da expressão de Gal-3 foi observado num modelo de hiperaldosteronismo experimental com camundongos *knockout* para Gal-3. Nesse trabalho a expressão de Gal-3 estava associada com inflamação cardíaca e fibrose (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ et al., 2015). Em dois modelos animais de dano

renal leve, o bloqueio farmacológico da Gal-3 através da pectina cítrica modificada foi capaz de reduzir a fibrose renal (MARTINEZ-MARTINEZ et al., 2016).

Em suma, sugere-se que a Gal-3 está envolvida no processo patológico de distúrbios autoimunes e fibróticos, dentre eles a ES. Contudo, embora os mecanismos pelos quais a Gal-3 age não estejam completamente elucidados (DE OLIVEIRA et al., 2015) devido ao crescente número de trabalhos mostrando as funções das galectinas em doenças inflamatórias, especialmente a Gal-3, foi sugerido o uso delas como um alvo terapêutico para inibidores ou como proteína recombinante para tratamento de doenças inflamatórias crônicas, câncer, doenças auto-imunes e fibróticas (AMIN; AMIN; WIJAYA, 2017; DE OLIVEIRA et al., 2015; LIU; RABINOVICH, 2010; TEN OEVER et al., 2013).

2.2.2 SNPs de Gal-3 em doenças inflamatórias e autoimunes

O gene *LGALS3* apresenta 484 SNPs em região intrônica e 54 SNPs em regiões codificantes, sendo 16 sinônimos (i.e, onde a mutação da base nitrogenada não resulta em troca de aminoácido) e 38 não-sinônimos (KAUR et al., 2017). Dados da literatura apresentam três SNPs no *LGALS3* mais estudados em doenças autoimunes: rs4652, rs4644 e rs1009977. Os dois primeiros estão localizados no éxon e conferem mudança de aminoácido (uma troca de treonina para prolina e prolina para histidina, respectivamente). O rs1009977 está localizado no íntron (KAUR et al., 2017).

Em 2012, um GWAS foi publicado avaliando alguns SNPs de *LGALS3* bem como os níveis plasmáticos da proteína em indivíduos de ancestralidade europeia. Depois das análises dos SNPs *LGALS3* rs2274273, rs4644(+191) e rs4652(+292) observou-se que o *LGALS3* rs2274273 estava em forte desequilíbrio de ligação com os dois polimorfismos exônicos. Estes, por sua vez, estavam associados com a expressão do gene *LGALS3* e com os níveis plasmáticos da Gal-3 (DE BOER et al., 2012).

Um estudo prévio realizado por Hu et al. mostrou a associação do rs4652 com susceptibilidade à AR na população de Taiwan. Os pacientes que apresentavam o alelo C eram mais susceptíveis a AR que os indivíduos A/A [*odds ratio* (OR) = 1,8]. Além disto, o haplótipo C-C formado pelos SNPs *LGALS3* +191 e +292 estava associado com AR comparado com o grupo controle (HU et al., 2011).

Recentemente o rs4652 foi associado com AR na população iraniana. Contudo, diferentemente de Hu et al. (2011) o genótipo heterozigoto foi o que estava associado ao risco (OR = 11,622) (ATABAKI et al., 2017).

Os SNPs *LGALS3* +191 e +292 também foram estudados na susceptibilidade à doença de Chagas, doença crônica com características fibróticas nos estágios mais avançados. O link entre estes polimorfismos e a doença em questão foi os níveis da Gal-3. Conhecida por desempenhar importante função em processos inflamatórios e fibróticos, a Gal-3 bem como estes SNPs foram avaliados por pesquisadores brasileiros. Os resultados desta pesquisa não foram positivos quanto à influência do polimorfismo e dos níveis séricos da Gal-3 em pacientes com a doença de Chagas (CRUZ et al., 2015).

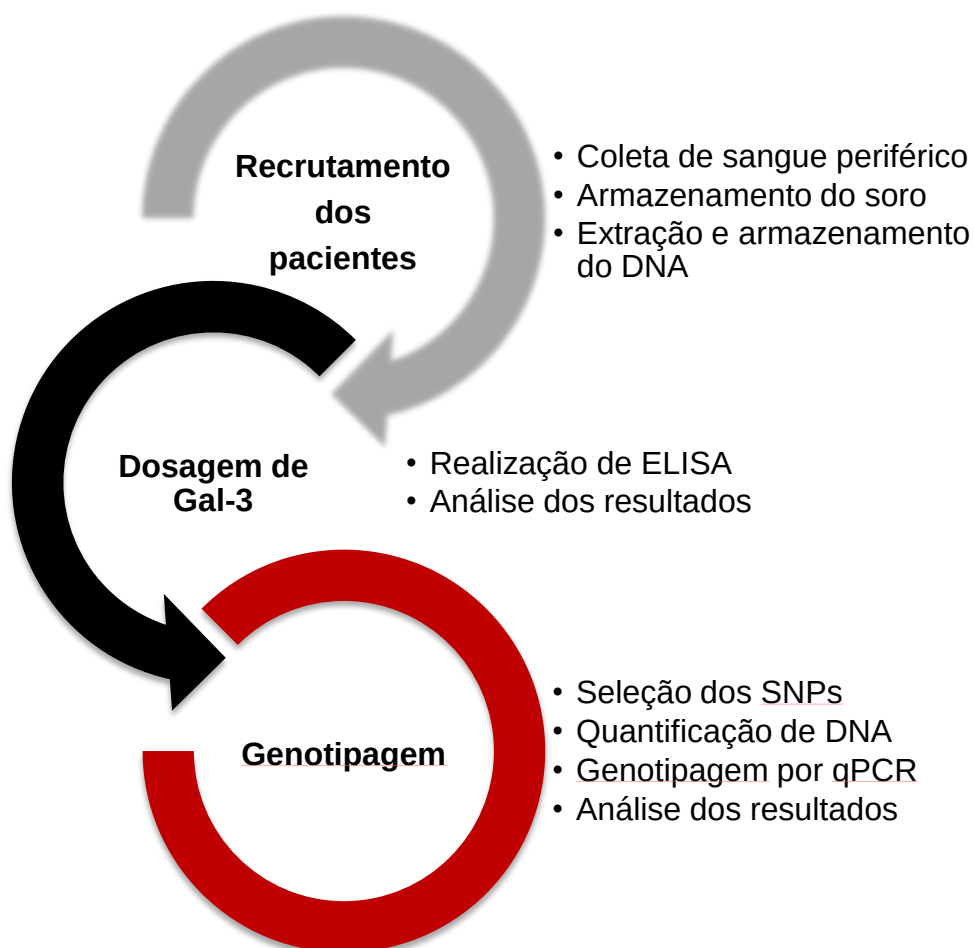
Outros dois estudos avaliaram os polimorfismos +191 e +292 do gene *LGALS3*. O primeiro deles avaliou os SNPs e níveis séricos da Gal-3 em crianças com anemia falciforme. Foi verificado que a diminuição dos níveis séricos de Gal-3 estavam relacionados com os polimorfismos +191 e +292 do gene *LGALS3*, e que estes causavam susceptibilidade para uma alta frequência de infecção respiratória e crises vaso-oclusivas (DE BELMONT et al., 2016). O segundo estudo avaliou a relação dos mesmos polimorfismos com níveis totais de IgE e atopia. Todavia, os rs4652 e rs4644 não apresentaram associação quando a correção para teste múltiplo foi aplicada (CORNEJO-GARCÍA et al., 2016).

Atualmente muitos SNPs estão sendo estudados em doenças autoimunes por diferentes estudos de associação. Embora os polimorfismos mais procurados sejam aqueles localizados em região promotora e éxons devido a sua relativa facilidade em compreender funcionalidade daquele SNP, GWAS recentes revelaram que 88% do SNPs ligados à susceptibilidade à ES estão localizados em regiões não-codificantes e que a maioria dos *hits* são, na verdade, íntrons (BROEN; COENEN; RADSTAKE, 2011; SALAZAR; MAYES, 2015). Desta maneira, torna-se importante a investigação de polimorfismos no *LGALS3* e seus possíveis impactos na patogenia da ES, a fim de que sejam obtidos mais recursos para o diagnóstico precoce dos pacientes.

Vale também salientar que até o presente momento não foi encontrado na literatura científica nenhum estudo de associação caso-controle envolvendo SNPs do gene *LGALS3* em pacientes com ES.

3 METODOLOGIA

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL



3.2 POPULAÇÃO E LOCAL DE ESTUDO

O estudo realizado foi do tipo caso-controle e contou com a participação de 88 pacientes de ambos os sexos acometidos com esclerose sistêmica (ES), e acompanhados no Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) no período de 2016 a 2018. Como grupo controle, foram incluídos 151 indivíduos pareados por sexo e idade, voluntariamente recrutados. A etapa de recrutamento dos participantes do projeto foi desenvolvida no ambulatório de Reumatologia do Hospital das Clínicas de Pernambuco, e a etapa experimental foi realizada Laboratório de Imunomodulação e

Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT), pertencente ao Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica (NUPIT) da UFPE.

3.2.1 Critérios de inclusão e exclusão dos pacientes

Inclusão: Aceitar voluntariamente contribuir para o estudo; ter idade igual ou superior a 18 anos; ser classificado como ES de acordo com os critérios preliminares do *American College of Rheumatology* (MASI, 1980) ou os critérios do *American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism* (ACR/EULAR) 2013 (VAN DE HOOGEN et al., 2013); estar em acompanhamento médico regular no ambulatório de reumatologia do HC-UFPE.

Exclusão: Ser diagnosticado com outra doença reumatológica autoimune associada a ES; impossibilidade de coleta de sangue periférico devido ao seu comprometimento fibrótico.

3.2.2 Critérios de inclusão e exclusão dos voluntários sadios

Inclusão: Idade $\geq$ 18 anos; sem diagnóstico conhecido de doença autoimune reumatológica ou de imunodeficiências.

Exclusão: Possuir parentesco direto com portador de doença reumatológica autoimune; Fazer uso de medicamentos imunossupressores ou anti-inflamatórios.

3.3 DEFINIÇÃO DAS VARIÁVEIS CLÍNICAS

Para caracterização do comprometimento clínico dos pacientes foram utilizadas as seguintes definições:

- Classificação da doença: cutânea limitada e cutânea difusa;
- Tempo de doença (meses): tempo desde o início do primeiro sintoma, excluindo-se o FRY;
- Comprometimento cutâneo: avaliação clínica quanto à presença de espessamento cutâneo;
- Extensão do comprometimento cutâneo: avaliada pelo escore modificado de Rodnan;
- Fenômeno de Raynaud objetivo: presença avaliada pelo médico;

- Úlceras: presença ou história de ulceração de polpas digitais ou superfícies extensoras ou história de necrose extensa e/ou amputação;
- Telangiectasias: presença avaliada pelo médico;
- Calcinose: presença detectada clinicamente pelo médico ou através de radiografia simples;
- Comprometimento articular: presença de artrite evidenciada no exame físico;
- Comprometimento muscular: fraqueza muscular acompanhada de elevação das enzimas musculares;
- Comprometimento gastrointestinal: presença de dismotilidade esofageana avaliada pela cintilografia esofágica e/ou alteração na manometria esofageana;
- Fibrose pulmonar: presença de fibrose pulmonar evidenciada na TC de tórax;
- Hipertensão arterial pulmonar: pressão sistólica da artéria pulmonar ≥ 35 mmHg estimada pelo ecocardiograma transtorácico com doppler;
- Crise renal esclerodérmica: registro no prontuário de insuficiência renal, com ou sem elevação da pressão arterial, atribuída à ES;
- Medicções utilizadas pelo paciente: BCC, IECA, bloqueador do receptor de angiotensina (BRA), ácido acetilsalicílico, pentoxifilina, cilostazol, sildenafil, bosentana, corticosteroide, metotrexato, azatioprina, micofenolato de mofetila, ciclofosfamida (oral ou venosa), inibidor da bomba de prótons (IBP), procinéticos e anti-inflamatórios não-hormonais;
- Perfil de autoanticorpos: positividade para anticorpos antinucleares, anticentrômero e/ou anti-Scl70, de acordo com registro no prontuário.

3.4 COLETA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Foram coletados, para cada paciente, 13mL de sangue periférico, 9mL em tubo sem anticoagulante com gel separador e 4mL em tubo com o anticoagulante EDTA. Após as coletas, o material biológico foi encaminhado ao LINAT.

No LINAT, as amostras contidas em tubo seco foram processadas para separação do soro através de centrifugação a 3000rpm por 10 minutos e, em seguida, armazenadas a -80°C . Já as amostras colhidas em tubo com EDTA, foram

centrifugadas para separação do plasma e seu armazenamento a -80°C e o sangue total foi congelado a -20°C até a extração do DNA genômico.

3.5 QUANTIFICAÇÃO SÉRICA DE GAL-3

Utilizando as alíquotas de soro armazenadas a -80°C, foram realizadas as quantificações da Gal-3 através dos ensaios de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) do tipo sanduíche. Seguindo as etapas e utilizando os reagentes adquiridos do fabricante (Cat: DY1154; Lot: 333922; R&D™), o ensaio foi iniciado com a adição de 100µL do anticorpo de captura por poço da placa de ELISA (Nunc®) com incubação noturna (*over night*) para maior sensibilização dos anticorpos. No dia seguinte, o excesso de anticorpos foi retirado com o tampão de lavagem preparado com Tween20 a 0,05% para em seguida proceder com a saturação da placa com o diluente de ensaio por 1 hora à temperatura ambiente no volume de 100µL por poço. Sequencialmente, a placa foi novamente submetida à lavagem com o tampão de lavagem. Assim, as amostras, bem como, o padrão e o branco foram adicionados utilizando 100µL por poço e incubadas por 2 horas à temperatura ambiente. Por conseguinte, a placa foi novamente lavada com o tampão de lavagem e então foi adicionado 100µL por poço do anticorpo de detecção. Depois de 2 horas de incubação à temperatura ambiente e a remoção do excesso de anticorpo pelo tampão de lavagem, 100µL da enzima conjugada foi adicionada em cada poço da placa com incubação sequencial de 20 minutos à temperatura ambiente em local escuro. Passados os 20 minutos, a placa foi lavada com o tampão de lavagem para a adição do substrato. Vale salientar que todas as lavagens foram realizadas manualmente por 3 vezes consecutivas objetivando o preenchimento dos poços e retirada do tampão de lavagem invertendo a placa. Após a adição de 100µL do substrato TMB por poço, esperou-se 20 minutos para que a enzima pudesse converter o substrato adicionado e subsequentemente, a reação foi parada com 50µL da solução de parada (H₂SO₄).

Ao final do experimento, a leitura da densidade óptica foi empregada com a leitora de placas BioTek® no filtro de 450nm, com o auxílio do software Gen5® (Fisher Scientific™). A análise dos resultados obtidos foi feita com o Excel 2007® (Microsoft Office™) onde foi gerada a equação da reta. Para as amostras que

ficaram abaixo do limite de detecção do kit mesmo em diluição mínima de 1:2, foi utilizado o valor do limite de detecção (31,25 pg/mL) apresentado pelo fabricante.

3.6 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

Como técnica padrão no nosso laboratório, a extração do DNA genômico foi realizada através da técnica que utiliza o fenol-clorofórmio (Davis et al., 1986). As amostras de sangue total foram tratadas com tampão de lise de hemácias para restar apenas células nucleadas. Dando continuidade aos procedimentos, é realizada a ruptura das membranas citoplasmáticas e nucleares, seguida de remoção dos lipídeos e desnaturação proteica, e por fim, purificação e solubilização do DNA.

O protocolo inicia-se com a transferência do sangue total para um tubo estéril para centrífuga de 15mL, e adição de uma solução de lise para as células vermelhas, com subsequente centrifugação a 2500rpm por 10 minutos. Na etapa seguinte, foram adicionados 5mL de TKM1 e uma gota de triton seguida de centrifugação a 2500rpm por 10 minutos. Após desprezar o sobrenadante, novamente é adicionado TKM1, dessa vez no volume de 1mL, e então o material é homogeneizado e transferido para um microtubo de 1,5mL para ser submetido a centrifugação a 12.000rpm por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante é desprezado e o pellet ressuspensionado com 400µL de TKM2, 25µL de SDS a 10% e 30µL de proteinase K para então ser incubado a 60°C por 1 hora.

Em continuação, 180µL de NaCl 5M é adicionado, e as amostras ficam incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos para, em seguida, serem centrifugadas a 12.000rpm por 5 minutos. Ao fim da centrifugação, o sobrenadante é transferido para um novo microtubo para receber 400µL de clorofórmio-álcool isoamílico (SEVAG) e 400µL de fenol saturado, sujeitos a breve homogeneização. Mais uma centrifugação a 12.000rpm por 5 minutos é realizada, o sobrenadante é transferido para um novo microtubo e recebe 800µL de SEVAG, após homogeneização uma nova centrifugação a 12.000rpm por 5 minutos é empregada para repetição do processo. Terminada esta etapa, acrescenta-se 10% do volume do sobrenadante com acetato de sódio 3M pH 5,2 e adiciona-se 800µL de etanol absoluto gelado e agita por inversão. As amostras são submetidas a mais uma centrifugação a 12.000rpm por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante é

descartado. Posteriormente, ao microtubo é adicionado 500µL de etanol a 70% gelado e uma nova centrifugação a 12.000rpm por 5 minutos é realizada. Terminada a centrifugação, o sobrenadante é desprezado e o DNA precipitado é ressuspendido com 50µL de água ultrapura (livre de DNase e RNase). A partir de então, o DNA ressuspendido é submetido a quantificação e em seguida armazenado a -80°C.

3.7 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE DNA DAS AMOSTRAS

Para quantificação do DNA extraído, foi retirado 1µL de cada amostra para mensuração, sendo esta feita com o equipamento NanoDrop 1000 (Thermo Scientific®) tendo resultado obtido anotado em planilha.

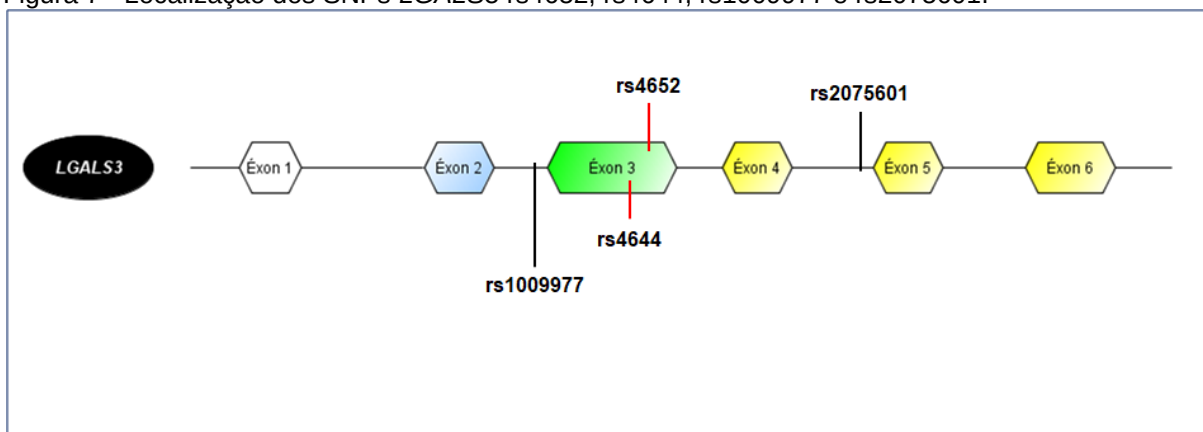
3.8 SELEÇÃO DOS POLIMORFISMOS

Os SNPs foram escolhidos levando-se em consideração: (i) frequência do Alelo Menor (MAF) maior que 0,1 na população europeia CEU, justificada pela maior porcentagem de carga genética na população estudada (Site: HapMap); (ii) *Tag* SNP do grupo de correlação ($r^2 > 0,8$); (iii) trabalhos descritos na literatura que encontram associação com polimorfismos em alguma doença de caráter inflamatório. Os bancos de dados acessados foram: *International HapMap Project* (hapmap.ncbi.nlm.nih.gov); *Ensembl Genome Browser* (www.ensembl.org) e o *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* (www.ncbi.nlm.nih.gov).

A avaliação do Desequilíbrio de Ligação em Pares (DL) para a população europeia CEU foi realizada através do banco de dados SNAP (plataforma online do *Broad Institute* - <http://archive.broadinstitute.org/mpg/snap/ldsearchpw.php>) (JOHNSON, 2008). O PoliMRTS Database 3.0 foi utilizado para pesquisar por miRNAs no gene *LGALS3* (<http://compbio.uthsc.edu/miRSNP/search.php>).

Um total de quatro SNPs do gene *LGALS3* foram selecionados para o estudo, o *LGALS3* rs4656 e rs4644 situados no éxon 3, o *LGALS3* rs1009977, situado no íntron 2 e o *LGALS3* rs2075601 no íntron 4. Contudo, o *LGALS3* rs4644 apresentou problemas na genotipagem e foi conseqüentemente retirado do trabalho.

Figura 7 - Localização dos SNPs *LGALS3* rs4652, rs4644, rs1009977 e rs2075601.



Fonte: O Autor (2018). *LGALS3*=lectin, galectin-binding, soluble 3.

Dentre os SNPs selecionados, apenas o *LGALS3* rs2075601 não possui estudo de associação na literatura científica, entretanto, para sua seleção foi levado em consideração os demais critérios estabelecidos (Tabela 2).

Tabela 2 - Polimorfismos do gene *LGALS3* selecionados para o estudo.

SNP <i>LGALS3</i>	Tipo	Posição no cr.14 (CRCh. 37.p13)	Pop.	MAF	Alelo 1 (%)	Alelo 2 (%)	A1/A1 %	A1/A2 %	A2/A2 %	HWP
rs4652	Missense	55605036	CEU	0.4303	A (50,9)	C (49,0)	27,7	46,2	25,9	0.479
rs4644	Missense	55604935	CEU	0.2933	A (49,1)	C (50,8)	27,4	43,3	29,2	0.200
rs1009977	Intron	55603002	CEU	0.4555	G (49,1)	T (50,8)	28,3	41,5	30,0	0.0997
rs2075601	Intron	55610940	CEU	0.4325	C (45,6)	T (54,3)	34,7	21,7	43,4	0.010

Fonte: O Autor (2018). SNP= *Single nucleotide polymorphism*; Pop.=População; MAF= Frequência do alelo menor; HWP= Princípio de Hardy-Weinberg.

3.9 GENOTIPAGEM POR PCR EM TEMPO REAL

A genotipagem do DNA foi realizada por *real time quantitative PCR* (qPCR) – Reação em Cadeia de Polimerase quantitativa em tempo real utilizando sondas TaqMan® alelo-específicas.

3.9.1 qPCR

A qPCR é uma técnica que tem basicamente 3 processos, são: desnaturação, anelamento e extensão.

Após preparação e transferência das amostras para a microplaca, esta foi levada ao equipamento *StepOnePlus® Real-Time PCR System* (Applied Biosystem®), onde foi corrida a reação. O primeiro processo a ser realizado é a desnaturação da fita dupla do DNA por aquecimento a uma temperatura de 95°C, tornando todo material em fita simples. Por conseguinte, um par de *primers* (iniciadores) complementam as fitas opostas do segmento específico do DNA. Este anelamento ocorre a 60°C. A terceira etapa, que ocorre a 72°C, consiste na extensão do molde já complementado pela enzima Taq DNA polimerase, a qual adiciona as dNTPs correspondentes (presentes no *Master Mix*), formando novamente um DNA de fita dupla.

Para cada alelo, há uma sonda fluorescente diferente, possibilitando a identificação de cada alelo individualmente no genótipo. Desta maneira, é possível identificar o genótipo de cada polimorfismo estudado.

