



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

GUILHERME SOARES GOMES DA SILVA

**DOSAGEM DOS NÍVEIS SÉRICOS E EXPRESSÃO TECIDUAL EM GLÂNDULAS
SALIVARES MENORES DE IL-17A E IL-35 EM PACIENTES COM
ESCLEROSE SISTÊMICA**

Recife
2019

GUILHERME SOARES GOMES DA SILVA

**DOSAGEM DOS NÍVEIS SÉRICOS E EXPRESSÃO TECIDUAL EM GLÂNDULAS
SALIVARES MENORES DE IL-17A E IL-35 EM PACIENTES COM
ESCLEROSE SISTÊMICA**

Tese apresentada ao Colegiado do programa de Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Odontologia com área de concentração em Clínica Integrada.

Área de concentração: Clínica integrada.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Alcino Monteiro Gueiros

Co-orientadora: Prof. Dr^a. Andrea Tavares Dantas

**Recife
2019**

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

S586d Silva, Guilherme Soares Gomes da.
Dosagem dos níveis séricos e expressão tecidual em glândulas salivares menores de IL-17A e IL-35 em pacientes com esclerose sistêmica / Guilherme Soares Gomes da Silva. – 2019.
50 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientador: Luiz Alcino Monteiro Gueiros.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Pós-graduação em Odontologia. Recife, 2019.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Esclerose sistêmica. 2. Imuno-histoquímica. 3. Glândulas salivares. I. Gueiros, Luiz Alcino Monteiro (Orientador). II. Título.

617.6 CDD (22.ed.)

UFPE (CCS2019-260)

GUILHERME SOARES GOMES DA SILVA

**DOSAGEM DOS NÍVEIS SÉRICOS E EXPRESSÃO TECIDUAL EM GLÂNDULAS
SALIVARES MENORES DE IL-17A E IL-35 EM PACIENTES COM
ESCLEROSE SISTÊMICA**

Tese apresentada ao Colegiado do programa de Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Odontologia com área de concentração em Clínica Integrada.

Aprovado em: 18/10 / 2019

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Alcino Monteiro Gueiros (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Angela Luzia Branco Pinto Duarte (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Andréa Tavares Dantas (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

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

Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rego (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho a Deus por toda a inspiração, sabedoria, saúde e força que me deu até este momento;

À minha família, minha mãe Sônia, meu pai Edmário, meus irmãos Victor e Érica, e a minha esposa Lisandra, que sempre acreditaram e torceram para que tudo desse certo. Obrigado por terem me ensinado o real valor da vida;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Alcino Monteiro Gueiros, e a minha co-orientadora Prof^a Dr^a Andréa Tavares Dantas, que acreditaram em mim desde o início e me incentivaram a buscar cada vez mais o conhecimento, abrindo os meus olhos para a ciência, me servindo como fonte de inspiração para o saber.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Pernambuco por proporcionar instrumentos e ambientes que favorecem a formação de alunos propositivos na pesquisa, em busca incessante pelo conhecimento.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia por todo o seu crivo científico, por toda dedicação e atenção prestados;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco, por todo o conhecimento ensinado, dedicação, companheirismo e incentivo à pesquisa.

Aos colegas do Doutorado pelas conversas, palavras de apoio e pelas experiências trocadas;

Ao meu Orientador Prof. Dr. Luiz Alcino Monteiro Guerios, pela atenção, ensinamentos na grande contribuição para o desenvolvimento deste trabalho, e em toda a minha jornada acadêmica, desde o Mestrado até presente momento. Graças aos seus ensinamentos cheguei até aqui. O senhor é um grande exemplo a ser seguido como Pessoa e como Profissional, muito obrigado por tudo meu amigo!

À minha co-orientadora, Prof^a Dr. Andrea Tavares, pela atenção, ensinamentos e grande contribuição no desenvolvimento deste trabalho. Você é um grande exemplo como a ser seguido como pessoa e profissional, um exemplo de simplicidade e humanidade.

À Prof^a. Dr^a. Angela Duarte por todo o acolhimento, atenção e disponibilidade. A senhora é um dos maiores exemplos que conheci, uma pessoa que resume a palavra doação.

Ao Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rego, por todo o acolhimento, atenção, disponibilidade e ensinamentos. O senhor é um grande exemplo de profissional, uma pessoa que resume a palavra Ciência.

Aos amigos que fiz no laboratório (LINAT), Anderson, Eudes, Maria de Fátima, e em especial ao grande amigo Antônio Felix da Silva, pelo companheirismo e pela grande ajuda no desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigado!

À equipe de professores da Disciplina de Estomatologia da UFPE, Prof. Dr. Jair Carneiro Leão, Prof^a. Dr^a. Alessandra Carvalho e Prof. Dr. José Ricardo Pereira pela disponibilidade, oportunidades, acolhimento e fonte de grande inspiração científica e

acadêmica.