Os reagentes utilizados para realização das PCRs foram: *TaqMan® SNP Genotyping Master Mix*, *TaqMan® SNP Genotyping assay* (fabricados pela Applied Biosystems); e DNA genômico previamente extraído e quantificado. A realização da PCR seguiu o protocolo: 1 ciclo a 95°C durante 10 minutos, seguido de 42 ciclos de 95° por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, utilizando amostra a 20ng/μL.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

As diferenças entre os resultados da genotipagem do tipo caso-controle foram examinadas com o teste qui-quadrado (X^2) e o teste exato de Fisher. Para investigar se os resultados obtidos seguiam os princípios do equilíbrio de Hardy-Weinberg, foi utilizada a plataforma OEGE - Online Encyclopedia for Genetic Epidemiology studies (<http://www.oege.org/software/hardy-weinberg.html>). Uma vez estabelecida associação, o seu poder foi medido pela estatística do *odds ratio* pelo STAT Calc®.

Depois de verificada a normalidade dos dados pelo teste D'Agostinho, foram aplicados os testes paramétricos *t* Student e ANOVA, bem como os não-

paramétricos Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. A correlação de Spearman foi aplicada para avaliar a associação dos níveis séricos de Gal-3 com parâmetros clínico-laboratoriais específicos. Os testes estatísticos foram realizados com o auxílio do software GraphPad Prism 6.0[®](Califórnia, EUA) e as análises foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A tabela 3 sumariza a população recrutada para o estudo. Um total de 88 pacientes com ES [79F/9M - $48,1 \pm 12,7$ (20-81) anos] e 151 controles [135F/19M - $50,5 \pm 12,9$ (22-79) anos] foram avaliados para genotipagem, dos quais, 94 controles tiveram os níveis séricos de Gal-3 mensurados. Subdividindo de acordo com os subgrupos clínicos, participaram do estudo 43 pacientes com a forma ESd e 45 ESl. Entre as manifestações clínicas, 97,7% dos pacientes foram diagnosticados com fenômeno de Raynaud, 86,4% com disfunção esofágica, 69,3% apresentaram acometimento pulmonar, 62,5% com telangiectasias, 43,2% com úlceras digitais, 17,1% com envolvimento muscular, 14,8% exibiam hipertensão arterial pulmonar, 10,2% calcinose, 9% apresentaram artrite e apenas 2 pacientes tinha histórico de crise renal. 90,5% dos pacientes apresentaram positividade para FAN, enquanto 46,9% foram positivos para anti-Scl70 e 12,5% para anticorpo anticentrômero. A mediana para o escore de Rodnan foi de 16 (7,75-26,25; IQR). Levando em consideração o esquema terapêutico utilizado na rotina clínica, 46,6% dos pacientes faziam uso de bloqueador dos canais de cálcio (BCC), 37,5% utilizavam glicocorticoides e 57,9% faziam terapia imunossupressora (Tabela 1).

Tabela 3 - Parâmetros clínicos e demográficos de pacientes com esclerose sistêmica e o grupo controle.

Características	Pacientes ES (n=88)	Grupo controle (n=151)
Idade (anos)		
Média $\pm$ SD (intervalo)	48,1 $\pm$ 12,7 (20 – 81)*	50,5 $\pm$ 12,9 (22 – 79)*
Sexo N (%)		
Feminino	79 (89,8)*	135 (89,4)*
Duração da doença (meses)		
Mediana (intervalo)	111 (19 – 444)	
Subgrupos clínicos N (%)		
Cutâneo Difuso	43 (48,9)	
Cutâneo Limitado	45 (51,1)	
Manifestações clínicas N (%)		
Fenômeno de Raynaud	86 (97,7)	
Disfunção esofageana	76 (86,4)	
Envolvimento pulmonar	61 (69,3)	
Telangiectasias	55 (62,5)	
Úlceras digitais	38 (43,2)	
Envolvimento muscular	15 (17,1)	
Hipertensão Arterial Pulmonar	13 (14,8)	
Calcinose	9 (10,2)	
Artrite	8 (9,0)	
Crise Renal	2 (2,3)	
Score de Rodnan mediana (IQR)	16 (7,75-26,25)	
HAQ mediana (IQR)	1,375 (0,531-1,875)	
SHAQ mediana (IQR)	1,045 (0,483-1,48)	
Autoanticorpos N (%)		
ANA Positivo	67/74 (90,5)	
Anticentrômero Positivo	5/40 (12,5)	
Anti-SCI70 Positivo	23/49 (46,9)	
Tratamento N (%)		
BCC	41 (46,6)	
IECA ou BRA	25 (28,4)	
Sildenafil	10 (11,4)	
Bosentana	7 (7,9)	
Glicocorticoides	33 (37,5)	
Imunosupressor	51 (57,9)	
Azatioprina	28 (31,8)	
Metotrexato	13 (14,8)	
Micofenolato mofetila	5 (5,7)	
Ciclofosfamida	4 (4,5)	
Rituximabe	2 (2,3)	

Fonte: O Autor (2018). ES= esclerose sistêmica; IQR= Intervalo interquartil; HAQ= *health assessment questionnaire*; SHAQ= *scleroderma health assessment questionnaire*; ANA=anticorpo antinuclear; BCC= bloqueador de canal de cálcio; IECA= inibidor da enzima conversora de angiotensina; BRA= bloqueador do receptor da angiotensina.

*não há diferença significativa entre estes grupos.

4.2 ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS NOS GRUPOS CASO E CONTROLE

As frequências genotípicas e alélicas dos SNPs *LGALS3* rs4652, rs1009977 e rs2075601 não apresentaram resultados que indicavam susceptibilidade à doença. Considerando o SNP *LGALS3* rs4652, foi encontrada na população de 59 pacientes e 127 controles uma frequência de 28,81% do genótipo polimórfico(C/C) em pacientes e 43,31% deste genótipo no grupo controle. Adicionalmente, não foi encontrada associação genética ($p>0,05$) entre os genótipos, tampouco no modelo dominante, no qual considera que a presença de um único alelo é suficiente para determinar o fenótipo, agrupando assim o genótipo homozigoto polimórfico com o heterozigoto (C/C + A/C). Vale destacar a maior frequência do alelo polimórfico (C) tanto no grupo caso como no controle, comparando-o com o alelo selvagem (Tabela 4).

Com relação ao SNP *LGALS3* rs1009977, o genótipo G/T apresentou uma *Odds ratio* (OR) de 0,27 [(0,10 – 0,73) IC 95%; $p=0,0047$]. Ainda foi encontrada associação no modelo dominante (T/T + G/T) com uma OR de 0,37 [(0,14 – 0,98) IC 95%; $p=0,0307$].

O SNP *LGALS3* rs2075601 apresentou baixa frequência do genótipo polimórfico (C/C) nos grupos de paciente (10,98%) e controle (2,4%), bem como uma frequência do alelo polimórfico de 42,68% nos pacientes e 46,32% no grupo controle. O genótipo heterozigoto apresentou uma OR de 0,27 [(0,10 - 0,73) IC 95%; $p=0,001$]. Ainda foi observada uma baixa OR [0,33 (0,14 - 0,74) IC 95%; $p=0,004$] para o modelo dominante (C/C + C/T) (Tabela 4).

Dos 84 pacientes submetidos à genotipagem, algumas destas amostras tiveram o genótipo não determinado, a saber: 25 para o rs4652, 32 para o rs1009977 e apenas 2 para o rs2075601. O mesmo ocorreu para amostras controles, nas quais 24 não amplificaram para o *LGALS3* rs4652, 28 para o rs1009977 e 15 para o rs2075601 (Tabela 4). Em nenhum dos grupos estudados, as amostras se apresentaram dentro do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 4 - Frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos *LGALS3* rs4652, rs4644, rs1009977 e rs2075601 em pacientes com esclerose sistêmica e no grupo controle.

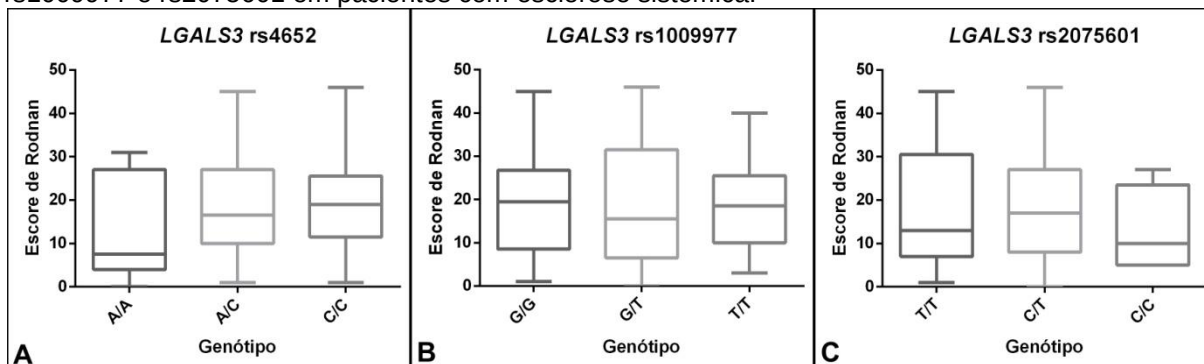
SNP <i>LGALS3</i>	ES	Controles	OR (95%IC)	p-valor
rs4652	N=59	N=127		
Genótipos	N (%)	N (%)		
A/A	10 (16,95)	23 (18,11)	Referência	-
A/C	32 (54,24)	49 (38,58)	1,03 (0,39 - 2,85)	1
C/C	17 (28,81)	55 (43,31)	0,71 (0,26 - 2,02)	0,4794
C/C + A/C	62 (83,05)	134 (81,89)	1,08 (0,45 - 2,75)	1
Alelos				
A	52 (44,07)	95 (37,40)		
C	66 (55,93)	159 (62,60)	0,76 (0,47 - 1,21)	0,2546
rs1009977	N=53 (%)	N=123 (%)		
Genótipos	N (%)	N (%)		
G/G	12 (22,64)	12 (9,76)	Referência	-
G/T	27 (50,94)	102 (82,93)	0,27 (0,10 - 0,73)	0,0047
T/T	14 (26,42)	9 (7,32)	1,54 (2,10 - 16,71)	0,5612
T/T + G/T	41 (77,36)	111 (90,25)	0,37 (0,14 - 0,98)	0,0307
Alelos				
G	51 (48,11)	126 (51,22)		
T	55 (51,89)	120 (48,78)	1,13 (0,70 - 1,83)	0,6426
rs2075601	N=82 (%)	N=136 (%)		
Genótipos	N (%)	N (%)		
T/T	21 (25,61)	14 (10,29)	Referência	-
C/T	52 (63,41)	118 (86,76)	0,3 (0,13 - 0,66)	0,001
C/C	9 (10,98)	4 (2,94)	1,49 (0,33 - 7,94)	0,74
C/C + C/T	61 (74,39)	122 (89,70)	0,33 (0,14 - 0,74)	0,0040
Alelos				
T	94 (57,32)	146 (53,68)		
C	70 (42,68)	126 (46,32)	0,86 (0,57 - 1,30)	0,49

Fonte: O Autor (2018). *LGALS3* rs4652: A=alelo de referência; C=alelo variante; *LGALS3* rs1009977: G=alelo de referência; T=alelo variante; *LGALS3* rs2075601: T=alelo de referência; C=alelo variante. ES=Esclerose sistêmica; IC= Intervalo de confiança; N=tamanho amostral; OR= Odds ratio; SNP= Single Nucleotide Polymorphism.

4.3 ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMO E O ESCORE DE RODNAN

Ao confrontar os dados do escore de Rodnan de cada paciente com os genótipos dos SNPs *LGALS3* rs4652, rs1009977 e rs2075601 não foi encontrado significância estatística que denote associação entre eles (Figura 8).

Figura 8 - Comparação entre o escore de Rodnan e os genótipos dos polimorfismos *LGALS3* rs4652, rs1009977 e rs2075601 em pacientes com esclerose sistêmica.



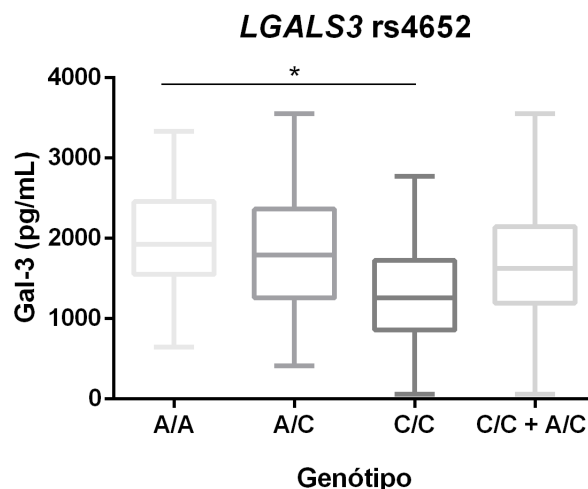
Fonte: O Autor (2018). *LGALS3*=lectin, galectin-binding, soluble 3. **A:** N=59; *LGALS3* rs4652: A=alelo de referência; C=alelo variante. **B:** N=52; *LGALS3* rs1009977: G=alelo de referência; T=alelo variante. **C:** N=81; *LGALS3* rs2075601: T=alelo de referência; C=alelo variante.

4.4 ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMO E NÍVEL SÉRICO DE GAL-3

Diante da possibilidade de haver variação da Gal-3 sérica em detrimento de um genótipo ou alelo específico, os níveis séricos da proteína foram comparados entre si, analisando de acordo com o genótipo.

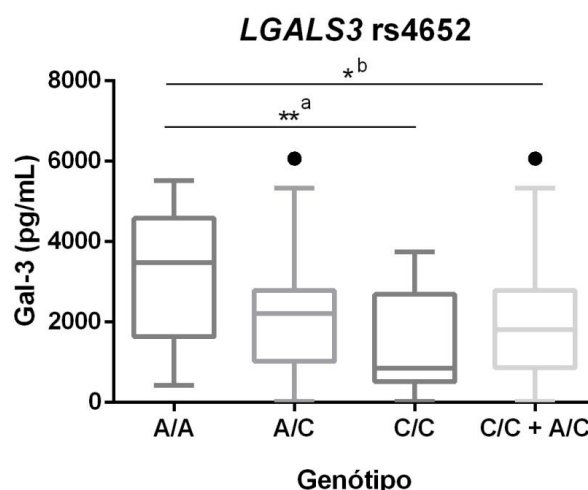
Inicialmente, quando analisado os níveis de Gal-3 frente ao genótipo do SNP *LGALS3* rs4652 observou-se que os pacientes que apresentaram o genótipo homozigoto variante (C/C) possuíam menores concentrações séricas de Gal-3 ($p=0,0382$) (Figura 9). O mesmo aconteceu com o grupo controle, onde também foi constatada a diminuição dos níveis de Gal-3 nos indivíduos com genótipo polimórfico (C/C), se comparado ao selvagem (A/A) ($p=0,0051$). De contínuo, analisando o modelo dominante, foi encontrada diferença estatística quando comparado com o genótipo selvagem ($p=0,0174$) (Figura 10).

Figura 9 - Comparação entre o nível sérico da galectina-3 e os genótipos do polimorfismo *LGALS3* rs4652 em pacientes com esclerose sistêmica.



Fonte: O Autor (2018). N=59; *LGALS3*=lectin, galectin-binding, soluble 3. *LGALS3* rs4652: A=alelo de referência; C=alelo variante; C/C + A/C = modelo dominante. *= $p<0,05$

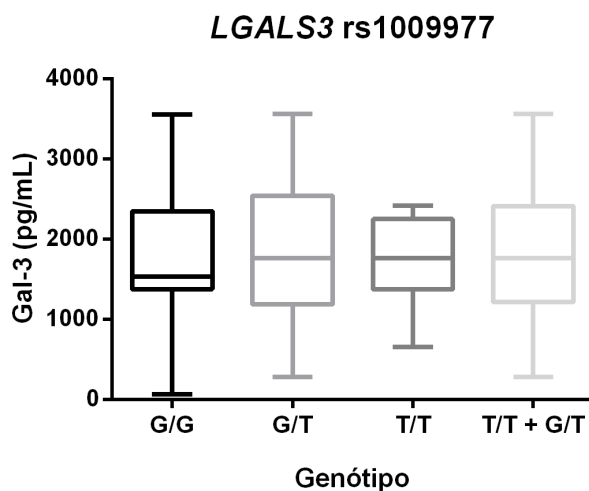
Figura 10 - Comparação entre o nível sérico da galectina-3 e os genótipos do polimorfismo *LGALS3* rs4652 no grupo controle.



Fonte: O Autor (2018). *LGALS3*=lectin, galectin-binding, soluble 3. Gal-3=galectina-3. *LGALS3* rs4652: A=alelo de referência; C=alelo variante. (a) ANOVA com pós-teste de Tukey; (b) Mann-Whitney; C/C + A/C = modelo dominante; Outliers identificados por círculos pretos acima das barras do gráfico; N=77. *= $p<0,05$ **= $p<0,005$

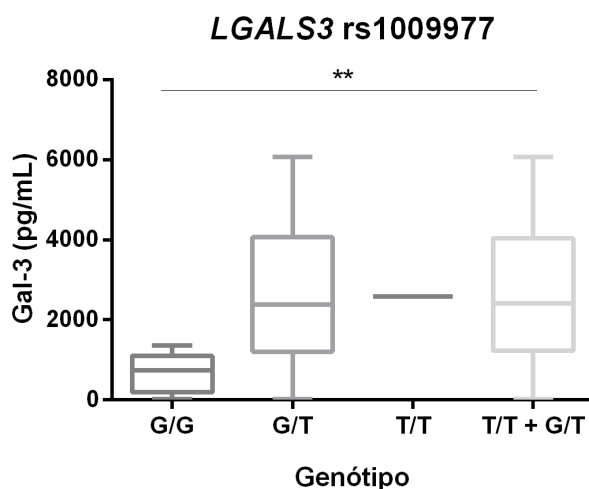
Por conseguinte, os resultados do polimorfismo *LGALS3* rs1009977 foram avaliados. Deste modo, foi constatado que no grupo de pacientes não houve alteração estatisticamente significativa para os genótipos do *LGALS3* rs1009977 ($p=0,9968$) bem como para o modelo dominante em relação ao genótipo selvagem ($p=0,9879$) (Figura 11). Considerando o grupo controle, embora não houve diferença estatística entre os genótipos, o modelo dominante apresentou um aumento significativo da Gal-3 em relação ao genótipo selvagem ($p=0,0115$) (Figura 12).

Figura 11 - Comparação entre o nível sérico da galectina-3 e os genótipos do polimorfismo *LGALS3* rs1009977 em pacientes com esclerose sistêmica.



Fonte: O Autor (2018). N=52; *LGALS3*=lectin, galectin-binding, soluble 3. *LGALS3* rs1009977: G=alelo de referência; T=alelo variante; T/T + G/T = modelo dominante.

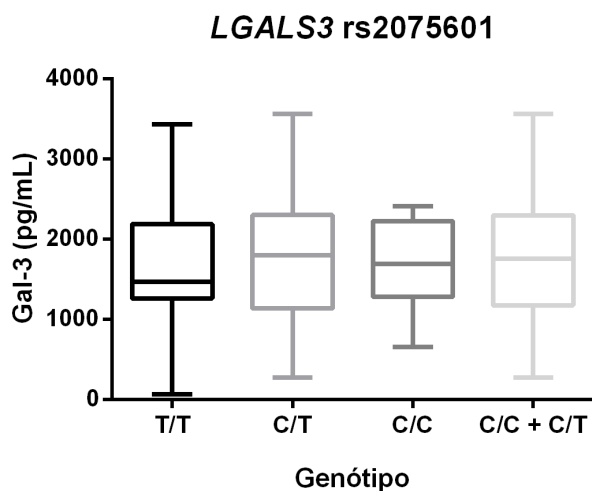
Figura 12 - Comparação entre o nível sérico da galectina-3 e os genótipos do polimorfismo *LGALS3* rs1009977 no grupo controle.



Fonte: O Autor (2018). N=69; *LGALS3*=lectin, galectin-binding, soluble 3. *LGALS3* rs1009977: G=alelo de referência; T=alelo variante; T/T + G/T = modelo dominante. **= $p < 0,005$

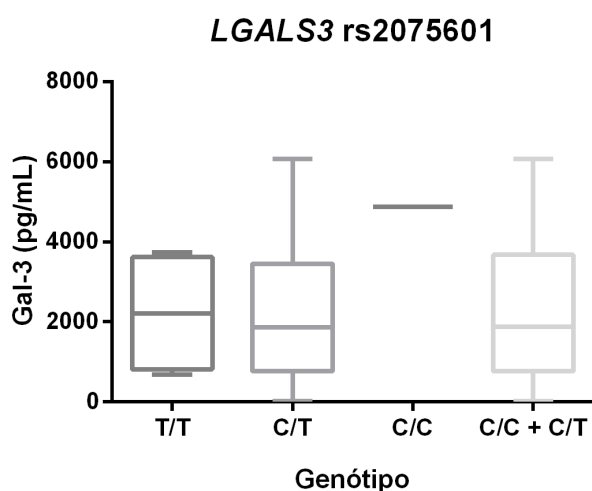
Considerando o polimorfismo *LGALS3* rs2075601, não foram observadas diferenças estatisticamente significante entre os genótipos do grupo de pacientes ($p=0,9611$) e também entre o modelo dominante frente ao genótipo selvagem ($p=0,6648$) (Figura 13). Do mesmo modo, os resultados obtidos no grupo controle não apresentaram significância estatística entre os genótipos ($p > 0,05$) e o modelo dominante ($p=0,9431$) (Figura 14).

Figura 13 - Comparação entre o nível sérico da galectina-3 e os genótipos do polimorfismo *LGALS3* rs2075601 em pacientes com esclerose sistêmica.



Fonte: O Autor (2018). N=81; *LGALS3*=lectin, galectin-binding, soluble 3. *LGALS3* rs2075601: T=alelo de referência; C=alelo variante; C/C + C/T = modelo dominante.

Figura 14 - Comparação entre o nível sérico da galectina-3 e os genótipos do polimorfismo *LGALS3* rs2075601 no grupo controle.

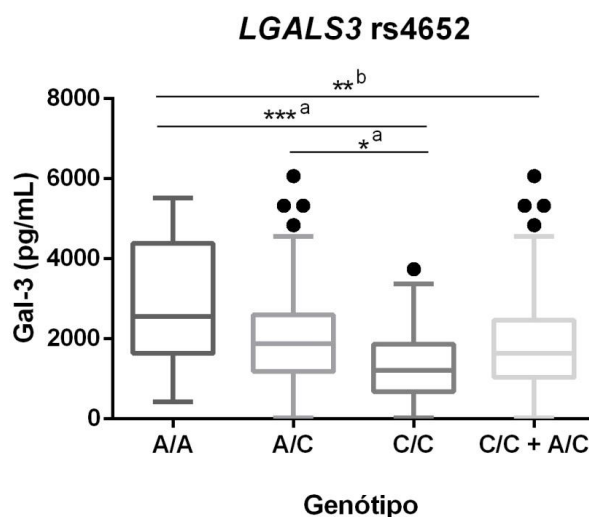


Fonte: O Autor (2018). N=81; *LGALS3*=lectin, galectin-binding, soluble 3. *LGALS3* rs2075601: T=alelo de referência; C=alelo variante; C/C + C/T = modelo dominante.

Ao agrupar as concentrações de Gal-3 séricas por genótipo, incluindo o grupo de pacientes e de controles, observou-se que proteína também estava em menores níveis séricos na população geral nos indivíduos com o genótipo polimórfico frente ao heterozigoto e homozigoto selvagem. O modelo dominante também apresentou menores níveis da Gal-3 quando comparado com o genótipo de referência A/A ($p=0,0058$) (Figura 15). Semelhantemente, ao analisar a população geral para o

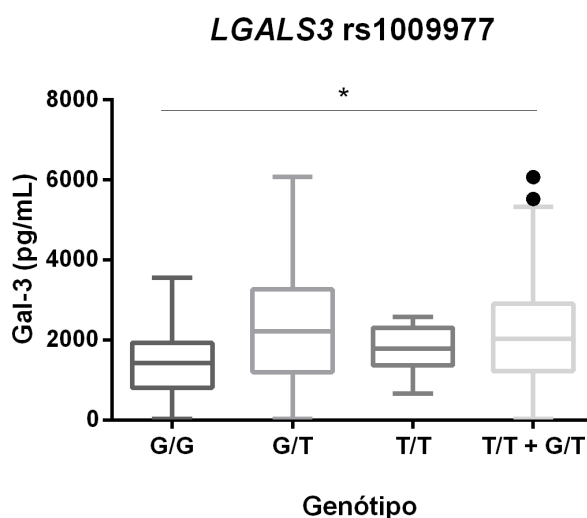
LGALS3 rs1009977 foi constatado que o modelo dominante apresentava maiores níveis da Gal-3 do que o genótipo de referência G/G ($p=0,0919$) (Figura 16). Contudo, a análise do *LGALS3* rs2075601 não apresentou significância estatística para a população do estudo ($p=0,9397$) (Figura 17).

Figura 15 - Comparação entre o nível sérico da galectina-3 e os genótipos do polimorfismo *LGALS3* rs4652 na população.



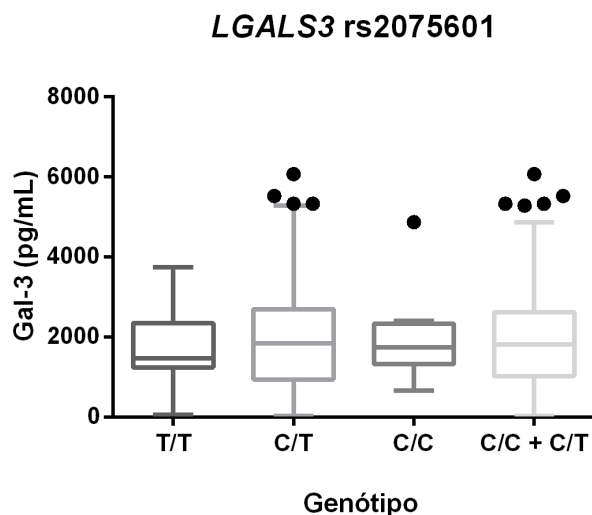
Fonte: O Autor (2018). *LGALS3*=lectin, galectin-binding, soluble 3. Gal-3=galectina-3. *LGALS3* rs4652: A=alelo de referência; C=alelo variante. (a) Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn; (b) Mann-Whitney; Outliers identificados por círculos pretos acima das barras do gráfico; N=136. * $p<0,05$ ** $p<0,005$ *** $p<0,0005$

Figura 16 - Comparação entre o nível sérico da galectina-3 e os genótipos do polimorfismo *LGALS3* rs1009977 na população.



Fonte: O Autor (2018). *LGALS3*=lectin, galectin-binding, soluble 3. *LGALS3* rs1009977: G=alelo de referência; T=alelo variante. G/G + G/T = modelo dominante; Outliers identificados por círculos pretos acima das barras do gráfico; N=121.

Figura 17 - Comparação entre o nível sérico da galectina-3 e os genótipos do polimorfismo *LGALS3* rs2075601 na população.

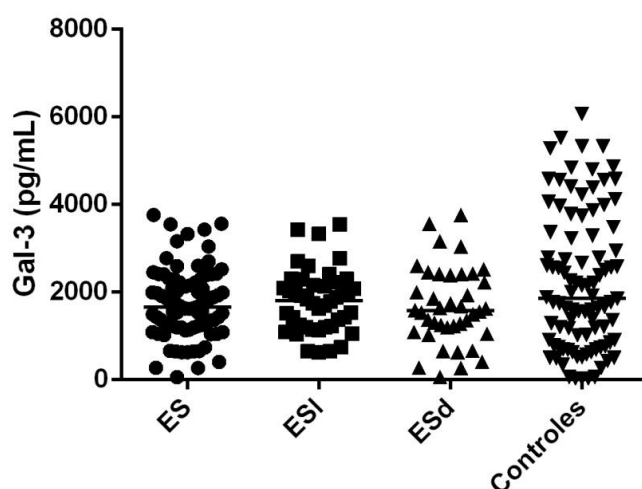


Fonte: O Autor (2018). *LGALS3*=lectin, galectin-binding, soluble 3. *LGALS3* rs2075601: T=alelo de referência; C=alelo variante. C/C + C/T = modelo dominante; Outliers identificados por círculos pretos acima das barras do gráfico; N=162.

4.5 NÍVEIS SÉRICOS DE GAL-3 E ASSOCIAÇÃO COM DADOS CLÍNICOS DE PACIENTES COM ESCLEROSE SISTÊMICA

Ao investigar os níveis de Gal-3 no soro, não foram encontradas diferenças significantes entre os grupos de pacientes ES [1659,0pg/mL (62,5- 3766,0)], ESd [1575,0pg/mL (62,5-3766,0)], ESI [1811,0pg/mL (632,0-3551,0)], e o grupo controle [1866,0pg/mL (31,25-6071,0)] (Figura 18).

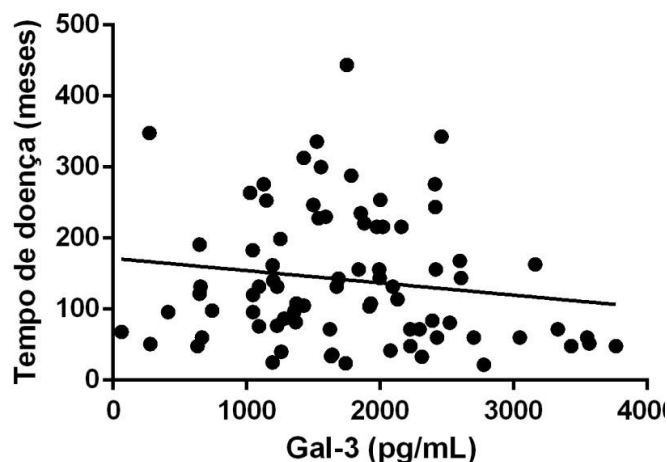
Figura 18 - Comparação dos níveis séricos da galectina-3 nos grupos de pacientes e controles sadios.



Fonte: O Autor (2018). ES=Esclerose sistêmica; ESd=Esclerose sistêmica cutânea difusa; ESI=Esclerose sistêmica cutânea limitada. O gráfico contém 88 amostras de soro de pacientes (40 ESd e 44 ESI) e 94 controles. $p > 0,05$.

Depois de aplicado o teste de correlação entre os níveis de Gal-3 e o tempo de doença, não foi encontrada significância estatística, embora o resultado tenha apresentado uma tendência à diminuição da Gal-3 com progredir da doença [$r = -0,1444$ (-0,3575 a 0,08292; IC 95%) $p = 0,1983$] (Figura 19).

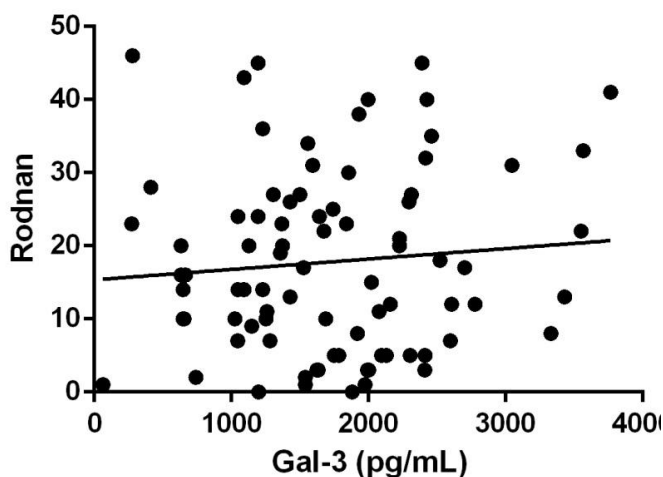
Figura 19 - Correlação entre o tempo de doença e os níveis séricos da galectina-3 em pacientes com esclerose sistêmica.



Fonte: O Autor (2018). N=81; $p>0,05$.

Em continuidade, não foi encontrada uma correlação entre os níveis séricos de Gal-3 e a extensão do comprometimento cutâneo avaliada através do escore de Rodnan [$r=0,0521$ (-0,1718 a 0,2709; IC 95%); $p=0,6400$] (Figura 20).

Figura 20 - Correlação entre o escore de Rodnan e os níveis séricos da galectina-3 em pacientes com esclerose sistêmica.



Fonte: O Autor (2018). N=83; $p>0,05$.

Diante da possibilidade da Gal-3 estar associada às manifestações clínicas importantes da doença, foram realizadas comparações entre seus níveis séricos da Gal-3 entre os pacientes que exibiam ou não acometimentos clínicos como FRy,

ulceras digitais, DPI, HAP, artrite, envolvimento muscular (miopatia), disfunção esofageana, crise renal, calcinose e telangiectasia. Após as análises, não foi encontrada significância estatística entre os grupos analisados (Tabela 5).

Tabela 5 - Comparação entre os níveis séricos da galectina-3 e as manifestações clínicas em pacientes com esclerose sistêmica.

Manifestação clínica	Status	Mediana (Mín – Máx) pg/mL	p-valor
FRy	+	1659,0 (62,50 – 3766,0)	0,9836
	-	1631,0 (665,3 – 2597,0)	
Úlceras digitais	+	1512,0 (272,0 – 3766,0)	0,2460
	-	1860,0 (62,50 – 3566,0)	
Telangiectasia	+	1811,0 (62,50 – 3766,0)	0,5457
	-	1637,0 (272,0 – 3431,0)	
Calcinose	+	1751,0 (412,0 – 2416,0)	0,7454
	-	1675,0 (62,50 – 3766,0)	
DPI	+	1642,0 (62,50 – 3566,0)	0,9682
	-	1784,0 (412,0 – 3766,0)	
HAP	+	1855,0 (1026,0 – 3431,0)	0,2607
	-	1632,0 (62,50 – 3766,0)	
Artrite	+	1384,0 (412,0 – 3046,0)	0,7421
	-	1682,0 (62,50 – 3766,0)	
Envolvimento muscular	+	1938,0 (278,7 – 2701,0)	0,8772
	-	1637,0 (62,50 – 3766,0)	
Disfunção esofageana	+	1689,0 (62,50 – 3766,0)	0,7439
	-	1484,0 (1195,0 – 3331,0)	
Crise Renal	+	278,7	-
	-	1675,0 (62,50 – 3766,0)	

Fonte: O Autor (2018). N=84. FRy=fenômeno de Raynaud; DPI=doença pulmonar intersticial; HAP=hipertensão arterial pulmonar.

Além das análises levando em consideração os níveis séricos da Gal-3 e as manifestações da doença, foram realizadas comparações intragrupo dos níveis de Gal-3 dos pacientes que faziam uso de algum medicamento específico para a doença. A tabela 6 reúne os resultados dessas análises, nas quais nenhuma delas apresentou resultado estatisticamente significante, com exceção dos

glicocorticoides, uma vez que os níveis séricos de Gal-3 foram maiores nos pacientes que usavam essa medicação ($p=0,0331$).

Tabela 6 - Comparação dos níveis séricos da galectina-3 frente aos medicamentos administrados aos pacientes com esclerose sistêmica.

Tratamento	Status	Mediana (Mín – Máx) pg/mL	p-valor
BCC	+	1565,0 (62,50 – 3566,0)	0,5395
	-	1847,0 (278,7 – 3766,0)	
IECA	+	1917,0 (278,7 – 3566,0)	0,6275
	-	1659,0 (62,50 – 3766,0)	
BRA	+	1929,0 (272,0 – 3431,0)	0,7437
	-	1628,0 (62,50 – 3766,0)	
AAS	+	1372,0 (62,50 – 3566,0)	0,0570
	-	1882,0 (412,0 – 3766,0)	
Pentoxifilina	+	1357,0	-
	-	1675,0 (62,50 – 3766,0)	
Sildenafil	+	1393,0 (1026,0 – 3331,0)	0,6855
	-	1682,0 (62,50 – 3766,0)	
Bosentana	+	1772,0 (272,0 – 2521,0)	0,8889
	-	1637,0 (62,50 – 3766,0)	
Glicocorticoide	+	1992,0 (278,7 – 3766,0)	0,0331
	-	1626,0 (62,50 – 3566,0)	
Metotrexato	+	1931,0 (412,0 – 3766,0)	0,5146
	-	1642,0 (62,50 – 3566,0)	
Azatriopina	+	1539,0 (62,50 – 3566,0)	0,2477
	-	1741,0 (272,0 – 3766,0)	
Micofenolato de mofenila	+	1689,0 (1372,0 – 3331,0)	0,5104
	-	1642,0 (62,50 – 3766,0)	
Ciclofosfamida	+	1809,0 (648,7 – 2391,0)	0,9958
	-	1654,0 (62,50 – 3766,0)	

Fonte: O Autor (2018). N=84. BCC=bloqueador de canal de cálcio; IECA=inibidor da enzima conversora de angiotensina; BRA=bloqueador do receptor da angiotensina; AAS=ácido acetilsalicílico.

5 DISCUSSÃO

A ES é uma doença rara e com altas taxas de morbidade e mortalidade, chegando a ser uma das doenças reumatológicas mais letais (HO et al., 2014). Seu caráter complexo é evidenciado na relevância da carga genética dos indivíduos acometidos pela doença, podendo conferir susceptibilidade à doença ou a manifestações clínicas específicas. Os SNPs, por sua vez podem ser importantes o suficiente para causar um dano maior nos indivíduos que carregam o alelo polimórfico. Objetivando analisar a possível influência de SNPs na população amostral, um estudo de associação caso-controle com os SNPs rs4652 (+292), rs1009977 e rs2075601 do gene *LGALS3* foi realizado com amostras de pacientes com ES, que até o momento não haviam sido avaliados. Estes SNPs foram selecionados levando em consideração os valores de corte globalmente aceitos.

Dos três SNPs genotipados, o *LGALS3* rs4652 está localizado no éxon 3, o *LGALS3* rs1009977 no íntron 2 e o *LGALS3* no íntron. Exceto o *LGALS3* rs2075601, os demais polimorfismos que foram objetos desse estudo possuem trabalhos publicados em diferentes populações.

Em nossa população, as frequências genótípicas e alélicas do *LGALS3* rs4652 não apresentaram valores de associação com risco ou proteção à doença. Na população de Taiwan, Hu et al. (2011) encontraram maior frequência do alelo polimórfico (C), bem como associação deste alelo a maior risco à doença em pacientes portadores de AR. Atabaki et al. (2017) revelaram que o genótipo A/C do *LGALS3* rs4652 conferia susceptibilidade à AR na população iraniana, apresentando frequência genotípica de 94,2% para o genótipo heterozigoto e 0,8% para o genótipo mutante (C/C). Em pacientes com anemia falciforme, o genótipo polimórfico (C/C) se apresentou numa frequência de 29% e o alelo polimórfico 52%. Embora a doença em questão possua mecanismo diferente da ES, é importante observar que as frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo nesse estudo são similares às frequências encontradas no nosso estudo, visto que se trata de uma população residente na mesma região geográfica (DE BELMONT et al., 2016). Em pacientes chineses (Han), o alelo C do *LGALS3* rs4652 pode estar associado com baixa susceptibilidade à cardiomiopatia dilatada (ZHANG et al., 2018). Na população brasileira, o SNP *LGALS3* rs4652 também foi avaliado em pacientes com doença de Chagas, sob a hipótese do potencial pró-fibrótico da Gal-3 e a possibilidade da

influência de polimorfismos no gene *LGALS3*. Nesse contexto, os resultados obtidos mostraram não haver associação com susceptibilidade à doença (CRUZ et al., 2015).

O genótipo heterozigoto (G/T) do SNPs *LGALS3* rs1009977, bem como o modelo dominante (T/T + G/T) apresentou resultados que apontam para uma possível associação com proteção à doença devido a sua baixa *Odds ratio*. Trompet et al. (2012) mostraram que o alelo polimórfico conferia maiores níveis da proteína C-reativa, e que o genótipo polimórfico estava associado com velocidade de processamento, memória imediata e menor atenção, quando investigado função cognitiva em pacientes com idade avançada. Zhang et al. (2018) avaliando a associação do *LGALS3* rs1009977 em pacientes chineses (Han) com cardiomiopatia dilatada observou que o alelo G poderia estar associado à baixa susceptibilidade à doença.

O SNP *LGALS3* rs2075601 também apresentou uma possível associação com proteção à doença para o genótipo heterozigoto (C/T) e o modelo dominante (C/T + C/C). Tais resultados precisam ser corroborados com estudos de associação em outras populações com a doença, visto que não existem dados na literatura científica.

Como regra básica dos estudos de associação caso-controle, os SNPs exônicos não-sinônimos são validados funcionalmente através de estudos na proteína devido à alta probabilidade que o polimorfismo tem de modificar estruturalmente e/ou funcionalmente a proteína final. Contrariamente, SNPs intrônicos mais comumente são avaliados no seu impacto na expressão gênica e transcritos (RNAs). Embora quase sempre os SNPs intrônicos não afetem o funcionamento ou a estrutura de uma proteína, técnicas *in silico* auxiliam na compreensão dos mecanismos pelos quais os íntrons podem influenciar na susceptibilidade ou a manifestações clínicas específicas da doença (SALAZAR; MAYES, 2015). Diversos fatores podem alterar o *splicing*, gerando uma série de consequências nos processos de transcrição e tradução. Por exemplo, um SNP intrônico pode ser responsável por formar um novo sítio de ligação para miRNA, reduzir a eficiência do *splicing*, aumentar ou diminuir a expressão de um determinado transcrito (SEO et al., 2013; WANG; COOPER, 2007).

Por seu papel biológico diversificado, a Gal-3 tem sido descoberta em importantes processos biológicos, sendo implicada em doenças inflamatórias, fibróticas e câncer (RADOSAVLJEVIC et al., 2012; LI; LI; GAO, 2014). Nesses estudos, a Gal-3 participa de mecanismos patológicos tanto em modelos animais, quanto em pacientes, muito embora as vias biológicas ainda não estejam bem elucidadas (DE OLIVEIRA et al., 2015; LI; LI; GAO, 2014).

Após uma vasta busca em diversos bancos de dados, 9 SNPs não-sinônimos apresentaram efeito deletério em 3 bancos de dados diferentes. Entretanto, os SNPs incluídos no nosso trabalho não estavam incluídos naqueles associados com efeitos funcionais deletérios como também não foi encontrado relação com a atividade de miRNAs (KAUR et al., 2017).

O estudo funcional de Hu et al. (2011), envolvendo o SNP *LGALS3* rs4652 em AR, mostrou que o modelo dominante (C/C + A/C) apresentava menores níveis séricos da Gal-3 comparados ao genótipo selvagem (A/A). De Belmont et al. (2016) observaram que o genótipo polimórfico (C/C) do SNP *LGALS3* rs4652 exibia níveis menores da Gal-3 em crianças com anemia falciforme. Nossos resultados também evidenciaram uma baixa concentração sérica da Gal-3 em pacientes com o genótipo C/C comparado com o genótipo selvagem (A/A). Interessantemente, não somente o grupo de pacientes, mas também o de controles apresentou concentrações séricas menores da Gal-3 para o genótipo polimórfico (C/C) e o modelo dominante (C/C + A/C) em relação ao selvagem (A/A). Estes resultados indicam que o genótipo polimórfico (C/C), bem como o modelo dominante (C/C + A/C) na população geral do estudo estava associado com menores níveis séricos da Gal-3, sugerindo que o alelo polimórfico (C) pode estar influenciando os níveis da Gal-3 sérica. O polimorfismo *LGALS3* rs4652 ocorre no éxon 3, região que codifica a cauda N-terminal da Gal-3. Desta maneira, como esta região é importante para a secreção Gal-3 intracitoplasmática o meio extracelular, este polimorfismo pode influenciar na etapa de regulação da secreção da Gal-3, afetando diretamente os níveis séricos da galectina podendo diminuí-los em comparação aos indivíduos com genótipo selvagem (ZHANG et al., 2018). Os resultados obtidos na análise do polimorfismo *LGALS3* rs1009977 com o soro de pacientes e controles não apresentaram valores estatisticamente significantes para os genótipos individualmente, porém o modelo dominante apresentou aumento em relação ao genótipo selvagem tanto no grupo

controle quanto na população geral, ou seja, pacientes e controles juntos. Esse dado sugere que de forma ampla nos indivíduos sadios o alelo polimórfico pode contribuir no aumento da Gal-3 em relação ao grupo de pacientes, resultado oposto ao observado no *LGALS3* rs4652. Nesse caso, motivo permanece incerto, pois o polimorfismo *LGALS3* rs1009977 é intrônico e até o momento não foi encontrado associação com miRNAs ou outras vias que embasem tal modificação relacionado aos níveis séricos da Gal-3.

O *LGALS3* rs2075601 não mostrou estar associados diretamente com o nível sérico da Gal-3 na população estudada.

Até o momento, apenas dois trabalhos avaliaram os níveis da Gal-3 em pacientes com ES e controles saudáveis, exibindo comparações com parâmetros clínicos-laboratoriais dos indivíduos portadores da doença (KOCA et al., 2014; TANIGUCHI et al., 2012). Enquanto Taniguchi et al (2012) recrutaram 58 pacientes japoneses e 19 controles (32,76% do número de pacientes), Koca et al. (2014) utilizaram 37 amostras de pacientes turcos e 28 controles (75,67% do número de pacientes). Uma importante diferença entre estes trabalhos é o fato de Taniguchi et al. (2012) explorar mais os resultados do subgrupo ESd, visto que esta forma clínica estava associada a níveis menores da Gal-3, se comparado aos pacientes com ESI e o grupo controle, bem como havia correlação entre o escore de Rodnan e os níveis séricos de Gal-3 no grupo ESd, resultado não encontrado na população estudada no nosso trabalho. Além disso, os pacientes que haviam recebido tratamento com corticoides ou outros imunossupressores para sintomas clínicos associados à ES antes das suas primeiras visitas ao ambulatório foram excluídos. Por outro lado, Koca et al. (2014) menciona que não houve exclusões de pacientes devido ao uso de quaisquer medicamentos, mas que registrou os pacientes que faziam uso de medicamentos antireumáticos modificadores da doença e corticoides. Tais estudos apresentaram resultados conflitantes, o que evidencia a carência de novos estudos em populações diferentes com tamanhos amostrais mais expressivos.

Quando avaliado os níveis séricos da Gal-3 no grupo e subgrupos de pacientes, bem como em controles saudáveis, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre eles. Taniguchi et al. (2012) mostraram no seu estudo que os controles exibiam níveis maiores de Gal-3 do que os pacientes com a

doença difusa. Estratificando ainda mais o subgrupo ESd por tempo de doença, foi observado que os pacientes com duração de doença inferior a 1 ano possuíam níveis mais baixos de Gal-3 do que os pacientes com mais tempo de doença e os controles saudáveis. Segundo a sua interpretação de Taniguchi et al. (2012), a Gal-3 em níveis reduzidos poderia contribuir na modulação das respostas imunes e início de fibrose de pele.

Em nossos achados, os níveis de Gal-3 parecem estar ligeiramente mais elevados nos controles do que em pacientes, resultado mais aproximado do apresentado por Taniguchi et al. (2012). Koca et al. (2014) mostraram que, contrariamente ao resultado de Taniguchi et al (2012), os níveis de Gal-3 eram menores em controles sadios do que em pacientes e subgrupos (ESi e ESd). Ainda foi observado que, na população estudada, a Gal-3 sérica não estava associada com manifestações clínicas, inclusive úlceras digitais, resultado que também se repetiu nas nossas análises (KOCA et al., 2014). Estes resultados conflitantes podem ter sido influenciados por fatores intrínsecos à população analisada. Um desses fatores poderia ser a presença de polimorfismos, visto que estas populações (japoneses e turcos) podem carregar em seu genoma diferentes polimorfismos que possam estar implicados na concentração sérica da Gal-3. Além disso, nota-se que o trabalho de Taniguchi et al (2012) foi mais restrito nos critérios de inclusão, restringindo os pacientes que faziam uso de corticoides ou outros imunossupressores no tratamento da ES antes das primeiras visitas no ambulatório médico.

Concernente à fibrose, nossos achados exibiram que a Gal-3 não estava correlacionada com o escore de pele de Rodnan, nem com fibrose pulmonar. Estes resultados estão de acordo com Koca et al. (2014), mas estão em contradição com Taniguchi et al. (2012). Vale salientar que, além da diferença entre os tamanhos amostrais dos três trabalhos em pauta, as três populações em questão são distintas e desta forma fatores intrínsecos à população, como variações genéticas, podem interferir nas concentrações séricas da Gal-3. A população de estudo do nosso trabalho submetida à dosagem de Gal-3 contou com 84 pacientes e 94 controles, número proporcionalmente maior que o apresentado por Taniguchi et al (2012) e Koca et al. (2014), exibindo maior robustez e confiabilidade.

Abordando as características clínicas da doença, nossos achados revelaram que os níveis séricos de Gal-3 não estavam relacionados com as principais manifestações clínicas da doença. Estudo prévio demonstrou uma associação da concentração da Gal-3 com úlceras digitais e pressão sistólica ventricular direita (TANIGUCHI et al., 2012), resultado não confirmado no nosso trabalho.

Com relação aos medicamentos utilizados pelos pacientes, foi encontrada diferença estatística significativa entre os grupos positivo e negativo para o uso de glicocorticoides. Neste caso, os glicocorticoides foram prescritos em dose baixa, o que poderia não estar envolvido potentemente com a regulação do pool de citocinas pró-inflamatórias e pró-fibróticas. Maldonado et al. (2011) observaram que a administração de dexametasona, um importante glicocorticoide, revertia os baixos níveis da Gal-3 em ratos submetidos a adrenalectomia. Os resultados encontrados por esses pesquisadores evidenciaram que o glicocorticoide aplicado aumentou a expressão da Gal-3 em células-clara bronquiloares e em macrófagos (MALDONADO et al., 2011). Pesquisas futuras são necessárias para elucidar tais mecanismos em células humanas.

As limitações do trabalho são: haver pouca informação na literatura sobre os SNPs do gene *LGALS3* em ES; devido a pouca quantidade de pacientes, não os dados não estavam em equilíbrio de Hardy-Weiberg; não haver pacientes virgens de tratamento devido à gravidade e complexidade da doença, exigindo tratamento imediato e contínuo dos pacientes.

6 CONCLUSÃO

- A distribuição das frequências alélicas e genóticas do polimorfismo não-sinônimo *LGALS3* rs4652 não apresentou variação estatisticamente significativa, o que sugere que este SNP não possui associação com a doença. Por outro lado, as frequências alélicas e genóticas dos SNPs intrônicos *LGALS3* rs1009977 e rs2075601 apresentaram que os genótipos heterozigotos, bem como o modelo dominante de ambos podem estar associados com proteção à doença;
- Os genótipos dos SNPs *LGALS3* rs4652, rs1009977 e rs2075601 não estavam associados com o escore de pele de Rodnan;
- Os níveis séricos de Gal-3 se apresentaram em valores menores nos pacientes e controles que apresentavam o genótipo polimórfico (C/C) do SNP *LGALS3* rs4652, revelando que este genótipo pode estar diretamente relacionado à secreção da Gal-3. Adicionalmente, em controles o modelo dominante (C/C + A/C) apresentou níveis estatisticamente menores de Gal-3, o que não foi observado no grupo de pacientes. Levando em consideração os diferentes genótipos do *LGALS3* rs1009977 não foi encontrada diferença estatística no grupo de pacientes, contudo, o grupo controle apresentou significativa diminuição da Gal-3 sérica no modelo dominante (T/T + G/T) em relação ao genótipo selvagem. Nenhuma correlação entre os níveis da Gal-3 e o *LGALS3* e rs2075601 foi encontrada;
- Os níveis de Gal-3 no soro não estavam associados com manifestações clínicas importantes na ES. Contudo, os pacientes que faziam uso de glicocorticoides apresentaram níveis maiores de Gal-3 comparados aos que não faziam uso. Finalmente, não foi encontrada diferença nos níveis de Gal-3 entre pacientes e o grupo controle.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, S. K. The genetics of systemic sclerosis. **Discovery medicine**, v. 10, n. 51, p. 134–143, 2010.
- ALLANORE, Y. et al. Systemic sclerosis. **Nature Reviews Disease Primers**, n. April, p. 15002, 2015.
- ALLANORE, Y.; MATUCCI-CERINIC, M.; DISTLER, O. Treatment of systemic sclerosis: is there any hope for the future? **RMD open**, v. 2, n. 2, p. e000260, 2016. <http://doi.org/10.1136/rmdopen-2016-000260>
- ALMEIDA, I. et al. Systemic sclerosis refractory disease: From the skin to the heart. **Autoimmunity Reviews**, v. 10, n. 11, p. 693–701, 2011.
- AMIN, H. Z.; AMIN, L. Z.; WIJAYA, I. P. Galectin-3: a novel biomarker for the prognosis of heart failure. **Clujul Medical**, v. 90, n. 2, p. 129-132, 2017.
- ANDRADE, L. E. C.; LESER, P. G. Auto-anticorpos na esclerose sistêmica. **Rev Bras Reumatol**. v. 44, p. 215-223, 2004.
- ARNSON, Y. et al. The role of infections in the immunopathogenesis of systemic sclerosis-evidence from serological studies. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1173, p. 627–632, 2009.
- ATABAKI, M. et al. Lectin, galactoside-binding, soluble, 3 rs4652 A/C gene variation and the risk for rheumatoid arthritis. **Biomedical Reports**, v. 6, n. 2, p. 251–255, 2017.
- BALANESCU, P. et al. IL-17, IL-6 and IFN-gamma in Systemic Sclerosis Patients. **Romanian journal of internal medicine = Revue roumaine de medecine interne**, v. 53, n. 1, p. 44–49, 2015.
- BARAUT, J. et al. Relationship between cytokine profiles and clinical outcomes in patients with systemic sclerosis. **Autoimmunity Reviews**, v. 10, n. 2, p. 65-73, 2010.
- BARAUT, J. et al. [Cytokines in systemic sclerosis]. **Pathologie-biologie**, v. 60, n. 2, p. 127–139, 2012.
- BARNES, J.; MAYES, M. D. Epidemiology of systemic sclerosis: incidence, prevalence, survival, risk factors, malignancy, and environmental triggers. **Current opinion in rheumatology**, v. 24, n. 2, p. 165–170, 2012.
- BARON, M. Special Issue on Rheumatology Targeted Therapy in Systemic Sclerosis. n. 4, p. 1–6, 2016.
- BARONDES, S. H. et al. Galectins: A family of animal beta-galactoside-binding lectins. **Cell**. v. 76, n. 4, p. 597-598, 1994. [http://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90498-7](http://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90498-7)

BHATTACHARYYA, S.; WEI, J.; VARGA, J. Understanding fibrosis in systemic sclerosis: shifting paradigms, emerging opportunities. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 8, n. 1, p. 42–54, 2011.

BOSE, N.; CHIESA-VOTTERO, A.; CHATTERJEE, S. Scleroderma renal crisis. **Semin Arthritis Rheum**, v. 44, n. 6, p. 687-694, 2015.

BOSSINI-CASTILLO, L. et al. A multicenter study confirms CD226 gene association with systemic sclerosis-related pulmonary fibrosis. **Arthritis Research & Therapy**, v. 14, n. 2, p. R85, 2012.

BOSSINI-CASTILLO, L. et al. Genetics of systemic sclerosis. **Seminars in Immunopathology**, v. 37, n. 5, p. 443–451, 2015.

BOSSINI-CASTILLO, L.; LÓPEZ-ISAC, E.; MARTÍN, J. Immunogenetics of systemic sclerosis: Defining heritability, functional variants and shared-autoimmunity pathways. **Journal of Autoimmunity**, v. 64, p. 53–65, 2015.

BREMBILLA, N. C. et al. Th17 cells favor inflammatory responses while inhibiting type I collagen deposition by dermal fibroblasts: differential effects in healthy and systemic sclerosis fibroblasts. **Arthritis Res Ther**, v. 15, n. 5, p. R151, 2013.

BROEN, J. C. A.; COENEN, M. J. H.; RADSTAKE, T. R. D. J. Deciphering the genetic background of systemic sclerosis. **Expert review of clinical immunology**, v. 7, n. 4, p. 449–462, 2011.

CASTELINO F. V.; VARGA, J. Current status of systemic sclerosis biomarkers : applications for diagnosis, management and drug development. **Expert Review of Clinical Immunology**, v. 9, n. 11, p. 1077-1090, 2013.

CASTRO, S. V.; JIMENEZ A. S. Biomarkers in systemic sclerosis. **Biomarkers in Medicine**, v. 4, n. 1, p. 133-147, 2010.

CECCARELLI, F.; AGMON-LEVIN, N.; PERRICONE, C. Genetic Factors of Autoimmune Diseases. **Journal of Immunology Research**, v. 2016, p. 2–3, 2016.
CHIZZOLINI, C.; BOIN, F. The role of the acquired immune response in systemic sclerosis. **Seminars in Immunopathology**, v. 37, n. 5, p. 519–528, 2015.

CHIZZOLINI, C. et al. Fibrosis and immune dysregulation in systemic sclerosis. **Autoimmun Rev**, v. 10, n. 5, p. 276-281, 2011.

CHIZZOLINI, C. et al. Polarized subsets of human T-helper cells induce distinct patterns of chemokine production by normal and systemic sclerosis dermal fibroblasts. **Arthritis research & therapy**, v. 8, n. 1, p. R10, 2006.

CHUNG, A. W. et al. Galectin-3 regulates the innate immune response of human monocytes. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 207, p. 947–956, 2013.

CORNEJO-GARCÍA, J. A. et al. A non-synonymous polymorphism in galectin-3 lectin domain is associated with allergic reactions to beta-lactam antibiotics. **Pharmacogenomics Journal**, v. 16, n. 1, p. 79–82, 2016.

CRUZ, G. DA S. et al. Assessment of Galectin-3 Polymorphism in Subjects with Chronic Chagas Disease. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, n. 105, v. 5, p. 472–478, 2015.

DAGHER, S. F.; WANG, J. L.; PATTERSON, R. J. Identification of galectin-3 as a factor in pre-mRNA splicing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 4, p. 1213–1217, 1995.

DANTAS, A. T. et al. Interferons and systemic sclerosis: correlation between interferon gamma and interferon-lambda 1 (IL-29). **Autoimmunity**, v. 48, n. 7, p. 429–433, 2015.

DE BELMONT, T. F. M. et al. Single nucleotide polymorphisms at +191 and +292 of galectin-3 gene (LGALS3) related to lower GAL-3 serum levels are associated with frequent respiratory tract infection and vaso-occlusive crisis in children with sickle cell Anemia. **PLoS ONE**, v. 11, n. 9, p. 1–13, 2016.

DE BOER, R. A. et al. A Genome-Wide Association Study of Circulating Galectin-3. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. e47385, 2012. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0047385>

DE MARTINIS, M. et al. An overview of environmental risk factors in systemic sclerosis. **Expert Review of Clinical Immunology**, v. 12, n. 4, p. 465–478, 2016.

DE OLIVEIRA, F. L. et al. Galectin-3 in autoimmunity and autoimmune diseases. **Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)**, n. 240, n. 8, p. 1019–28, 2015. <http://doi.org/10.1177/1535370215593826>.

DENTON, C. P. et al. Renal complications and scleroderma renal crisis. **Rheumatology (Oxford)**, v. 48, Suppl 3, p. 32–35, 2009.

DENTON, C. P. Systemic sclerosis: From pathogenesis to targeted therapy. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 33, n. 4, p. 3–7, 2015.

DENTON, C. P.; KHANNA, D. Systemic sclerosis. **The Lancet**, v. 390, n. 10103, p. 1685–1699, 2017.

DIOT, E. et al. Systemic sclerosis and occupational risk factors: a case-control study. **Occupational and environmental medicine**, v. 59, n. 8, p. 545–549, 2002.

DOSPINESCU, P.; JONES, G. T.; BASU, N. Environmental risk factors in systemic sclerosis. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 25, n. 2, p. 179–183, 2013.

DOWSON, C. et al. Innate Immunity in Systemic Sclerosis. **Current Rheumatology Reports**, v. 19, n. 1, p. 2, 2017.

DUMIC, J.; DABELIC, S. & FLÖGEL, M. Galectin-3: An open-ended story. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1760, n. 4, p. 616-635, 2006. <http://doi.org/10.1016/j.bbagen.2005.12.020>

DUMOITIER, N. et al. Scleroderma Peripheral B Lymphocytes Secrete Interleukin-6 and Transforming Growth Factor β and Activate Fibroblasts. **Arthritis and Rheumatology**, v. 69, n. 5, p. 1078–1089, 2017.

ELHAI, M. et al. A gender gap in primary and secondary heart dysfunctions in systemic sclerosis: a EUSTAR prospective study. **Annals of the Rheumatic Diseases**, p. 1–7, 2014.

FLAVAHAN, N. A. et al. The vasculopathy of Raynaud's phenomenon and scleroderma. **Rheum Dis Clin North Am**, v. 29, n. 2, p. 275-91, 2003.

FORBES, A.; MARIE, I. Gastrointestinal complications: the most frequent internal complications of systemic sclerosis. **Rheumatology (Oxford)**, v. 48 Suppl 3, p. 36-39, 2009.

FORSMAN, H. et al. Galectin 3 aggravates joint inflammation and destruction in antigen-induced arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 63, n. 2, p. 445–454, 2011.

FUKUMORI, T. et al. Endogenous galectin-3 determines the routing of CD95 apoptotic signaling pathways. **Cancer Research**, v. 64, n. 10, p. 3376–3379, 2004.

FURST, D. E. et al. The modified Rodnan skin score is an accurate reflection of skin biopsy thickness in systemic sclerosis. **J Rheumatol**, v. 25, n. 1, p. 84-88, 1998.

GABRIELLI, A.; AVVEDIMENTO, E. V. & KRIEG, T. Scleroderma. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 19, p. 1989–2003, 2009. <http://doi.org/10.1056/NEJMr0806188>

GEYER, M.; MÜLLER-LADNER, U. The pathogenesis of systemic sclerosis revisited. **Clinical reviews in allergy & immunology**, v. 40, n. January 2010, p. 92–103, 2011.

GIZINSKI, A. M.; FOX, D. A. T cell subsets and their role in the pathogenesis of rheumatic disease. **Current opinion in rheumatology**, v. 26, n. 2, p. 204–210, 2014.

GORLOVA, O. et al. Identification of Novel Genetic Markers Associated with Clinical Phenotypes of Systemic Sclerosis through a Genome-Wide Association Strategy. **PLoS Genetics**, v. 7, n. 7, p. e1002178, 2011. <http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002178>

GU, Y. S. et al. The Immunobiology of Systemic Sclerosis. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 38, n. 2, p. 132–160, 2008.

GUPTA, G. S. Animal lectins: form, function and clinical applications. **Springer-Verlag, Wien**, 2012.

HACHULLA, E.; LAUNAY, D. Diagnosis and classification of systemic sclerosis. **Clin Rev Allergy Immunol**, v. 40, n. 2, p. 78-83, 2011.

HENDERSON, N. C. et al. Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 13, p. 5060–5065, 2006.
<http://doi.org/10.1073/pnas.0511167103>

HIRABAYASHI, J. & KASAI, K. The family of metazoan metal-independent beta-galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution. **Glycobiology**, v. 3, n. 4, p. 297–304, 1993. Retrieved from
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8400545>

HO, Y. Y. et al. Fibrosis—a lethal component of systemic sclerosis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 10, n. 7, p. 390–402, 2014.

HORIMOTO, A. M. C. et al. Incidência e prevalência de esclerose sistêmica em Campo Grande, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 57, n. 2, p. 107–114, 2016.

HSU, D. K. et al. Analysis of the intracellular role of galectins in cell growth and apoptosis. **Methods in Molecular Biology**, v. 1207, p. 451–463, 2015.

HSU, D. K.; CHEN, H. Y.; LIU, F. T. Galectin-3 regulates T-cell functions. **Immunological Reviews**, n. 230, n. 1, p. 114-127, 2009.

HU, C. Y. et al. Galectin-3 gene (LGALS3) +292C allele is a genetic predisposition factor for rheumatoid arthritis in Taiwan. **Clinical Rheumatology**, v. 30, n. 9, p. 1227–1233, 2011. <http://doi.org/10.1007/s10067-011-1741-2>

HU, Y. et al. Galectin-3: A key player in arthritis. **Joint Bone Spine**, v. 84, n. 1, p. 15-20, 2017.

HUDSON, M.; FRITZLER, M. J. Diagnostic criteria of systemic sclerosis. **Journal of Autoimmunity**, v. 48–49, p. 38–41, 2014.

JEON, S.-B. et al. Galectin-3 Exerts Cytokine-Like Regulatory Actions through the JAK-STAT Pathway. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 11, p. 7037–7046, 2010.

JIANG, J. X. et al. Galectin-3 modulates phagocytosis-induced stellate cell activation and liver fibrosis in vivo. **AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 302, n. 4, p. G439–G446, 2012.

JIN, J. et al. Systemic Sclerosis is a Complex Disease Associated Mainly with Immune Regulatory and Inflammatory Genes. **The open rheumatology journal**, v. 8, p. 29–42, 2014.

KANG, E. H. et al. Renal expression of galectin-3 in systemic lupus erythematosus patients with nephritis. **Lupus**, v. 18, n. 1, p. 22–28, 2009.

KARLSSON, A. et al. Galectin-3 functions as an opsonin and enhances the macrophage clearance of apoptotic neutrophils. **Glycobiology**, v. 19, n. 1, p. 16–20, 2009

KAYSER, C.; FRITZLER, M. J. Autoantibodies in systemic sclerosis: Unanswered questions. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. Mar, p. 2–7, 2015.

KENDALL, R. T.; FEGHALI-BOSTWICK, C. A. Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5, p. 123, 2014.

KOCA, S. S. et al. Serum galectin-3 level in systemic sclerosis. **Clinical Rheumatology**, v. 33, n. 2, p. 215–220, 2014. <http://doi.org/10.1007/s10067-013-2346-8>

KOEL, M. et al. Optimizing bone morphogenic protein 4-mediated human embryonic stem cell differentiation into trophoblast-like cells using fibroblast growth factor 2 and transforming growth factor- β /activin/nodal signalling inhibition. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 35, n. 3, p. 253–263, 2017.

KRIEG, T.; TAKEHARA, K. Skin disease: a cardinal feature of systemic sclerosis. **Rheumatology (Oxford)**, v. 48, Suppl 3, p.14-18, 2009.

KRZEŚLAK, A.; LIPÍŃSKA, A. Galectin-3 as a multifunctional protein. **Cellular & molecular biology letters**, v. 9, n. 2, p. 305–328, 2004.

KUMAR, S. et al. Review article: pathogenesis and clinical manifestations of gastrointestinal involvement in systemic sclerosis. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 45, n. 7, p. 883-889, 2017.

LAING, T. J. et al. Racial differences in scleroderma among women in Michigan. **Arthritis and Rheumatism**, v. 40, n. 4, p. 734–742, 1997.

LEROY, E. C. et al. Scleroderma (systemic sclerosis): Classification, subsets and pathogenesis. **Journal of Rheumatology**, v. 15, n. 2, p. 202–205, 1988.

LI, L.; LI, J. & Gao, J. Functions of galectin-3 and its role in fibrotic diseases. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 351, n. 2, p. 336–343, 2014. <http://doi.org/10.1124/jpet.114.218370>

LIAKOULI, V. et al. Angiogenic cytokines and growth factors in systemic sclerosis. **Autoimmunity Reviews**, v. 10, n. 10, p. 590-594, 2011.

LIU, F. T.; PATTERSON, R. J.; WANG, J. L. Intracellular functions of galectins. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1572, n.2-3 p. 263-273, 2002.

LIU, F. T.; RABINOVICH, G. A. Galectins: Regulators of acute and chronic inflammation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1153, p. 158-182, 2010.

MACKINNON, A. C. et al. Regulation of transforming growth factor- β 1-driven lung fibrosis by galectin-3. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 185, n. 5, p. 537–546, 2012.

MALDONADO, C. A. et al. Cell-type specific regulation of galectin-3 expression by glucocorticoids in lung Clara cells and macrophages. **Histology and Histopathology**, v. 26, n. 6, p. 747–759, 2011.

MANNO, R.; BOIN, F. Immunotherapy of systemic sclerosis. *Immunotherapy*, v. 2, n. 6, p. 863-78, Nov 2010.

MARIE, I.; GEHANNO, J.-F. Environmental risk factors of systemic sclerosis. **Seminars in Immunopathology**, v. 37, n. 5, p. 463–473, 2015.

MARTINEZ-MARTINEZ, E. et al. Galectin-3 blockade reduces renal fibrosis in two normotensive experimental models of renal damage. **PLoS ONE**, v. 11, n. 11, p. e0166272, 2016. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0166272>

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, E. et al. Galectin-3 blockade inhibits cardiac inflammation and fibrosis in experimental hyperaldosteronism and hypertension. **Hypertension**, v. 66, n. 4, p. 767–775, 2015.

MARVI, U.; CHUNG, L. Digital ischemic loss in systemic sclerosis. **International Journal of Rheumatology**, 2010.

MASI, A. T. et al. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). **Arthritis & Rheumatology**, v. 23, p. 581-590, 1980.

MAYES, M. D. et al. Prevalence, incidence, survival, and disease characteristics of systemic sclerosis in a large US population. **Arthritis and Rheumatism**, v. 48, n. 8, p. 2246–2255, 2003.

MAYES, M. D. et al. Immunochip analysis identifies multiple susceptibility loci for systemic sclerosis. **American Journal of Human Genetics**, v. 94, n. 1, p. 47–61, 2014.

MEDSGER, T. A. Epidemiology of systemic sclerosis. **Clin Dermatol**, v. 12, n. 2, p. 207-216, 1994.

MEHRA, S. et al. Autoantibodies in systemic sclerosis. **Autoimmun Rev**, v. 12, n. 3, p. 340-354, 2013.

MEIER, F. M. et al. Update on the profile of the EUSTAR cohort: an analysis of the EULAR Scleroderma Trials and Research group database. **Ann Rheum Dis**, v. 71, n. 8, p. 1355-1360, 2012.

MORRISROE, K. B.; NIKPOUR, M.; PROUDMAN, S. M. Musculoskeletal Manifestations of Systemic Sclerosis. **Rheum Dis Clin North Am**, v. 41, n. 3, p. 507-518, 2015.

MOUTHON, L. et al. Scleroderma Renal Crisis. **The Journal of Rheumatology**, v. 41, n. 6, p. 1040–1048, 2014.

MURDACA, G. et al. Genetic factors and systemic sclerosis. **Autoimmunity Reviews**, v. 15, n. 5, p. 427–432, 2016.

NAKAHARA, S. et al. Characterization of the nuclear import pathways of galectin-3. **Cancer Research**, v. 66, n. 20, p. 9995–10006, 2006.

NAVARRO, C.; BUSTOS, M. L. [Etiopathogenesis. New concepts]. **Reumatología clínica**, v. 2, Suppl 3, p. S6-9, 2006.

NIKPOUR, M.; BARON, M. Mortality in systemic sclerosis: lessons learned from population-based and observational cohort studies. **Current opinion in rheumatology**, v. 26, p. 131–137, 2014.

NIKPOUR, M. et al. Epidemiology of systemic sclerosis. **Best Pract Res Clin Rheumatol**, v. 24, n. 6, p. 857-869, 2010.

OCHIENG, J.; FURTAK, V.; LUKYANOV, P. Extracellular functions of galectin-3. **Glycoconjugate Journal**, v. 19, n. 7-9, p. 527-535, 2002.

PRICCI, F. et al. Role of galectin-3 as a receptor for advanced glycosylation end products. **Kidney International**, v. 58, n. Supplement 77, p. S31–S39, 2000.

RABINOVICH G. A. et al. Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 17, p. 513-520, 2007.

RADOSAVLJEVIC, G. et al. The roles of Galectin-3 in autoimmunity and tumor progression. **Immunologic Research**, v. 52, n. 1–2, p. 100–110, 2012.

RADSTAKE, T. R. D. J. Novel insights in the pathogenesis of systemic sclerosis. **Expert review of clinical immunology**, v. 7, n. 4, p. 389–390, 2011.

RAJA, J.; DENTON, C. Emerging evidence-based therapies for systemic sclerosis. **Indian Journal of Rheumatology**, v. 11, n. 3, p. 31, 2016.

RAMOS, P. S.; SILVER, R. M.; FEGHALI-BOSTWICK, C. A. Genetics of systemic sclerosis: recent advances. **Current opinion in rheumatology**, v. 27, n. 6, p. 521–529, 2015.

RANQUE, B.; MOUTHON, L. Geoepidemiology of systemic sclerosis. **Autoimmunity Reviews**, v. 9, n. 5, p. A311–A318, 2010.

RECH, T. F. et al. Matrix metalloproteinase gene polymorphisms and susceptibility to systemic sclerosis. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 4, 2016.

SALAZAR, G.; MAYES, M. D. Genetics, Epigenetics, and Genomics of Systemic Sclerosis. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v. 41, n. 3, p. 345-366, 2015.

SAMPAIO-BARROS, P. et al. Recommendations for the management and treatment of systemic sclerosis. *Recomendações sobre diagnóstico e tratamento da esclerose sistêmica. Revista Brasileira De Reumatologia*, v. 53, n. 3, p. 258–275, 2013.

SANO, H. et al. Human Galectin-3 Is a Novel Chemoattractant for Monocytes and Macrophages. *The Journal of Immunology*, v. 165, n. 4, p. 2156–2164, 2000.

SATO, S. et al. Altered B lymphocyte function induces systemic autoimmunity in systemic sclerosis. *Molecular Immunology*, v. 42, n. 7, p. 821–831, 2005.

SATO, S.; HASEGAWA, M.; TAKEHARA, K. Serum levels of interleukin-6 and interleukin-10 correlate with total skin thickness score in patients with systemic sclerosis. *Journal of Dermatological Science*, v. 27, n. 2, p. 140–146, 2001.

SCHNEIDER, D. et al. Trafficking of galectin-3 through endosomal organelles of polarized and non-polarized cells. *European Journal of Cell Biology*, v. 89, n. 11, p. 788–798, 2010.

SEO, S. et al. Functional Analysis of Deep Intronic SNP rs13438494 in Intron 24 of PCLO Gene. *PLoS ONE*, v. 8, n. 10, 2013.

SHI, Z. R. et al. Association of anti-acidic ribosomal protein P0 and anti-galectin 3 antibodies with the development of skin lesions in systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatology*, v. 67, n. 1, p. 193–203, 2015.

SLOBODIN, G.; RIMAR, D. Regulatory T Cells in Systemic Sclerosis: a Comprehensive Review. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, v. 52, n. 2, p. 194–201, 2017.

SPIES, C. M. et al. Glucocorticoids. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, v. 25, n. 6, p. 891–900, 2011.

STEEN, V. et al. Digital ulcers: overt vascular disease in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)*, v. 48, Suppl 3, p. 19-24, 2009.

STEEN, V. D. The Many Faces of Scleroderma. *Rheumatic Disease Clinics of North America*, v. 34, n. 1, p. 1–15, 2008.

STERN, E. P.; DENTON, C. P. The Pathogenesis of Systemic Sclerosis. *Rheumatic diseases clinics of North America*, v. 41, n. 3, p. 367–382, 2015.

STICHERLING, M. Systemic sclerosis - dermatological aspects. Part 1: Pathogenesis, epidemiology, clinical findings. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, v. 10, n. 10, p. 705–716, 2012.

TANIGUCHI, T. et al. Serum levels of galectin-3: Possible association with fibrosis, aberrant angiogenesis, and immune activation in patients with systemic sclerosis. *Journal of Rheumatology*, v. 39, n. 3, p. 539–544, 2012.
<http://doi.org/10.3899/jrheum.110755>

TEJERA SEGURA, B.; FERRAZ-AMARO, I. [Large vessels vasculopathy in systemic sclerosis]. **Med Clin (Barc)**, v. 145, n. 11, p. 488–492, 2015.

TEN OEVER, J. et al. Circulating galectin-3 in infections and non-infectious inflammatory diseases. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 32, n. 12, p. 1605–1610, 2013.

TROMPET, S. et al. Genetic variation in galectin-3 gene associates with cognitive function at old age. **Neurobiology of Aging**, v. 33, n. 9, p. 2232–2232, 2012.

VAN DEN HOOGEN, F. et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: An american college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative. **Arthritis and Rheumatism**, v. 65, n. 11, p. 2737–2747, 2013. <http://doi.org/10.1002/art.38098>

VARGA, J.; ABRAHAM, D. Systemic sclerosis: A prototypic multisystem fibrotic disorder. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 3, p. 557–567, 2007.

VARKI, A. et al. Essentials of Glycobiology. 2nd edition. **Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press**, Part IV, Glycan-binding Proteins, 2009.

VISWANATH, V.; PHISKE, M. M.; GOPALANI, V. V. Systemic sclerosis: current concepts in pathogenesis and therapeutic aspects of dermatological manifestations. **Indian journal of dermatology**, v. 58, n. 4, p. 255–268, 2013.

WANG, G.-S.; COOPER, T. A. Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n. 10, p. 749–761, 2007.

WANG, J. et al. Lack of Association of the CD247 SNP rs2056626 with Systemic Sclerosis in Han Chinese. **The open rheumatology journal**, v. 8, p. 43–45, 2014.

WANG, X. et al. Galectin-3 contributes to vascular fibrosis in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension rat model. **Journal of biochemical and molecular toxicology**, n. October, p. 1–7, 2016.

YANG, R. Y.; RABINOVICH, G. A.; LIU, F. T. Galectins: Structure, function and therapeutic potential. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 10, n. 17, p. 1–24, 2008.

ZHANG, Y. et al. Influence of LGALS3 gene polymorphisms on susceptibility and prognosis of dilated cardiomyopathy in a Northern Han Chinese population. **Gene**, v. 642, p. 293–298, 2018.

ZIMMERMANN, A. F.; PIZZICHINI, M. M. M. Atualização na etiopatogênese da esclerose sistêmica. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 53, n. 6, p. 516–524, 2013.

ZUO, X. XIA et al. Systematic approach to understanding the pathogenesis of systemic sclerosis. **Clinical Genetics**, n. 4, p. 1–7, 2016.

APÊNDICE A – ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA HUMAN IMMUNOLOGY

***LGALS3* Single Nucleotide Polymorphism is related to lower Galectin-3 serum levels in systemic sclerosis patients in a Northeast Brazil population**

Eudes Gustavo Constantino Cunha^{1*}, Kamila de Melo Vilar¹, Anderson Rodrigues de Almeida¹, Michelly Cristiny Pereira¹, Andréa Tavares Dantas², Rafaela Silva Guimarães Gonçalves², Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo¹, Angela Luzia Branco Pinto Duarte², Maira Galdino da Rocha Pitta¹.

¹Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica (NUPIT), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

²Department of Rheumatology, Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

Corresponding author at: Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Jornalista Aníbal Fernandes, 171 - Cidade Universitária, Recife, PE 50730-120, Brazil.

*E-mail address: eudesgccunha@outlook.com

Abstract

Here, we analyzed the polymorphisms of the Galectin-3 (Gal-3) gene (*LGALS3* rs4652, rs1009977, and rs2075601) in patients with systemic sclerosis (SSc). To investigate associations between SNPs of the *LGALS3* gene with risk of SSc and serum levels of Gal-3, a case-control study with 88 patients and 151 matched controls was conducted. Genomic DNA was extracted by the phenol-chloroform technique and genotyped by real-time PCR. Serum samples were dosed by sandwich ELISA. *LGALS3* rs1009977 G/T genotype ($p=0.0047$) and dominant model G/T + T/T ($p=0.0307$), and *LGALS3* rs2075601 C/T genotype ($p=0.0016$) and dominant model C/T + C/C ($p=0.0040$) presented a possible association with disease protection. However, no genetic associations were found between SSc patients and controls to *LGALS3* rs4652. The *LGALS3* rs4652 C/C genotype was associated with lower Gal-3 serum levels in SSc patients ($p=0.0382$) and controls ($p=0.0051$), as well as for the dominant model A/C + C/C in controls ($p=0.0174$). No association was observed between *LGALS3* rs1009977 and rs2075601 polymorphisms and Gal-3 levels. Our results suggest that the *LGALS3* C/C genotype may contribute to lower Gal-3 levels in patients and controls. Furthermore, additional studies are needed to validate the case-control association tests.

Keywords: *Glycobiology. Autoimmunity. Scleroderma. Somatic mutation.*

1. Introduction

Systemic sclerosis (SSc) is an autoimmune disease characterized by exacerbated vascular damage, inflammation, and the high production of extracellular matrix resulting in tissue fibrosis [1]. The fibrotic involvement of skin and internal organs is one of the most striking clinical features of the disease and is clinically important in the disease's subdivision in limited or diffuse SSc, depending on

the extent of injury. The epidemiological picture of the disease is well diversified, with different incidence rates and prevalence varying according to geographical location, as well as high rates of morbidity and mortality [2–7]. The onset of the disease is not understood, but it is believed that a combination of environmental and genetic factors converge for etiopathogenesis. Among the various environmental factors, exposure to organic solvents and silica, as well as infections by Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, and parvovirus B19, are included [8,9]. However, genetic load also has great relevance for susceptibility to SSc with different associated genetic regions [10–13].

Galectins are a group of animal lectins that have affinities for β -galactosides. Galectin-3 (Gal-3) is the only chimera-type galectin that has in its structure a ~130 amino acid carbohydrate recognition domain (CRD) and an N-terminal tail plus proline or glycine residues [14,15]. Gal-3 interacts intra- and extracellularly with its ligands in the form of monomers, oligomers, or galectin-glycoprotein networks on the cell surface [16]. Gal-3 has approximately 30 kDa and is encoded by the gene *LGALS3*, located at position q22.3 of chromosome 14, which has six exons and five introns [17–19]. Important biological functions are indicated for Gal-3 such as regulation of adhesion, activation and cell-cycle processes, and apoptosis [15,20,21], in addition to regulating the splicing of pre-mRNA and mediating signal transduction, as well as other important biological processes including inflammation, angiogenesis, and autoimmune disorders [22–25]. Additionally, Gal-3 acts on the regulation of the activation of myofibroblasts [26] and immune cells, participating in the innate immune response [27–32]. In SSc patients, the serum levels of Gal-3 were published in two studies [33,34]. Taniguchi et al. reported a possible association of serum Gal-3 with inflammation and fibrosis, and found lower levels of Gal-3 in patients than in controls in Japanese individuals [33]. Conversely, in a Turkish population, Koca et al. reported lower levels of Gal-3 in serum controls and found no association of Gal-3 with inflammation or fibrosis [34].

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in Gal-3 were evaluated in inflammatory, autoimmune, and fibrotic disorders including *LGAL3* rs4652 (+292) A>C and rs1009977 G>T [35–38]. The *LGALS3* rs4652 non-synonymous SNP encode an N-terminal tail region in which a histidine-to-proline substitution at residue 98 occurs [36], whereas *LGALS3* rs1009977 is located in intron 2 [38]. Additionally, *LGALS3* rs2075601, situated in intron 4, has no published functional study.

Based on the immunological and fibrotic potential of Gal-3, we hypothesized that there could be a relationship with the disease. In this way, we sought to evaluate the influence of *LGALS3* SNPs in the risk, clinical manifestation, and serum level of Gal-3 in SSc patients.

2. Materials and methods

2.1 Study subjects

The present case-control study was conducted with 88 SSc patients (79 female and 9 male; mean age 48.1 ± 12.7 years) who attended the ambulatory section of the rheumatology department at the Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Pernambuco (HC/UFPE), and 151 healthy controls (135 female and 16 male; mean age 50.5 ± 12.9 years). Samples from 84 patients and 94 controls were used for Gal-3 measurement in serum. The SSc patients were recruited based on the American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism (ACR/EULAR) criteria published in 2013 [39]; 43 were diagnosed with diffuse cutaneous SSc and 45 with limited cutaneous SSc. Epidemiological, clinical, and laboratory data were collected from medical records (Table 1). Following patients' consent, samples of peripheral blood were taken and then stored at -80°C until assayed. Patients with overlapping syndromes were not included. This study was approved by the Research Ethical Committee of the Clinical Hospital of Pernambuco (CAAE: 63611516.6.0000.5208 CCS/UFPE), and the study subjects were included after giving their informed written consent.

2.2 Samples

Peripheral blood samples from patients and healthy control subjects were collected in EDTA-containing and dry tubes for DNA extraction and Gal-3 measurement, respectively. After blood collection, the serum was stored at -80°C until the experiments were conducted.

2.3 DNA extraction

Genomic DNA was extracted from peripheral blood samples by the phenol-chloroform method [40], and concentration and purity evaluations were performed using NanoDrop 1000 (Thermo Scientific®). Until SNP genotyping was performed, all DNA samples were stored at -80°C .

2.4 Single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping

Genotyping was performed in case and control samples by real-time PCR (polymerase chain reaction) using *LGALS3* rs4652 (C__7593636_30), rs1009977 (C__7593626_10), and rs2075601 (C__16166544_10) TaqMan® (Invitrogen/ThermoFisher) probes. The reactions were performed with the StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

2.5 Determination of galectin-3 (Gal-3) serum level

Serum samples were dosed by sandwich ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), following the manufacturer's instructions (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; Cat. number: DY1154 Lot: 333922). Absorbance reading was performed with the Biotek® plate reader (Biotek Instruments Inc.), and an analysis was done using Gen5 software (Biotek®). The lower limit of detection for the Gal-3 ELISA kit was 31.25 pg/mL.

2.6 Statistical analysis

To assess normal distribution, samples were submitted to D'Agostino test. The genotypic and allelic frequencies were calculated by direct counting. Fisher's exact test of probability was performed to compare different frequencies, and a chi-squared test (χ^2) was used to calculate the odds ratio (OR) with 95% confidence interval (CI). Quantitative variables were compared with the Mann–Whitney U test or Kruskal–Wallis test for more than two groups. Spearman's rank correlation coefficient was applied to assess clinical data. Statistical tests were performed using GraphPad Prism, version 6.0 (San Diego, CA, USA). The results were considered significant to $p < 0.05$.

3. Results

Initially, the genotyped samples were submitted to genetic association tests for the three polymorphisms of the *LGALS3* gene studied. When examining the allelic and genotypic frequencies of *LGALS3* rs4652, no significant association was found between case and control individuals. In contrast, *LGALS3* rs1009977 showed a possible association with protection for the heterozygous genotype (G/T) [OR= 0.27 (0.10 – 0.73) IC 95%; $p=0.0047$] and for the dominant model (T/T + G/T) [OR=0.37 (0.14 – 0.98) IC 95%; $p=0.0307$]. The *LGALS3* rs2075601 SNP showed low frequency of polymorphic genotype (C/C) in patient (10.98%) and control (2.4%) groups, as well as possible association with protection for the heterozygote C/T [OR=0.27 [(0.10 – 0.73) IC 95%; $p=0.0016$] and for the dominant model (C/T + C/C) [OR=0.33 (0.14 – 0.74) IC 95%; $p=0.0040$] (Table 2).

We then evaluated the relationship of the different genotypes to serum levels of Gal-3 in groups, SSc patients, and controls. Regarding *LGALS3* rs4652, SSc patients with the homozygous variant (C/C) genotype [1259.0 pg/mL (62.5 - 2776.0); $p=0.0433$] showed lower serum concentrations of Gal-3 than the heterozygous (A/C) [1795.0 pg/mL (412.0 - 3551.0)] and wild-type genotype (A/A) [1929.0 pg/mL (648.7 – 3331.0)] (Figure 1). A decrease in Gal-3 levels in controls with the *LGALS3* rs4652

C/C genotype [851.0 pg/mL (31.25 – 3741.0); $p=0.0156$] was observed, followed by A/C genotype [2211.0 pg/mL (31.25 - 6071.0)], and higher levels of A/A genotype [3481.0 pg/mL (430.7 – 5521.0)]. It was also observed that for *LGALS3* rs4652, the dominant model A/C + C/C ($p=0.0354$) showed lower serum levels of Gal-3 (Figure 2). In addition, for *LGALS3* rs1009977 and rs2075601 polymorphisms, no difference was found between genotypes and serum levels of Gal-3.

Taking into account the Rodnan skin score, no association with the polymorphisms was found. Neither was there any association of the polymorphisms studied with clinical manifestations of the disease (data not shown). In addition, comparing only serum Gal-3 levels to disease manifestations, no statistically significant difference was found (Table 3). Finally, no significant difference was observed in Gal-3 serum levels between the patient and the control groups (data not shown).

4. Discussion

The highlights of this work were the association of the *LGALS3* rs4652 C/C genotype in SSc patients and controls, in addition to the *LGALS3* rs4652 C allele in controls with low serum levels of Gal-3. To date, this is the first report of polymorphisms of *LGALS3* in patients with SSc, especially in the northeast region of Brazil.

The heterozygous genotype *LGALS3* rs1009977 G/T, as well as the dominant model (T/T + G/T), presented results that point to a possible association with disease protection due to its low OR. Trompet et al. [35] showed that the polymorphic allele conferred higher levels of C-reactive protein, and that the polymorphic genotype was associated with processing speed, immediate memory, and less attention when cognitive function was investigated in elderly patients. Zhang et al. [38], evaluating the association of *LGALS3* rs1009977 in Chinese (Han) patients with dilated cardiomyopathy, observed that the G allele could be associated with low susceptibility to the disease.

The *LGALS3* rs2075601 polymorphism also showed a possible association with disease protection for the heterozygous (C/T) genotype and the dominant model (C/T + C/C). These results need to be corroborated with association studies in other populations with the disease, since no data exist in the scientific literature and *in silico* analysis of this polymorphism did not suggest deleterious clinical effects, although our results are not within Hardy–Weinberg equilibrium (HWE).

In our study, no association was found between the genotypic and allelic frequencies of *LGALS3* rs4652 in SSc patients and controls, probably due to the small sample size. In the population of Taiwan, Hu et al. [36] found a higher frequency of mutant allele C and allele association, with the greatest risk of the disease in patients with RA for *LGALS3* rs4652. Atabaki et al. [41] showed that the genotype *LGALS3* rs4652 A/C conferred susceptibility to RA in the Iranian population, presenting a

genotype frequency of 94.2% for the heterozygous genotype and 0.8% for the *LGALS3* rs4652 C/C mutant genotype. In Chinese patients (Han), the *LGALS3* rs4652 C allele might be associated with low susceptibility to dilated cardiomyopathy [38].

Two studies analyzed the frequency of *LGALS3* rs4652 in the population of northeastern Brazil [37,42]. Cruz et al. [37] evaluated this polymorphism in patients with Chagas disease (CD) under the hypothesis of the pro-fibrotic potential of Gal-3 and found no association between *LGALS3* rs4652 and the disease. The second study presented results in patients with sickle cell anemia (SCA), in which *LGALS3* rs4652 was associated with vaso-occlusive crisis frequency, as well as a higher frequency of the dominant model (A/C + C/C) in patients with a frequency of respiratory tract infection ≥ 1 [42].

Recently, Kaur et al. [19] analyzed 610 validated SNPs of the *LGALS3* gene by computational methods. Of these, 38 were non-synonymous and 16 synonymous, adding 54 coding SNPs. The *LGALS3* rs4652 polymorphism presents a putative alteration of phosphorylation. In addition, in regard to *LGALS3* rs4652, rs1009977 and rs2075601 did not present deleterious effects or binding sites for micro-RNAs, according to the databases analyzed [19].

Due to its diversified biological role, Gal-3 has been revealed to be important for a number of biological processes and as has been implicated in inflammatory and fibrotic diseases as well as in cancer [43–45]. In these studies, Gal-3 participates in pathological mechanisms both in animal models and in human patients, although the biological pathways are not yet fully understood [44,45].

Our results also showed a low serum concentration of Gal-3 in patients with the C/C genotype compared to the wild-type A/A genotype. Interestingly, not only the patient group but also the control group had lower serum concentrations of Gal-3 for the polymorphic C/C genotype and the dominant (C/C + A/C) than for the wild type A/A. These results indicate that the polymorphic C/C genotype as well as the dominant model (C/C + A/C) in the general population of the study was associated with lower serum levels of Gal-3, suggesting that the polymorphic allele might be influencing serum Gal-3 levels. The functional study by Hu et al. [36] involving *LGALS3* rs4652 in RA showed that the dominant model (C/C + A/C) had lower serum levels of Gal-3 compared to the wild-type A/A genotype. De Belmont et al. [42] observed that polymorphic *LGALS3* rs4652 C/C genotype exhibited lower levels of Gal-3 in SCA children. Residues 94-101 of the N-terminal tail (YPSAPGAY) of human Gal-3 have been shown to be critical to the secretion of Gal-3 [46]. *LGALS3* rs4652 occurs in exon 3, a region encoding the N-terminal tail of Gal-3, and causes the exchange of a threonine with a proline at position 98; thus, this region is important for Gal-3 secretion to the extracellular medium. Therefore, one hypothesis would be that this polymorphism may influence the regulation of Gal-3 secretion, directly affecting serum levels of galectin [38]. *LGALS3* rs1009977 and rs2075601 were not shown to be directly associated with the serum Gal-3 level in the study population.

In our findings, Gal-3 levels appear to be slightly higher in controls than in SSc patients but did not vary significantly between them or between clinical subgroups of the disease. Taniguchi et al. [33] showed in their study that the control group exhibited higher levels of Gal-3 than SSc patients with diffuse disease. Stratifying the dcSSc subgroup by disease time, it was observed that patients with illness duration of less than 1 year had lower levels of Gal-3 than patients with longer disease duration and healthy controls. This result suggested that Gal-3 could contribute to the modulation of immune responses and the onset of skin fibrosis [33]. On the other hand, Koca et al. [34] showed that Gal-3 levels were lower in healthy controls than in SSc patients, and there was no association between serum Gal-3 and clinical manifestations [34]. Similar to these findings, in our study, serum Gal-3 was not associated with specific clinical manifestations.

Due to the low number of individuals in the research sample and consequent lack of HWE for the samples, these findings require validation in larger case-control studies. In addition, it was not possible to perform haplotype analysis for the polymorphisms studied. Nevertheless, this is the first case-control study to evaluate the influence of *LGALS3* polymorphisms on SSc patients.

Conclusion: In summary, the heterozygous genotypes of the *LGALS3* rs1009977 and rs2075601 polymorphisms showed a possible association with disease protection, which was not repeated for *LGALS3* rs4652. When assessing functionality, no association of SNPs with the Rodnan skin score or clinical manifestations of the disease were found. However, it was observed that serum levels of Gal-3 were lower in patients and controls with *LGALS3* rs4652 SNP polymorphic (C/C) genotype, as well as the dominant model for controls. No correlation between the Gal-3 levels and the *LGALS3* SNPs rs1009977 and rs2075601 was found. In addition, serum Gal-3 did not present a difference between patients and controls; moreover, there was no difference between clinical manifestations.

Acknowledgements

This study was funded by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE).

FIGURES AND TABLES

Table 1 – Characteristics of participants.

Characteristics	SSc patients (n=88)	Controls (n=151)
Age (yrs)		
Mean $\pm$ SD (range)	48.1 $\pm$ 12.7 (20 – 81)*	50.5 $\pm$ 12.9 (22 – 79)*
Gender N (%)		
Female	79 (89.8)*	135 (89.4)*
Disease duration (months)		
Median (range)	111 (19 – 444)	
Clinical subgroups N (%)		
Diffuse cutaneous	43 (48.9)	
Limited cutaneous	45 (51.1)	
Clinical manifestations N (%)		
Raynaud phenomenon	86 (97.7)	
Esophageal dysfunction	76 (86.4)	
Lung involvement	61 (69.3)	
Telangiectasias	55 (62.5)	
Digital ulcer	38 (43.2)	
Muscle involvement	15 (17.1)	
Pulmonary arterial hypertension	13 (14.8)	
Calcinosis	9 (10.2)	
Arthritis	8 (9.0)	
Renal crisis	2 (2.3)	
Rodnan score median (IQR)	16 (7.75-26.25)	
HAQ median (IQR)	1.375 (0.531-1.875)	
SHAQ median (IQR)	1.045 (0.483-1.48)	
Autoantibodies N (%)		
Positive ANA	67/74 (90.5)	
Positive anticentromere	5/40 (12.5)	
Positive Anti-SCI70	23/49 (46.9)	
Treatment N (%)		
CCB	41 (46.6)	
ACEI or ARB	25 (28.4)	
Sildenafil	10 (11.4)	
Bosentan	7 (7.9)	
Glucocorticoids	33 (37.5)	
Immunosuppressive therapy	51 (57.9)	
Azathioprine	28 (31.8)	
Methotrexate	13 (14.8)	
Mycophenolate mofetil	5 (5.7)	
Cyclophosphamide	4 (4.5)	
Rituximab	2 (2.3)	

ACEI=angiotensin converting enzyme inhibitor; ANA= antinuclear antibodies; ARB= angiotensin receptor blocker; CCB= calcium channel blocker; HAQ= health assessment questionnaire; SHAQ= scleroderma health assessment questionnaire; IQR= interquartile range.

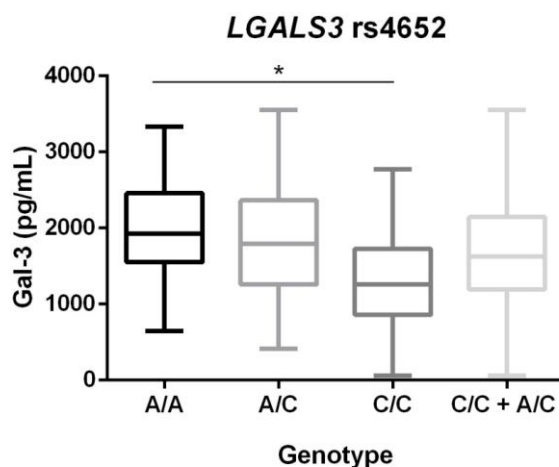
*No statistical differences between these groups.

Table 2 - Genotypic and allelic frequencies of *LGALS3* rs4652, rs4644, rs1009977 and rs2075601 polymorphisms in patients with systemic sclerosis and controls.

<i>SNP</i> <i>LGALS3</i>	SSc	Controls	OR (95%CI)	p-value
rs4652	N=59	N=127		
Genotypes	N (%)	N (%)		
A/A	10 (16.95)	23 (18.11)	Ref.	-
A/C	32 (54.24)	49 (38.58)	1.03 (0.39 – 2.85)	1
C/C	17 (28.81)	55 (43.31)	0.71 (0.26 – 2.02)	0.4794
C/C + A/C	62 (83.05)	134 (81.89)	1.08 (0.45 – 2.75)	1
Alleles				
A	52 (44.07)	95 (37.40)	0.76 (0.47 – 1.21)	0.2546
C	66 (55.93)	159 (62.60)		
rs1009977	N=53	N=123		
Genotypes	N (%)	N (%)		
G/G	12 (22.64)	12 (9.76)	Ref.	-
G/T	27 (50.94)	102 (82.93)	0.27 (0.10 – 0.73)	0.0047
T/T	14 (26.42)	9 (7.32)	1.54 (2.10 – 16.71)	0.5612
T/T + G/T	41 (77.36)	111 (90.25)	0.37 (0.14 – 0.98)	0.0307
Alleles				
G	51 (48.11)	126 (51.22)	1.13 (0.70 – 1.83)	0.6426
T	55 (51.89)	120 (48.78)		
rs2075601	N=82	N=136		
Genotypes	N (%)	N (%)		
T/T	21 (25.61)	14 (10.29)	Ref.	-
C/T	52 (63.41)	118 (86.76)	0.30 (0.13 – 0.66)	0.0016
C/C	9 (10.98)	4 (2.94)	1.49 (0.33 – 7.94)	0.7401
C/C + C/T	61 (74.39)	122 (89.70)	0.33 (0.14 – 0.74)	0.0040
Alleles				
T	94 (57.32)	146 (53.68)	0.86 (0.57 – 1.30)	0.4874
C	70 (42.68)	126 (46.32)		

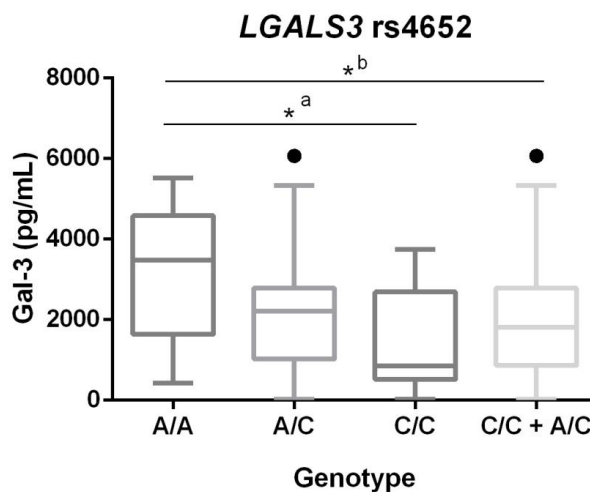
LGALS3 rs4652: A=reference allele; C=variant allele; *LGALS3* rs1009977: G=reference allele; T=variant allele; *LGALS3* rs2075601: T=reference allele; C=variant allele. SSc=systemic sclerosis; CI=confidence interval; Ref.=reference; OR=Odds ratio; SNP=Single Nucleotide Polymorphism; Fisher's exact test.

Figure 1 – Comparison between the serum level of galectin-3 and the *LGALS3* rs4652 polymorphism genotypes in patients with systemic sclerosis.



LGALS=lectin, galectin-binding, soluble 3. *LGALS3* rs4652: A = reference allele; C = variant allele; Kruskal-Wallis with Dunn post-test; C/C + A/C = dominant model; N=59; *p <0.05

Figure 2 – Comparison between the serum level of galectin-3 and the *LGALS3* rs4652 polymorphism genotypes in the control group.



LGALS3= lectin, galectin-binding, soluble 3. *LGALS3* rs4652: A = reference allele; C = variant allele. (a) Kruskal-Wallis with Dunn post-test; (b) Mann-Whitney; C/C + A/C= dominant model; Outliers identified by black circles above the graph bars; N = 77. *p <0.05

Table 3 - Comparison between serum levels of galectin-3 and clinical manifestations in patients with systemic sclerosis.

Clinical manifestations	Status	Median (min – max) pg/mL	p-value
Raynaud's phenomenon	+	1659.0 (62.50 – 3766.0)	0.9836
	-	1631.0 (665.3 – 2597.0)	
Digital ulcer	+	1512.0 (272.0 – 3766.0)	0.2460
	-	1860.0 (62.50 – 3566.0)	
Telangiectasias	+	1811.0 (62.50 – 3766.0)	0.5457
	-	1637.0 (272.0 – 3431.0)	
Calcinosis	+	1751.0 (412.0 – 2416.0)	0.7454
	-	1675.0 (62.50 – 3766.0)	
ILD	+	1642.0 (62.50 – 3566.0)	0.9682
	-	1784.0 (412.0 – 3766.0)	
PAH	+	1855.0 (1026.0 – 3431.0)	0.2607
	-	1632.0 (62.50 – 3766.0)	
Arthritis	+	1384.0 (412.0 – 3046.0)	0.7421
	-	1682.0 (62.50 – 3766.0)	
Muscle involvement	+	1938.0 (278.7 – 2701.0)	0.8772
	-	1637.0 (62.50 – 3766.0)	
Esophageal dysfunction	+	1689.0 (62.50 – 3766.0)	0.7439
	-	1484.0 (1195.0 – 3331.0)	
Renal crisis	+	278.7	-
	-	1675.0 (62.50 – 3766.0)	

ILD=interstitial lung disease; PAH= pulmonary arterial hypertension; N=84

Table 4 - Comparison of serum levels of galectin-3 versus drugs administered to patients with systemic sclerosis.

Treatment	Status	Median (Min – Max) pg/mL	p-value
CCB	+	1565.0 (62.50 – 3566.0)	0.5395
	-	1847.0 (278.7 – 3766.0)	
ACEI	+	1917.0 (278.7 – 3566.0)	0.6275
	-	1659.0 (62.50 – 3766.0)	
ARB	+	1929.0 (272.0 – 3431.0)	0.7437
	-	1628.0 (62.50 – 3766.0)	
ASA	+	1372.0 (62.50 – 3566.0)	0.0570
	-	1882.0 (412.0 – 3766.0)	
Pentoxifilin	+	1357.0	-
	-	1675.0 (62.50 – 3766.0)	
Sildenafil	+	1393.0 (1026.0 – 3331.0)	0.6855
	-	1682.0 (62.50 – 3766.0)	
Bosentan	+	1772.0 (272.0 – 2521.0)	0.8889
	-	1637.0 (62.50 – 3766.0)	
Glucocorticoids	+	1992.0 (278.7 – 3766.0)	0.0331

	-	1626.0 (62.50 – 3566.0)	
Methotrexate	+	1931.0 (412.0 – 3766.0)	0.5146
	-	1642.0 (62.50 – 3566.0)	
Azathioprine	+	1539.0 (62.50 – 3566.0)	0.2477
	-	1741.0 (272.0 – 3766.0)	
Mycophenolate mofetil	+	1689.0 (1372.0 – 3331.0)	0.5104
	-	1642.0 (62.50 – 3766.0)	
Cyclophosphamide	+	1809.0 (648.7 – 2391.0)	0.9958
	-	1654.0 (62.50 – 3766.0)	

ACEI=angiotensin converting enzyme inhibitor; ARB= angiotensin receptor blocker; ASA= acetylsalicylic acid; CCB= calcium channel blocker; N=84.

References

- [1] C.P. Denton, D. Khanna, Systemic sclerosis, *Lancet*. 6736 (2017) 1–15. doi:10.1016/S0140-6736(17)30933-9.
- [2] F.B. Karassa, J.P.A. Ioannidis, Mortality in systemic sclerosis, *Clin. Exp. Rheumatol.* 26 (2008) 131–137. doi:10.1097/BOR.0000000000000027.
- [3] M. Nikpour, M. Baron, Mortality in systemic sclerosis: lessons learned from population-based and observational cohort studies., *Curr. Opin. Rheumatol.* 26 (2014) 131–7. doi:10.1097/BOR.0000000000000027.
- [4] Y.Y. Ho, D. Lagares, A.M. Tager, M. Kapoor, Fibrosis—a lethal component of systemic sclerosis, *Nat. Rev. Rheumatol.* 10 (2014) 390–402. doi:10.1038/nrrheum.2014.53.
- [5] A.M.C. Horimoto, E.N.N. Matos, M.R. da Costa, F. Takahashi, M.C. Rezende, L.B. Kanomata, E.P.P. Locatelli, L.T. Finotti, F.K.M. Maegawa, R.M.R. Rondon, N.P. Machado, T.P.A. de Figueiredo, R.A. Ovidio, I.P. da Costa, Incidência e prevalência de esclerose sistêmica em Campo Grande, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil, *Rev. Bras. Reumatol.* 57 (2016) 107–114. doi:10.1016/j.rbr.2016.05.008.
- [6] M. Elhai, J. Avouac, U. a. Walker, M. Matucci-Cerinic, G. Riemekasten, P. Airo, E. Hachulla, G. Valentini, P.E. Carreira, F. Cozzi, a. Balbir Gurman, Y. Braun-Moscovici, N. Damjanov, L.P. Ananieva, R. Scorza, S. Jimenez, J. Busquets, M. Li, U. Muller-Ladner, a. Kahan, O. Distler, Y. Allanore, S. Guiducci, a. Tyndall, G. Lapadula, F. Iannone, R. Becvar, S. Sierakowsky, O.K. Bielecka, M. Cutolo, a. Sulli, G. Cuomo, S. Vettori, S. Rednic, I. Nicoara, P. Vlachoyiannopoulos, C. Montecucco, R. Caporali, S. Novak, L. Czirjak, C. Varju, C. Chizzolini, E.J. Kucharz, a. Kotulska, M. Kopec-Medrek, M. Widuchowska, B. Rozman, C. Mallia, B. Coleiro, a. Gabrielli, D. Farge, a. Hij, R. Hesselstrand, a. Scheja, F. Wollheim, D. Martinovic, M. Govoni, a. L. Monaco, N. Hunzelmann, R. Pellerito, L.M. Bambara, P. Caramaschi, C. Black, C. Denton, J. Henes, V.O. Santamaria, S. Heitmann, D. Krasowska, M. Seidel, M. Oleszowsky, H. Burkhardt, a. Himsel, M.J. Salvador, B. Stamenkovic, a. Stankovic, M. Tikly, M.N. Starovoytova, M. Engelhart, G. Strauss, H. Nielsen, K. Damgaard, G. Szucs, a. Zea Mendoza, C. de la Puente Buijdos, W. a. Sifuentes Giraldo, O. Midtvedt, T. Garen, D. Launay, G. Valesini, V. Riccieri, R.M. Ionescu, D. Opris, L. Groseanu, F.M. Wigley, C.M. Mihai, R.S. Cornateanu, R. Ionitescu, a. M. Gherghe, M. Gorga, R. Dobrota, M. Bojinca, G. Schett, J.H. Distler, P. Meroni, S. Zeni, L. Mouthon, F.D. Keyser, V. Smith, F.P. Cantatore, a. Corrado, S. Ullman, L. Iversen, M.R. Pozzi, K. Eyerich, R. Hein, E. Knott, J. Szechinski, P. Wiland, M. Szmyrka-Kaczmarek, R. Sokolik, E. Morgiel, B. Krummel-Lorenz, P. Saar, M. Aringer, C. Gunther, B. Anic, M. Baresic, M. Mayer, S.C. Radominski, C.D.S. Muller, V.F. Azevedo, S. Agachi, L. Groppa, L. Chiaburu, E. Russu, T. Zenone, S. Stebbings, J. Highton, L. Stamp, P. Chapman, M. Baron, J. O'Donnell, K. Solanki, a. Doube, D. Veale, M. O'Rourke, E. Loyo, E. Rosato, S. Pisarri, C.-M. Tanaseanu, M. Popescu, a. Dumitrascu, I. Tiglea, R. Chirieac, C. Ancuta, D.E. Furst, S. Kafaja, P.G.D.L.P. Lefebvre, S.R. Rubio, M. V. Exposito, J. Sibilia, E. Chatelus, J.E. Gottenberg, H. Chiffot, I. Litinsky, a. Venalis, I. Butrimiene, P.

- Venalis, R. Ruge, D. Karpec, E. Kerzberg, F. Montoya, V. Cosentino, A gender gap in primary and secondary heart dysfunctions in systemic sclerosis: a EUSTAR prospective study, *Ann. Rheum. Dis.* (2014) 1–7. doi:10.1136/annrheumdis-2014-206386.
- [7] B. Ranque, L. Mouthon, Geoeidemiology of systemic sclerosis, *Autoimmun. Rev.* 9 (2010) A311–A318. doi:10.1016/j.autrev.2009.11.003.
- [8] I. Marie, J.-F. Gehanno, Environmental risk factors of systemic sclerosis, *Semin. Immunopathol.* 37 (2015) 463–473. doi:10.1007/s00281-015-0507-3.
- [9] A.F. Zimmermann, M.M.M. Pizzichini, Update on the etiopathogenesis of systemic sclerosis, *Rev. Bras. Reumatol. (English Ed.)* 53 (2013) 516–524. doi:10.1016/j.rbre.2013.01.001.
- [10] P.S. Ramos, R.M. Silver, C.A. Feghali-Bostwick, Genetics of systemic sclerosis: recent advances., *Curr. Opin. Rheumatol.* 27 (2015) 521–9. doi:10.1097/BOR.0000000000000214.
- [11] G. Murdaca, M. Contatore, R. Gulli, P. Mandich, F. Puppo, Genetic factors and systemic sclerosis, *Autoimmun. Rev.* 15 (2016) 427–432. doi:10.1016/j.autrev.2016.01.016.
- [12] G. Salazar, M.D. Mayes, Genetics, Epigenetics, and Genomics of Systemic Sclerosis, *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 41 (2015) 345–366. doi:10.1016/j.rdc.2015.04.001.
- [13] X. xia Zuo, L. hua Zhang, H. Luo, Y. Li, H. Zhu, Systematic approach to understanding the pathogenesis of systemic sclerosis, *Clin. Genet.* (2016) 1–7. doi:10.1111/cge.12946.
- [14] S.H. Barondes, D.N.W. Cooper, M.A. Gitt, H. Leffler, Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 20807–20810. doi:10.1016/j.celrep.2015.02.012.
- [15] J. Dumić, S. Dabelić, M. Flögel, Galectin-3: An open-ended story, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1760 (2006) 616–635. doi:10.1016/j.bbagen.2005.12.020.
- [16] G.A. Rabinovich, M.A. Toscano, S.S. Jackson, G.R. Vasta, Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 17 (2007) 513–520. doi:10.1016/j.sbi.2007.09.002.
- [17] M.M. Kadrofske, K.P. Openo, J.L. Wang, The human LGALS3 (galectin-3) gene: Determination of the gene structure and functional characterization of the promoter, *Arch. Biochem. Biophys.* 349 (1998) 7–20. doi:10.1006/abbi.1997.0447.
- [18] J. Hirabayashi, K. Kasai, The family of metazoan metal-independent beta-galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution., *Glycobiology.* 3 (1993) 297–304. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8400545>.
- [19] T. Kaur, K. Thakur, J. Singh, S.S. Kamboj, M. Kaur, Identification of functional SNPs in human LGALS3 gene by in silico analyses, *Egypt. J. Med. Hum. Genet.* 18 (2017) 321–328. doi:10.1016/j.ejmhg.2017.02.001.
- [20] T. Fukumori, Y. Takenaka, N. Oka, T. Yoshii, V. Hogan, H. Inohara, H.O. Kanayama, H.R.C. Kim, A. Raz, Endogenous galectin-3 determines the routing of CD95 apoptotic signaling pathways, *Cancer Res.* 64 (2004) 3376–3379. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0336.
- [21] D.K. Hsu, R.Y. Yang, J. Saegusa, F.T. Liu, Analysis of the intracellular role of galectins in cell growth and apoptosis, *Methods Mol. Biol.* 1207 (2015) 451–463. doi:10.1007/978-1-4939-1396-1_29.
- [22] S.F. Dagher, J.L. Wang, R.J. Patterson, Identification of galectin-3 as a factor in pre-mRNA splicing., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92 (1995) 1213–7. doi:10.1073/pnas.92.4.1213.
- [23] J. Ochieng, V. Furtak, P. Lukyanov, Extracellular functions of galectin-3, *Glycoconj. J.* 19 (2002) 527–535. doi:10.1023/B:GLYC.0000014082.99675.2f.
- [24] F.T. Liu, G.A. Rabinovich, Galectins: Regulators of acute and chronic inflammation, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1183 (2010) 158–182. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.05131.x.
- [25] L. Wan, F.-T. Liu, Galectin-3 and Inflammation, *Glycobiol. Insights.* (2016). doi:10.4137/Gbi.s13921.
- [26] N.C. Henderson, A.C. Mackinnon, S.L. Farnworth, F. Poirier, F.P. Russo, J.P. Iredale, C. Haslett, K.J. Simpson, T. Sethi, Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 5060–5. doi:10.1073/pnas.0511167103.
- [27] A.W. Chung, P. a Sieling, M. Schenk, R.M. Teles, S.R. Krutzik, D.K. Hsu, F.T. Liu, E.N. Sarno, T.H. Rea, S. Stenger, R.L. Modlin, D.J. Lee, Galectin-3 regulates the innate immune response of human monocytes, *J. Infect. Dis.* 207 (2013) 947–56. doi:10.1093/infdis/jis920.

- [28] D.K. Hsu, H.Y. Chen, F.T. Liu, Galectin-3 regulates T-cell functions, *Immunol. Rev.* 230 (2009) 114–127. doi:10.1111/j.1600-065X.2009.00798.x.
- [29] A. Karlsson, K. Christenson, M. Matlak, Å. Björstad, K.L. Brown, E. Telemo, E. Salomonsson, H. Leffler, J. Bylund, Galectin-3 functions as an opsonin and enhances the macrophage clearance of apoptotic neutrophils, *Glycobiology*. 19 (2009) 16–20. doi:10.1093/glycob/cwn104.
- [30] N.C. Henderson, T. Sethi, The regulation of inflammation by galectin-3, *Immunol. Rev.* 230 (2009) 160–171. doi:10.1111/j.1600-065X.2009.00794.x.
- [31] S. Sato, C. St-Pierre, P. Bhaumik, J. Nieminen, Galectins in innate immunity: Dual functions of host soluble β -galactoside-binding lectins as damage-associated molecular patterns (DAMPs) and as receptors for pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), *Immunol. Rev.* 230 (2009) 172–187. doi:10.1111/j.1600-065X.2009.00790.x.
- [32] G.A. Rabinovich, M.A. Toscano, Turning “sweet” on immunity: Galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation, *Nat. Rev. Immunol.* 9 (2009) 338–352. doi:10.1038/nri2536.
- [33] T. Taniguchi, Y. Asano, K. Akamata, S. Noda, Y. Masui, D. Yamada, T. Takahashi, Y. Ichimura, T. Toyama, Z. Tamaki, Y. Tada, M. Sugaya, T. Kadono, S. Sato, Serum levels of galectin-3: Possible association with fibrosis, aberrant angiogenesis, and immune activation in patients with systemic sclerosis, *J. Rheumatol.* 39 (2012) 539–544. doi:10.3899/jrheum.110755.
- [34] S.S. Koca, F. Akbas, M. Ozgen, S. Yolbas, N. Ilhan, B. Gundogdu, A. Isik, Serum galectin-3 level in systemic sclerosis, *Clin. Rheumatol.* 33 (2014) 215–220. doi:10.1007/s10067-013-2346-8.
- [35] S. Trompet, W. Jukema, S.P. Mooijaart, I. Ford, D.J. Stott, R.G.J. Westendorp, A.J.M. de Craen, Genetic variation in galectin-3 gene associates with cognitive function at old age, *Neurobiol. Aging*. 33 (2012). doi:10.1016/j.neurobiolaging.2012.05.001.
- [36] C.Y. Hu, S.K. Chang, C.S. Wu, W.I. Tsai, P.N. Hsu, Galectin-3 gene (LGALS3) +292C allele is a genetic predisposition factor for rheumatoid arthritis in Taiwan, *Clin. Rheumatol.* 30 (2011) 1227–1233. doi:10.1007/s10067-011-1741-2.
- [37] G. da S. Cruz, A.L.D. Angelo, T.F. Larocca, C.T. Macedo, M. Noya-Rabelo, L.C.L. Correia, J.A. Torreão, B.S. de F. Souza, R.R. dos Santos, M.B.P. Soares, Assessment of Galectin-3 Polymorphism in Subjects with Chronic Chagas Disease, *Arq. Bras. Cardiol.* (2015). doi:10.5935/abc.20150105.
- [38] Y. Zhang, Y. Wang, M. Zhai, T. Gan, X. Zhao, R. Zhang, T. An, Y. Huang, Q. Zhou, J. Zhang, Influence of LGALS3 gene polymorphisms on susceptibility and prognosis of dilated cardiomyopathy in a Northern Han Chinese population, *Gene*. 642 (2018) 293–298. doi:10.1016/j.gene.2017.11.026.
- [39] F. Van Den Hoogen, D. Khanna, J. Fransen, S.R. Johnson, M. Baron, A. Tyndall, M. Matucci-Cerinic, R.P. Naden, T.A. Medsger, P.E. Carreira, G. Riemekasten, P.J. Clements, C.P. Denton, O. Distler, Y. Allanore, D.E. Furst, A. Gabrielli, M.D. Mayes, J.M. Van Laar, J.R. Seibold, L. Czirjak, V.D. Steen, M. Inanc, O. Kowal-Bielecka, U. Müller-Ladner, G. Valentini, D.J. Veale, M.C. Vonk, U.A. Walker, L. Chung, D.H. Collier, M.E. Csuka, B.J. Fessler, S. Guiducci, A. Herrick, V.M. Hsu, S. Jimenez, B. Kahaleh, P.A. Merkel, S. Sierakowski, R.M. Silver, R.W. Simms, J. Varga, J.E. Pope, 2013 classification criteria for systemic sclerosis: An american college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative, *Arthritis Rheum.* 65 (2013) 2737–2747. doi:10.1002/art.38098.
- [40] L.G. Davis, M.D. Dibner, J.F. Battey, *Basic Methods in Molecular Biology*, 1986. doi:10.1016/B978-0-444-01082-7.50030-8.
- [41] M. Atabaki, M. Hashemi, H. Daneshvar, E. Alijani, Lectin, galactoside-binding, soluble, 3 rs4652 A/C gene variation and the risk for rheumatoid arthritis, *Biomed. Reports*. 6 (2017) 251–255. doi:10.3892/br.2017.838.
- [42] T.F.M. De Belmont, K.P. Do Ó, A.S. Da Silva, K.M. De Vilar, F.S. Medeiros, L.R.S. Vasconcelos, A.C.M. Dos Anjos, B.L.D. Hatzlhofer, M.G.D.R. Pitta, M.A.C. Bezerra, A.D.S. Araújo, M.J.B.M. De Rego, P. Moura, M.D.S.M. Cavalcanti, Single nucleotide polymorphisms

- at +191 and +292 of galectin-3 gene (LGALS3) related to lower GAL-3 serum levels are associated with frequent respiratory tract infection and vaso-occlusive crisis in children with sickle cell Anemia, PLoS One. 11 (2016) 1–13. doi:10.1371/journal.pone.0162297.
- [43] G. Radosavljevic, V. Volarevic, I. Jovanovic, M. Milovanovic, N. Pejnovic, N. Arsenijevic, D.K. Hsu, M.L. Lukic, The roles of Galectin-3 in autoimmunity and tumor progression, Immunol. Res. 52 (2012) 100–110. doi:10.1007/s12026-012-8286-6.
 - [44] L. Li, J. Li, J. Gao, Functions of galectin-3 and its role in fibrotic diseases., J. Pharmacol. Exp. Ther. 351 (2014) 336–43. doi:10.1124/jpet.114.218370.
 - [45] F.L. de Oliveira, M. Gatto, N. Bassi, R. Luisetto, A. Ghirardello, L. Punzi, A. Doria, Galectin-3 in autoimmunity and autoimmune diseases., Exp. Biol. Med. (Maywood). (2015) 1–10. doi:10.1177/1535370215593826.
 - [46] R.P. Menon, R.C. Hughes, Determinants in the N-terminal domains of galectin-3 for secretion by a novel pathway circumventing the endoplasmic reticulum-Golgi complex, Eur. J. Biochem. 264 (1999) 569–576. doi:10.1046/j.1432-1327.1999.00671.x.

APÊNDICE B – TCLE PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
NÚCLEO DE PESQUISA EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA – SUELY GALDINO
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(PARA MAIORES DE 18 ANOS OU
EMANCIPADOS)

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa **Associação de polimorfismos, níveis sérios e parâmetros clínico-laboratoriais da galectina 3 em pacientes com esclerose sistêmica**, que está sob a responsabilidade do pesquisador Eudes Gustavo Constantino Cunha, residente no endereço Rua Paulo Guerra, número 94, Chã de Cruz, Paudalho - PE, CEP 55.825-000, Telefone: (81) 99786-9635, E-mail: eudesgcccunha@outlook.com. Também participam desta pesquisa os pesquisadores: Profa. Dra. Andréa Tavares Dantas, E-mail: andreatdantas@gmail.com, Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo, E-mail: moacyroraculo@gmail.com, Profa. Dra. Angela Luzia Branco Pinto Duarte, E-mail: angelabduarte@hotmail.com, disponíveis no telefone: (81) 2126-8346. Está sob a orientação da Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta, Telefone: (81) 99786-9635, E-mail: mgrpitta@gmail.com.

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

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

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

- Esta pesquisa busca entender se alguma mudança nas informações das nossas células do nosso organismo pode causar a esclerose sistêmica. Iremos estudar o seu sangue e investigar se os componentes dele podem contribuir para o aparecimento dos sintomas ou a piora desta doença. Nesta pesquisa serão realizados experimentos com as células presentes no seu sangue que é coletado da sua veia como uma coleta de sangue para exames laboratoriais. A coleta de sangue é feita no braço e a quantidade coletada é equivalente a duas colheres de sopa (13 ml). Nenhuma coleta será realizada sem a autorização prévia e serão feitas por profissionais treinados e competentes e orientados para reduzir os riscos. Antes de iniciar a coleta, nós limparemos o braço do voluntário com álcool. A coleta de sangue pode ser desconfortável e o braço pode ficar um pouco dolorido e apresentar hematoma, que é uma área arroxeadada no local da coleta. Em caso de danos ocasionados por quaisquer procedimentos envolvendo a pesquisa o paciente terá direito a assistência integral e gratuita. Nenhum medicamento será administrado em momento algum.
- Caso concorde, você participará desta pesquisa apenas com uma coleta de sangue e algumas informações do prontuário, no dia da consulta médica, sem a necessidade de deslocamento em dia adicional. Caso seja necessária a sua vinda em um dia adicional por motivo exclusivo da pesquisa, você e seu acompanhante serão ressarcidos financeiramente com o valor correspondente ao transporte e eventual alimentação.
- O material coletado será processado para separação do soro e extração do material genético (DNA) que será armazenado adequadamente em freezers -80°C e poderá ser utilizado em pesquisas futuras, com prévia autorização do Comitê de Ética em Pesquisa, e/ou da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, e pelo paciente. As amostras serão manipuladas no Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT), pertencente ao Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco. As amostras de sangue serão destinadas à quantificação de proteínas contidas no soro pelo ensaio imunoenzimático ELISA, e à pesquisa de polimorfismos no gene LGALS3 através da técnica de PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) em tempo real. O paciente e o voluntário sadio não irão fazer exames ou testes genéticos diretamente.
- O paciente participante da pesquisa e o médico que o acompanha possui total acesso aos seus dados, bem como resultados de exames, os quais ficarão armazenados sob total sigilo e confidencialidade. Caso solicitado, o participante poderá retirar o consentimento de guarda das amostras biológicas humanas e dos dados genéticos humanos armazenados no estudo. Esta solicitação deverá ser realizada por escrito e assinada, e que dar-se-á a qualquer tempo, sem prejuízo ao participante da pesquisa, com validade a partir da data da comunicação da decisão, sendo necessária a devolução/ destruição de todas as amostras biológicas coletadas durante o estudo, bem como a retirada dos dados genéticos do banco onde se encontrem armazenadas.

➤ Somente serão realizados os testes com amostras biológicas que estiverem descritos no TCLE e autorizados pelo participante da pesquisa ao assiná-lo. Os benefícios deste estudo consistem em compreender o desenvolvimento da esclerose sistêmica e melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

Todas as informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Para assegurar tal sigilo e confidencialidade, os pacientes receberão um código na pesquisa, assegurando a confidencialidade e a privacidade, a proteção da imagem e a não estigmatização dos participantes da pesquisa, garantindo a não utilização das informações em prejuízo das pessoas e/ou das comunidades, inclusive em termos de autoestima, de prestígio e/ou de aspectos econômicos-financeiros. Contudo, mesmo com todo o cuidado empregado na confidencialidade das informações do sujeito da pesquisa, o projeto possui risco mínimo e involuntário do vazamento dessas informações.

Os dados coletados nesta pesquisa (prontuários), ficarão armazenados em computador pessoal, sob a responsabilidade do pesquisador, no endereço acima informado, pelo período de mínimo 5 anos.

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

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: **(Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).**

(assinatura do
pesquisador)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado pelo meu representante legal, após a escuta da leitura deste documento e ter tido a oportunidade de conversar e esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo **Associação de polimorfismos, níveis sérios e parâmetros clínico-laboratoriais da galectina 3 em pacientes com esclerose sistêmica**, 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.

Assinatura: _____
Local e data _____

Impressão
digital
(opcional)

Eu sei que posso concordar ou não com o armazenamento de minhas amostras biológicas para pesquisas futuras, sem que minha decisão interfira com meu tratamento. Assim sendo, minha decisão é:

- () Sim, eu concordo com o armazenamento proposto.
() Não, eu não concordo com o armazenamento proposto.

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

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

APÊNDICE C – TCLE PARA ADULTOS IMPOSSIBILITADOS DE ASSINAR

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
NÚCLEO DE PESQUISA EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA – SUELY GALDINO
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(PARA ADULTOS IMPOSSIBILITADOS DE
ASSINAR O TCLE - Resolução 466/12)

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa **Associação de polimorfismos, níveis sérios e parâmetros clínico-laboratoriais da galectina 3 em pacientes com esclerose sistêmica**, que está sob a responsabilidade do pesquisador Eudes Gustavo Constantino Cunha, residente no endereço Rua Paulo Guerra, número 94, Chã de Cruz, Paudalho - PE, CEP 55.825-000, Telefone: (81) 99786-9635, E-mail: eudesgcccunha@outlook.com. Também participam desta pesquisa os pesquisadores: Profa. Dra. Andréa Tavares Dantas, E-mail: andreatdantas@gmail.com, Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo, E-mail: moacyroraculo@gmail.com, Profa. Dra. Angela Luzia Branco Pinto Duarte, E-mail: angelabduarte@hotmail.com, disponíveis no telefone: (81) 2126-8346. Está sob a orientação da Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta, Telefone: (81) 99786-9635, E-mail: mgrpitta@gmail.com.

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

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

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

- Esta pesquisa busca entender se alguma mudança nas informações das nossas células do nosso organismo pode causar a esclerose sistêmica. Iremos estudar o seu sangue e investigar se os componentes dele podem contribuir para o aparecimento dos sintomas ou a piora desta doença. Nesta pesquisa serão realizados experimentos com as células presentes no seu sangue que é coletado da sua veia como uma coleta de sangue para exames laboratoriais. A coleta de sangue é feita no braço e a quantidade coletada é equivalente a duas colheres de sopa (13 ml). Nenhuma coleta será realizada sem a autorização prévia e serão feitas por profissionais treinados e competentes e orientados para reduzir os riscos. Antes de iniciar a coleta, nós limparemos o braço do voluntário com álcool. A coleta de sangue pode ser desconfortável e o braço pode ficar um pouco dolorido e apresentar hematoma, que é uma área arroxeadada no local da coleta. Em caso de danos ocasionados por quaisquer procedimentos envolvendo a pesquisa o paciente terá direito a assistência integral e gratuita. Nenhum medicamento será administrado em momento algum.
- Caso concorde, você participará desta pesquisa apenas com uma coleta de sangue e algumas informações do prontuário, no dia da consulta médica, sem a necessidade de deslocamento em dia adicional. Caso seja necessária a sua vinda em um dia adicional por motivo exclusivo da pesquisa, você e seu acompanhante serão ressarcidos financeiramente com o valor correspondente ao transporte e eventual alimentação.
- O material coletado será processado para separação do soro e extração do material genético (DNA) que será armazenado adequadamente em freezers -80°C e poderá ser utilizado em pesquisas futuras, com prévia autorização do Comitê de Ética em Pesquisa, e/ou da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, e pelo paciente. As amostras serão manipuladas no Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT), pertencente ao Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco. As amostras de sangue serão destinadas à quantificação de proteínas contidas no soro pelo ensaio imunoenzimático ELISA, e à pesquisa de polimorfismos no gene LGALS3 através da técnica de PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) em tempo real. O paciente e o voluntário sadio não irão fazer exames ou testes genéticos diretamente.
- O paciente participante da pesquisa e o médico que o acompanha possui total acesso aos seus dados, bem como resultados de exames, os quais ficarão armazenados sob total sigilo e confidencialidade. Caso solicitado, o participante poderá retirar o consentimento de guarda das amostras biológicas humanas e dos dados genéticos humanos armazenados no estudo. Esta solicitação deverá ser realizada por escrito e assinada, e que dar-se-á a qualquer tempo, sem prejuízo ao participante da pesquisa, com validade a partir da data da comunicação da decisão, sendo necessária a devolução/ destruição de todas as amostras biológicas coletadas durante o estudo, bem como a retirada dos dados genéticos do banco onde se encontrem armazenadas.

➤ Somente serão realizados os testes com amostras biológicas que estiverem descritos no TCLE e autorizados pelo participante da pesquisa ao assiná-lo. Os benefícios deste estudo consistem em compreender o desenvolvimento da esclerose sistêmica e melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

Todas as informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Para assegurar tal sigilo e confidencialidade, os pacientes receberão um código na pesquisa, assegurando a confidencialidade e a privacidade, a proteção da imagem e a não estigmatização dos participantes da pesquisa, garantindo a não utilização das informações em prejuízo das pessoas e/ou das comunidades, inclusive em termos de autoestima, de prestígio e/ou de aspectos econômicos-financeiros. Contudo, mesmo com todo o cuidado empregado na confidencialidade das informações do sujeito da pesquisa, o projeto possui risco mínimo e involuntário do vazamento dessas informações.

Os dados coletados nesta pesquisa (prontuários), ficarão armazenados em computador pessoal, sob a responsabilidade do pesquisador, no endereço acima informado, pelo período de mínimo 5 anos.

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

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: **(Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).**

(assinatura do
pesquisador)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado pelo meu representante legal, após a escuta da leitura deste documento e ter tido a oportunidade de conversar e esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo **Associação de polimorfismos, níveis sérios e parâmetros clínico-laboratoriais da galectina 3 em pacientes com esclerose sistêmica**, 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.

Assinatura: _____
Local e data _____

Impressão
digital
(opcional)

Eu sei que posso concordar ou não com o armazenamento de minhas amostras biológicas para pesquisas

futuras, sem que minha decisão interfira com meu tratamento. Assim sendo, minha decisão é:

- () Sim, eu concordo com o armazenamento proposto.
() Não, eu não concordo com o armazenamento proposto.

A rogo de _____, que é (não alfabetizado/juridicamente incapaz/ deficiente visual), eu _____ assino o presente documento que autoriza a sua participação neste estudo.

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

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

ANEXO A - FICHA CLÍNICA

FICHA CLÍNICA ESCLEROSE SISTÊMICA

IDENTIFICAÇÃO																																											
Número da Ficha		Data de preenchimento	____/____/____																																								
Registro hospital	Sexo 1. Masculino ☐ 2. Feminino ☐																																										
Nome do paciente		Telefone																																									
Idade (anos)																																											
Início do Fenômeno de Raynaud: ____/____/____		Tempo FRy (meses): ____	Forma Clínica 1. Cutânea Limitada ☐ 2. Cutânea Difusa 3. Sine Escleroderma 4. Overlap (EXCLUIR) 5. Localizada (EXCLUIR)																																								
Início do sintoma não-FRy: ____/____/____		Tempo não-FRy (meses): ____																																									
Data do diagnóstico: ____/____/____		Tempo diagnóstico (meses): ____																																									
CLASSIFICAÇÃO (paciente precisa preencher um dos 3 critérios)																																											
ACR, 1980 CRITÉRIOS MAIORES () Espessamento cutâneo proximal às MCF ou MTF CRITÉRIOS MENORES () Esclerodactilia () Cicatrizes digitais ou perda da gordura subcutânea dos dedos () Fibrose pulmonar bibasal 1 maior OU 2 menores																																											
ESCLEROSE SISTÊMICA PRECOCE () Fenômeno de Raynaud <u>objetivo</u> + () Capilaroscopia anormal OU () Autoanticorpos específicos () Fenômeno de Raynaud <u>subjetivo</u> + () Capilaroscopia anormal E () Autoanticorpos específicos																																											
CRITÉRIOS EULAR <table border="1"> <tr> <td>() Espessamento da pele dos dedos proximal às MCF</td> <td></td> <td>09</td> </tr> <tr> <td>() Espessamento da pele dos dedos</td> <td>() Puffy fingers</td> <td>02</td> </tr> <tr> <td></td> <td>() Esclerodactilia (distal às MCF mas proximal às IFPs)</td> <td>04</td> </tr> <tr> <td>() Lesão de polpa digital</td> <td>() Úlceras digitais</td> <td>02</td> </tr> <tr> <td></td> <td>() Pitting scars</td> <td>03</td> </tr> <tr> <td>() Telangiectasia</td> <td></td> <td>02</td> </tr> <tr> <td>() Capilaroscopia alterada</td> <td></td> <td>02</td> </tr> <tr> <td>() HAP ou DPI</td> <td>() HAP</td> <td>02</td> </tr> <tr> <td></td> <td>() Doença pulmonar intersticial</td> <td>02</td> </tr> <tr> <td>() Fenômeno de Raynaud</td> <td></td> <td>03</td> </tr> <tr> <td>() Autoanticorpos</td> <td>() Anticentrômero</td> <td rowspan="3">03</td> </tr> <tr> <td></td> <td>() Anti-Scl70</td> </tr> <tr> <td></td> <td>() Anti-RNA polimerase III</td> </tr> <tr> <td>TOTAL</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>				() Espessamento da pele dos dedos proximal às MCF		09	() Espessamento da pele dos dedos	() Puffy fingers	02		() Esclerodactilia (distal às MCF mas proximal às IFPs)	04	() Lesão de polpa digital	() Úlceras digitais	02		() Pitting scars	03	() Telangiectasia		02	() Capilaroscopia alterada		02	() HAP ou DPI	() HAP	02		() Doença pulmonar intersticial	02	() Fenômeno de Raynaud		03	() Autoanticorpos	() Anticentrômero	03		() Anti-Scl70		() Anti-RNA polimerase III	TOTAL		
() Espessamento da pele dos dedos proximal às MCF		09																																									
() Espessamento da pele dos dedos	() Puffy fingers	02																																									
	() Esclerodactilia (distal às MCF mas proximal às IFPs)	04																																									
() Lesão de polpa digital	() Úlceras digitais	02																																									
	() Pitting scars	03																																									
() Telangiectasia		02																																									
() Capilaroscopia alterada		02																																									
() HAP ou DPI	() HAP	02																																									
	() Doença pulmonar intersticial	02																																									
() Fenômeno de Raynaud		03																																									
() Autoanticorpos	() Anticentrômero	03																																									
	() Anti-Scl70																																										
	() Anti-RNA polimerase III																																										
TOTAL																																											
Esclerose Sistêmica se ≥ 9																																											
AUTOANTICORPOS 1. Positivo 2. Negativo 3. Não realizado																																											
FAN	Anti-Scl70	Anti-centrômero	Anti-RNA polimerase III																																								
☐	☐	☐	☐																																								
Título: _____ Padrão: _____																																											

FICHA CLÍNICA ESCLEROSE SISTÊMICA

MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS (consultar definições)			
Pele 1. Sim <input style="width: 40px;" type="checkbox"/> 2. Não <input style="width: 40px;" type="checkbox"/>	Fenômeno de Raynaud 1. Sim <input style="width: 40px;" type="checkbox"/> 2. Não <input style="width: 40px;" type="checkbox"/>		
Úlceras digitais (prévias ou atuais) 1. Sim <input style="width: 40px;" type="checkbox"/> 2. Não <input style="width: 40px;" type="checkbox"/>	Doença pulmonar intersticial 1. Sim <input style="width: 40px;" type="checkbox"/> 2. Não <input style="width: 40px;" type="checkbox"/>		
Hipertensão arterial pulmonar 1. Sim <input style="width: 40px;" type="checkbox"/> 2. Não <input style="width: 40px;" type="checkbox"/>	Artrite (prévia ou atual) 1. Sim <input style="width: 40px;" type="checkbox"/> 2. Não <input style="width: 40px;" type="checkbox"/>		
Miopatia 1. Sim <input style="width: 40px;" type="checkbox"/> 2. Não <input style="width: 40px;" type="checkbox"/>	Comprometimento esofageano 1. Sim <input style="width: 40px;" type="checkbox"/> 2. Não <input style="width: 40px;" type="checkbox"/>		
Crise renal 1. Sim <input style="width: 40px;" type="checkbox"/> 2. Não <input style="width: 40px;" type="checkbox"/>	Telangiectasias 1. Sim <input style="width: 40px;" type="checkbox"/> 2. Não <input style="width: 40px;" type="checkbox"/>		
Calcinose 1. Sim <input style="width: 40px;" type="checkbox"/> 2. Não <input style="width: 40px;" type="checkbox"/>		Rodnan:	
HAQ:		SHAQ:	
MEDICAÇÕES (uso atual)			
1. Sim 2. Não 3. Não sabe informar			
BCC () Nifedipina <input style="width: 40px;" type="checkbox"/> () Anlodipina <input style="width: 40px;" type="checkbox"/> () Diltiazem <input style="width: 40px;" type="checkbox"/> () Verapamil <input style="width: 40px;" type="checkbox"/>	IECA () Captopril <input style="width: 40px;" type="checkbox"/> () Enalapril <input style="width: 40px;" type="checkbox"/>	BRA () Losartan <input style="width: 40px;" type="checkbox"/> () Valsartan <input style="width: 40px;" type="checkbox"/>	AAS <input style="width: 40px;" type="checkbox"/>
Pentoxifilina <input style="width: 40px;" type="checkbox"/>	Sildenafil <input style="width: 40px;" type="checkbox"/>	Bosentana <input style="width: 40px;" type="checkbox"/>	Cilostazol <input style="width: 40px;" type="checkbox"/>
Metotrexato <input style="width: 40px;" type="checkbox"/>	Azatioprina <input style="width: 40px;" type="checkbox"/>	Micofenolato <input style="width: 40px;" type="checkbox"/>	Ciclofosfamida VO <input style="width: 40px;" type="checkbox"/>
Ciclofosfamida EV <input style="width: 40px;" type="checkbox"/>	IBP () Omeprazol <input style="width: 40px;" type="checkbox"/> () Pantoprazol <input style="width: 40px;" type="checkbox"/>	Procinético () Bromoprida <input style="width: 40px;" type="checkbox"/> () Domperidona <input style="width: 40px;" type="checkbox"/>	Corticoide () Prednisona <input style="width: 40px;" type="checkbox"/> () Prednisolona <input style="width: 40px;" type="checkbox"/> ()
AINE <input style="width: 40px;" type="checkbox"/>	Rituximabe <input style="width: 40px;" type="checkbox"/>	Leflunomida <input style="width: 40px;" type="checkbox"/>	Colecalciferol <input style="width: 40px;" type="checkbox"/>
Outros			

FICHA CLÍNICA ESCLEROSE SISTÊMICA

HAQ – Health Assessment Questionnaire

Atividade	Sem dificuldade 0	Pouca dificuldade 1	Muita dificuldade 2	Não consegue 3	Maior valor
1. Vestir-se, inclusive amarrar os cordões dos sapatos e abotoar as roupas					
2. Lavar sua cabeça e seus cabelos					
3. Levantar-se de maneira ereta de uma cadeira de encosto reto e sem braços					
4. Deitar-se e levantar-se da cama					
5. Cortar pedaços de carne					
6. Levar à boca um copo ou xícara cheio de café, leite ou água					
7. Abrir um saco (caixa) de leite comum					
8. Caminhar em lugares planos					
9. Subir 5 degraus					
10. Lavar e secar seu corpo após o banho					
11. Tomar banho de chuveiro					
12. Sentar-se e levantar-se de um vaso sanitário					
13. Levantar os braços e pegar um objeto de aproximadamente 2,5 quilos que está posicionado pouco acima da cabeça					
14. Curvar-se para pegar roupas no chão					
15. Segurar-se em pé no ônibus ou metrô					
16. Abrir potes ou vidros de conservas que tenham sido previamente abertos					
17. Abrir e fechar torneiras					
18. Fazer compras nas redondezas onde mora					
19. Entrar e sair de um ônibus					
20. Realizar tarefas tais como usar vassoura para varrer e ou rodo para a água					
SOMATÓRIO					
SOMATÓRIO DIVIDIDO POR 8 (RESULTADO DO HAQ)					

Na semana passada, quanto os seus problemas com o Fenômeno de Raynaud (dedos que alternam de cor entre roxo, pálido e vermelho pelo frio) interferiram nas suas atividades?

Nenhum incômodo 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 Gravidade extrema

Na semana passada, quanto os seus problemas com as feridas nos dedos interferiram nas suas atividades?

Nenhuma gravidade 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 Gravidade extrema

Na semana passada, quanto os seus problemas gastrointestinais interferiram nas suas atividades?

Nenhuma gravidade 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 Gravidade extrema

Na semana passada, quanto os seus problemas com os pulmões interferiram nas suas atividades?

Nenhuma dor 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 Gravidade extrema

Na semana passada, quanto o conjunto de seus problemas causados pela esclerodermia interferiram nas suas atividades?

Nenhuma gravidade 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 Gravidade extrema

ANEXO B – PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS, NÍVEIS SÉRICOS E PARÂMETROS CLÍNICO-LABORATORIAIS DA GALECTINA 3 EM PACIENTES COM ESCLEROSE SISTÊMICA

Pesquisador: EUDES GUSTAVO CONSTANTINO CUNHA

Área Temática: Genética Humana:

(Haverá armazenamento de material biológico ou dados genéticos humanos no exterior e no País, quando de forma conveniada com instituições estrangeiras ou em instituições comerciais;);

Versão: 4

CAAE: 63611516.6.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.183.852

Apresentação do Projeto:

INTRODUÇÃO

As galectinas são um grupo de lectinas que possuem aproximadamente 30 kDa, com afinidade aos ligantes beta-galactosídeos e que desempenham diversas funções como morte, migração, crescimento e adesão celulares, bem como participar no processo inflamatório. Elas estão presentes em seres vivos invertebrados, vertebrados e também em alguns protistas e podem ser encontradas em diversos tipos de tecidos e células situando-se em diferentes locais como no núcleo, citoplasma, membrana plasmática, e na região extracelular. A família das galectinas possui 15 membros, enumeradas de 1 a 15, todas contendo uma sequência conservada de domínio de reconhecimento de carboidrato (DRC) possuindo cerca de 130 aminoácidos, sendo classificadas de acordo com o número e a organização dos DRCs em repetição em tandem, protótipo e do tipo quimera. Nesta família encontra-se a Galectina 3 (Gal 3), a única do tipo quimérico, a qual contém um DRC e um domínio N-terminal acrescido de uma prolina ou uma glicina. Polimorfismos são variações genéticas provenientes de mutações que aparecem em mais de 1% da população. A classe mais simples é chamada de Single Nucleotide Polymorphism (SNP) ou polimorfismo de

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conept@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 2.183.852

nucleotídeo único e se caracteriza pela troca de um nucleotídeo por outro. Estes SNPs podem alterar qualitativamente os produtos finais da tradução genética, causando mudanças nos mecanismos de ação de diversas proteínas importantes no organismo. O gene da galectina 3 LGALS3 (do inglês, Lectin Galactoside-binding soluble 3) está situado no locus q21-q22 do cromossomo 14 e os polimorfismos mais estudados desta galectina são o rs4644, rs4652, rs1009977, estes foram avaliados em algumas doenças autoimune como a AR. Diversos estudos apontam que a Gal 3 age direcionando a inflamação e respostas imunológicas em diversas doenças como câncer, doenças inflamatórias crônicas, e doenças autoimune. A concentração sérica autoanticorpos contra Gal 3 está mais elevada na polimiosite/dermatomiosite, se comparada a outras doenças autoimune como AR, LES e SSp. Na hepatite autoimune, a Gal 3 está associada à apoptose dos hepatócitos e à fibrose hepática. Sugere-se que a galectina 3 pode estar envolvida com o processo imunomodulatório nos estágios iniciais da dermatite autoimune. Em portadores da Síndrome de Sjögren primária (SSp), embora o mecanismo biológico pelo qual a Gal 3 está envolvida na doença não esteja bem elucidado, sabe-se que as altas concentrações desta lectina no soro está correlacionada com níveis séricos de proteína C reativa (PCR), fibrinogênio, IgG e IL-17. Em casos de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES), a Galectina 3 encontrou-se em maiores concentrações séricas se comparada a seus níveis em outras doenças autoimune, como por exemplo, AR, SSp, e ES. Notavelmente, a proteína ligante da Gal 3 (G3BP) foi relacionada a alta atividade do LES bem como da micropartícula-G3BP em doentes com LES. Recentemente, anticorpos anti-Galectina 3 foram encontrados em maior quantidade em pacientes lúpicos que tinham lesões de pele. Um estudo para avaliar a possível associação de polimorfismos de base única (SNPs) do gene da Gal 3 foi feito em Taiwan, sugerindo que o polimorfismo LGALS3 +292C estava associado com a susceptibilidade ao desenvolvimento da AR. Foi observado ainda que a Gal 3 desempenha uma atividade pro-inflamatória em pacientes portadores de AR. A ES é uma doença autoimune do tecido conjuntivo caracterizada em primeira instância por inflamação (desregulação imunológica) com produção de autoanticorpos, vasculopatia e fibrose de pele e órgãos internos. O espessamento progressivo da pele é a manifestação mais marcante, o qual permite a classificação da doença nas formas cutânea difusa ou limitada, dependendo do grau e da extensão da fibrose. Esta doença possui um caráter heterogêneo, acometendo na maioria das vezes pessoas do sexo feminino, na proporção de 3:1, tendo o pico de incidência entre os 30 e 50 anos. A patogenia da ES, por estar ligada ao processo fibrótico, encontra-se relacionada com a constante ativação de fibroblastos como uma das principais razões para a ocorrência da fibrose. A Gal 3 foi encontrada em altos níveis sorológicos em pacientes que apresentavam úlceras digitais e elevada pressão

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 2.183.852

ventricular sistólica direita quando comparados com outros pacientes que não apresentaram este sintoma. Também foi observado que pacientes que estavam no início da doença apresentaram níveis diminuídos de Gal 3 se comparado ao grupo controle. Em 2014 observou-se através de um estudo clínico que os níveis séricos de Gal 3 estavam mais elevados no grupo de doentes com ES, quando comparado com o grupo sadio, e que os valores séricos de Gal 3 para pacientes com ES ativa estavam maiores se comparados aos portadores da ES inativa. Entretanto, estes níveis séricos não se correlacionaram com os índices de gravidade e atividade da doença. Ao analisar o processo de fibrose em diversos tecidos como pulmonar, hepático, cardíaco, renal e vascular, foi visto que a Gal 3 estava em níveis elevados, sugerindo ser uma galectina pró-fibrótica, reforçando os achados de níveis séricos altos quando submetidos a comparação com o grupo controle.

HIPÓTESE

Em suma, está estabelecido que a Galectina 3 está envolvida no processo patológico de várias doenças de caráter autoimune. Todavia, os mecanismos pelos quais a Gal 3 age não estão completamente elucidados. Embora estudo prévio tenha relacionado a presença de polimorfismo do gene da Gal 3 à susceptibilidade à AR, tal associação não foi ainda avaliada em pacientes com ES.

METODOLOGIA

5.1 Recrutamento de portadores de Esclerose Sistêmica e voluntários sadios. Serão selecionados para este estudo 100 pacientes com ES atendidos no ambulatório Serviço de Reumatologia do HC/UFPE recrutados aleatoriamente. O grupo controle será composto de 150 voluntários saudáveis, desde que não tenham história clínica ou diagnóstico de ES ou de outras doenças autoimunes reumatológicas, sendo também selecionados aleatoriamente na população que frequenta o HC, acompanhando pacientes que estão em atendimento. Após esclarecimentos sobre a pesquisa, aqueles que aceitarem participar do projeto deverão assinar um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). 5.3 Coleta e armazenamento do material. Será coletado 4ml de sangue em tubo a seco com gel separador e 4ml de sangue em tubo contendo o anticoagulante EDTA. Nenhuma coleta será realizada sem a autorização prévia dos voluntários. Para isso, membros da equipe apresentarão aos pacientes o objetivo do estudo e o interesse da sua participação, sendo necessária a assinatura prévia do TCLE. As coletas serão feitas por profissionais competentes e devidamente treinados para reduzir os riscos para o paciente. O armazenamento do material se fará no Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 2.183.852

Terapêuticas (LINAT) do Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica (NUPIT) da UFPE. No referido laboratório o DNA da amostra será extraído e armazenado durante 5 anos, e o soro será retirado do tubo a seco com gel, ambos armazenados a -80 °C. 5.4 Extração de DNA O DNA será extraído "in house" a partir de sangue periférico em todo com o anticoagulante EDTA pela técnica padrão fenol-clorofórmio descrita por Davis em 1986. 5.5 Seleção dos polimorfismos a serem genotipados Os SNPs serão escolhidos levando em consideração: (i) frequência do Alelo Menor (MAF) maior que 0,1 na população europeia CEU (Site: HapMap); (ii) Tag SNP do grupo de correlação ($r^2 > 0,8$); (iii) SNPs presentes na região promotora e nos exons; (iv) trabalhos descritos na literatura que encontram associação com polimorfismos em alguma doença de caráter inflamatório. Bancos de dados que serão utilizados: International HapMap Project; Ensembl Genome Browser e o National Center for Biotechnology Information (NCBI). 5.6 Genotipagem Os polimorfismos do gene LGALS3 que forem selecionados serão genotipados em 100 portadores de ES e 150 voluntários sadios por RT-PCR (HT7900 Fast Real-Time PCR System Applied Biosystems) utilizando o sistema de detecção TaqMan®. 5.7 Dosagem de sérica de galectina. 3 Serão avaliados os níveis séricos de galectina 3 presentes no soro dos pacientes recrutados através da técnica ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) do tipo sanduíche.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Crítérios de inclusão: aceitar voluntariamente contribuir para o estudo; ter idade igual ou superior a 18 anos; ser diagnosticado com ES de acordo com os critérios preliminares do American College of Rheumatology ou os critérios do American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism (ACR/EULAR) 2013; estar em acompanhamento médico regular no ambulatório de reumatologia do HCUFPE.

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Crítérios de exclusão: não consentir em participar do estudo; ter idade inferior a 18 anos; ser diagnosticado com outra doença autoimune associada a ES; impossibilidade de coleta de sangue periférico.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO PRIMÁRIO

Analisar a possível correlação de polimorfismos no gene LGALS3 com níveis séricos de GAL3 e manifestações clínicas em pacientes com ES.

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 2.183.852

OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- Avaliar níveis séricos de Gal 3 em pacientes portadores de ES;
- Selecionar as SNPs a serem genotipados no gene LGALS3;
- Genotipar as SNPs presentes no gene LGALS3 em pacientes portadores de ES;
- Correlacionar o genótipo com manifestações.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS

O risco para os voluntários sadios é devido à necessidade de se coletar amostra de sangue. A coleta de sangue será feita no braço e a quantidade coletada é de 4 ml. Esta coleta pode ser desconfortável e o braço pode ficar um pouco dolorido e apresentar hematoma que é uma área arroxeadada no local da coleta. A coleta será feita por profissionais treinados e competentes e orientados para reduzir os riscos.

BENEFÍCIOS

Os benefícios devem-se a contribuição direta no desenvolvimento desta pesquisa, cujos resultados serão importantes para um melhor entendimento da patogênese da artrite reumatóide, esclerose sistêmica e lúpus eritematoso sistêmico. Além do paciente participante deste estudo terá a garantia da realização dos exames que são necessários para a confirmação do diagnóstico e acompanhamento da doença.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Verificar item "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Verificar item "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Recomendações:

Verificar item "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

ANÁLISE DE RESPOSTA AO PARECER CONSUBSTANCIADO CONEP Nº 2.159.580

1 – Quanto ao Termo de Consentimento (TCLE) para maiores de 18 anos intitulado "TCLEmaioresde18anos.doc" e o TCLE de adulto incapacitado de assinar intitulado "TCLEimpossibilitados.docx", datados de 31/05/2017:

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 2.183.852

1.1 - Solicita-se incorporar ao TCLE a página de assinaturas. Se por questões de configuração tal página continuar constituindo-se uma folha em separado, solicita-se o cuidado de obter a rubrica do participante de pesquisa nas demais folhas do TCLE, considerando-se a proteção do participante bem como do pesquisador (Resolução CNS 466/2012, item IV.5.d).

RESPOSTA: Devido ao volume do texto contido na primeira página do TCLE, torna-se incapaz a adequação solicitada. Contudo, o cuidado de obter a rubrica do participante de pesquisa nas demais folhas do TCLE será tomado.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

1.2 - Solicita-se descrever no TCLE os procedimentos que serão utilizados na pesquisa, com o detalhamento dos métodos a serem utilizados, isto é, deve-se descrever todos os procedimentos e exames que serão realizados no estudo, como por exemplo qual a quantidade de amostras a ser colhida, quais exames serão realizados, em qual laboratório será realizada a coleta das amostras e quais genes serão estudados (Item IV.3.a da Resolução CNS nº 466 de 2012).

RESPOSTA: As adequações referentes aos tópicos 1.2, 1.4 e 1.7 do parecer consubstanciado estão contidas na área destinada às informações sobre a pesquisa, no centro da página 1.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

1.3 - Para o Sistema CEP/CONEP não existe pesquisa livre de risco. Sendo assim, solicita-se que sejam descritos os possíveis desconfortos e riscos inerentes à manutenção de sigilo e confidencialidade durante a coleta e uso dos dados (Itens II.22 e IV.3.b da Resolução CNS nº 466 de 2012).

RESPOSTA: Para adequação do tópico 1.3 do parecer foi adicionada uma nova frase ao TCLE, localizada no 1º parágrafo após as "informações sobre a pesquisa" (página 1); No mesmo parágrafo encontra-se a adaptação referida no tópico 1.5.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

1.4 - Solicita-se que seja expresso de modo claro e afirmativo o direito de assistência integral gratuita devido a danos diretos/ indiretos e imediatos/ tardios pelo tempo que for necessário ao participante da pesquisa, garantido pelo patrocinador (Itens II.3.1 e II.3.2 da Resolução CNS nº 466 de 2012).

RESPOSTA: As adequações referentes aos tópicos 1.2, 1.4 e 1.7 do parecer consubstanciado estão contidas na área destinada às informações sobre a pesquisa, no centro da página 1.

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 2.183.852

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

1.5 - Segundo a Resolução CNS 466 de 2012, item III.2.i, a pesquisa deve prever procedimentos que assegurem a confidencialidade e a privacidade, a proteção da imagem e a não estigmatização dos participantes da pesquisa, garantindo a não utilização das informações em prejuízo das pessoas e/ou das comunidades, inclusive em termos de autoestima, de prestígio e/ou de aspectos econômico-financeiros. Solicita-se adequação.

RESPOSTA: Para adequação do tópico 1.3 do parecer foi adicionada uma nova frase ao TCLE, localizada no 1º parágrafo após as “informações sobre a pesquisa” (página 1); No mesmo parágrafo encontra-se a adaptação referida no tópico 1.5.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

1.6 - Deve ser garantido ao participante de pesquisa o ressarcimento de despesas decorrentes da participação no estudo nos dias em que for necessária sua presença para consultas ou exames. Sendo assim, solicita-se que o trecho seja reescrito, garantindo, de forma clara e objetiva, o ressarcimento e explicitando o modo como será realizado o ressarcimento das despesas tidas pelo participante da pesquisa e de seu acompanhante em decorrência de sua participação na pesquisa, podendo-se citar como exemplo, e não restringindo, o transporte e a alimentação (Resolução CNS nº 466 de 2012, itens II.21 e IV.3.g).

RESPOSTA: A adequação ao tópico 1.6 do parecer está situada no segundo tópico das “informações sobre a pesquisa”

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

1.7 - Solicita-se que conste de maneira clara e afirmativa no TCLE que o pesquisador responsável dará acesso aos resultados de exames e de tratamento ao médico do participante ou ao próprio participante sempre que solicitado e/ou indicado (Item III.2.i da Resolução CNS nº 251 de 1997).

RESPOSTA: As adequações referentes aos tópicos 1.2, 1.4 e 1.7 do parecer consubstanciado estão contidas na área destinada às informações sobre a pesquisa, no centro da página 1.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

1.8 – Quanto ao uso de material biológico:

1.8.1 - As pesquisas em qualquer área do conhecimento, envolvendo seres humanos, deverão

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 2.183.852

observar a exigência de utilizar o material e os dados obtidos na pesquisa exclusivamente para a finalidade prevista no seu protocolo, ou conforme o consentimento do participante. Não é adequado realizar testes adicionais nas amostras biológicas sem que o participante da pesquisa tenha conhecimento e consinta com a sua realização. Sendo assim, solicita-se informar que somente serão realizados os testes com amostras biológicas que estiverem descritos no TCLE e autorizados pelo participante da pesquisa ao assiná-lo (Resolução CNS nº 466 de 2012, item III.2).

RESPOSTA: Quanto ao uso de material biológico, referente ao tópico 1.8.1 do parecer, foi adicionada a frase que informa o uso das amostras para o testes descritos no TCLE (terceiro tópico das “informações sobre a pesquisa”). Além disso, foi inserido o texto sugerido para a possibilidade do uso futuro das amostras, localizado na página 2, junto com o consentimento do participante – tópico 1.8.2.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

1.8.2 – Quanto à possibilidade de uso das amostras biológicas para análises futuras, solicita-se incluir a solicitação de autorização a seguir:

“Eu sei que posso concordar ou não com o armazenamento de minhas amostras biológicas para pesquisas futuras, sem que minha decisão interfira com meu tratamento. Assim sendo, minha decisão é:

() Sim, eu concordo com o armazenamento proposto.

() Não, eu não concordo com o armazenamento proposto.”

RESPOSTA: Quanto ao uso de material biológico, referente ao tópico 1.8.1 do parecer, foi adicionada a frase que informa o uso das amostras para o testes descritos no TCLE (terceiro tópico das “informações sobre a pesquisa”). Além disso, foi inserido o texto sugerido para a possibilidade do uso futuro das amostras, localizado na página 2, junto com o consentimento do participante – tópico 1.8.2.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

1.8.3 - Solicita-se que conste no TCLE que a retirada do consentimento de guarda das amostras biológicas humanas e dos dados genéticos humanos armazenados no estudo deverá ser realizada POR ESCRITO E ASSINADA, e que dar-se-á a qualquer tempo, sem prejuízo ao participante da pesquisa, com validade a partir da data da comunicação da decisão, sendo necessária a devolução/ destruição de TODAS as amostras biológicas coletadas durante o estudo, bem como a retirada dos dados genéticos do banco onde se encontrem armazenadas (Resolução CNS nº 340 de 2004, itens

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 2.183.852

III.6 e III.7; Resolução CNS nº 441 de 2011, item 10.I).

RESPOSTA: A frase referente à adequação ao tópico 1.8.3 do parecer foi adicionada no quarto tópico das “informações sobre a pesquisa”.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

Considerações Finais a critério da CONEP:

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - Conep, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Protocolo aprovado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_830715.pdf	18/07/2017 19:39:55		Aceito
Outros	Carta_resposta_as_pendencias.docx	18/07/2017 19:39:02	EUDES GUSTAVO CONSTANTINO CUNHA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEmaioresde18anos.doc	18/07/2017 19:37:57	EUDES GUSTAVO CONSTANTINO CUNHA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEimpossibilitados.docx	18/07/2017 19:37:45	EUDES GUSTAVO CONSTANTINO CUNHA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Eudes.docx	18/07/2017 19:37:34	EUDES GUSTAVO CONSTANTINO CUNHA	Aceito
Outros	Justificativa_utilizacao_futura_de_amost ras.pdf	31/05/2017 16:44:02	EUDES GUSTAVO CONSTANTINO CUNHA	Aceito
Declaração do Patrocinador	Declaracao_do_Patrocinador.pdf	31/05/2017 16:39:45	EUDES GUSTAVO CONSTANTINO CUNHA	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRostoassinada.pdf	31/05/2017 16:35:53	EUDES GUSTAVO CONSTANTINO CUNHA	Aceito

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 2.183.852

Outros	Declaracaodevinculo.pdf	20/12/2016 00:39:34	EUDES GUSTAVO CONSTANTINO CUNHA	Aceito
Outros	Cartadapresentacaounidaeeassinada.pdf	20/12/2016 00:37:00	EUDES GUSTAVO CONSTANTINO CUNHA	Aceito
Outros	Termodecompromissoeconfidencialidad eassinadoEudes.pdf	20/12/2016 00:35:40	EUDES GUSTAVO CONSTANTINO CUNHA	Aceito
Outros	AutorizacaoDeUsoDeDadosEudes.pdf	20/12/2016 00:32:57	EUDES GUSTAVO CONSTANTINO CUNHA	Aceito
Outros	KamiladeMeloVilar.pdf	04/12/2016 19:03:38	EUDES GUSTAVO CONSTANTINO CUNHA	Aceito
Outros	AutorizacaodeusodedadosHCUFPEEBS ERH.docx	22/11/2016 23:27:02	EUDES GUSTAVO CONSTANTINO CUNHA	Aceito
Outros	eudesGustavoConstantinoCunha.pdf	22/11/2016 23:26:24	EUDES GUSTAVO CONSTANTINO CUNHA	Aceito
Outros	RafaelaSilvaGuimaraesGoncalves.pdf	22/11/2016 23:25:46	EUDES GUSTAVO CONSTANTINO CUNHA	Aceito
Outros	MoacyrJesusBarretodeMeloRego.pdf	22/11/2016 23:25:24	EUDES GUSTAVO CONSTANTINO CUNHA	Aceito
Outros	AngelaLuziaBrancoPintoDuarte.pdf	22/11/2016 23:25:00	EUDES GUSTAVO CONSTANTINO CUNHA	Aceito
Outros	MairaGaldinodaRochaPitta.pdf	22/11/2016 23:24:36	EUDES GUSTAVO CONSTANTINO CUNHA	Aceito
Outros	AndreaTavaresDantas.pdf	22/11/2016 23:24:14	EUDES GUSTAVO CONSTANTINO CUNHA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	carta_anuencia_nupit_eudes.pdf	22/11/2016 23:23:03	EUDES GUSTAVO CONSTANTINO CUNHA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	carta_anuencia_c_eudes.pdf	22/11/2016 23:22:41	EUDES GUSTAVO CONSTANTINO CUNHA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 2.183.852

BRASILIA, 25 de Julho de 2017

Assinado por:
Jorge Alves de Almeida Venancio
(Coordenador)

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br