À toda equipe da Reumatologia pela compreensão e acolhimento, vocês são incríveis.

Aos eternos professores e amigos, Renato Cabral, Daniel Saturnino, Leógenes Maia Santiago, Rossana Leal, Eduardo Henrique, Eudes Lorena, Wamberto Maciel, João Manoel, Daniele Lago, Romulo Souza e Uoston Holder (in memoriam) que compartilharam do meu sonho na entrada do Doutorado.

Aos Grandes amigos Dr. Carlos Frederico e Dr. Wilson Rodrigo por sempre compartilharem seus conhecimentos e servirem de exemplo de ética, moral e humanidade pessoal e profissional, Muito obrigado!

A FACEPE pela concessão de dois anos de apoio financeiro na forma de bolsa de apoio à pós-graduação, a qual subsidiou minha formação como pesquisadora.

Aos colegas da turma do Doutorado pelas conversas, aflições compartilhadas e muitas conversas animadas;

A secretaria do Programa de Pós-graduação em Odontologia Isaac Simone pela disposição em ajudar.

...Enfim, gratidão é o sentimento que mais me enche o coração quando aqui escrevo, fico muito feliz por isso.

“...Ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria.”

Paulo de Tarso

RESUMO

Determinar os níveis séricos de IL-17A e IL-35, e avaliar a IL-17RA e IL-35 como marcadores de dano oral em biópsias de glândulas salivares de pacientes com esclerose sistêmica (ES). Foi realizado um estudo de caso-controle no período de novembro/2017 a dezembro/2018. Noventa e três indivíduos foram incluídos, divididos em dois grupos: esclerose sistêmica (n=50) e controle saudável (n=43). Os indivíduos de ambos os grupos foram submetidos a medição de amplitude bucal, perfil de função glandular e dosagem sérica dos anticorpos IL-17A e IL-35. Os pacientes com esclerose sistêmica com suspeita clínica para síndrome de Sjögren, foram submetidos ao procedimento de biópsia de glândulas salivares menores. Para detectar os anticorpos específicos IL-17A e IL-35, em soro, foi utilizado a técnica de ELISA (ensaio de imunoabsorção enzimática). A técnica de imuno-histoquímica foi utilizada para avaliação da imunorreatividade dos anticorpos IL-17RA e IL-35 nos tecidos de glândulas salivares menores do pacientes com esclerose sistêmica, que se submetaram ao procedimento de biópsia. Os indivíduos com ES eram majoritariamente mulheres (43/50, 86%), com média de idade de 46 anos ($\pm 11,6$ anos). As alterações orofaciais: telangiectasia (42/50, 84%), limitação de abertura bucal (36/50, 72%) e crenação em mucosa bucal (31/50, 62%), foram características orais frequentes nos pacientes com ES. O fluxo salivar em repouso e teste de Schirmer no grupo controle apresentou valores mais altos em comparação com o grupo ES (FSR= 0,58 x 0,93 ; $p=0.007$) / teste de Schirmer = 8 x 24; $p<0.001$). A detecção da IL-35 no soro, foi observada em 06 pacientes de cada os grupos ($p=0,07$). No grupo de pacientes com ES (24/50, 48%) apresentam indicação para o procedimento de biópsia de glândulas salivares menores, contudo, apenas 17/24 se propuseram a realizar o procedimento. Todas as biópsias apresentaram alta expressão de IL-35, observada em células ductais, ácinos, vasos sanguíneos e células inflamatórias. Não foi detectado a expressão no soro de IL-17A nos grupos. Não houve imunorreatividade da IL-17RA nos tecidos de glândulas salivares menores. Sugere-se que a IL-35 seja um marcador de dano nas glândulas salivares menores de pacientes com esclerose sistêmica, possivelmente, atuando na modulação da função desse tecido. Estudos futuros precisam ser desenvolvidos para entender melhor o papel da IL-35 no curso da fisiopatologia da esclerose sistêmica.

Palavras-chave: Esclerose sistêmica. Imuno-histoquímica. Glândulas salivares.

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the serum levels of IL-17A and IL-35, and to evaluate IL-17RA and IL-35 as markers of oral damage in salivary gland biopsies of patients with systemic sclerosis (SSc). A case-control study was conducted from November / 2017 to December / 2018. Ninety-three individuals were included, divided into two groups: systemic sclerosis (n = 50) and healthy control (n = 43). Subjects in both groups underwent oral amplitude, glandular function profile and serum dosage of IL-17A and IL-35 antibodies. Patients with systemic sclerosis with clinical suspicion for Sjögren's syndrome underwent minor salivary gland biopsy procedure. To detect IL-17A and IL-35 specific antibodies in serum, the ELISA (enzymatic immunosorbent assay) technique was used. The immunohistochemistry technique was used to evaluate the immunoreactivity of IL-17RA and IL-35 antibodies in the tissues of minor salivary glands of patients with systemic sclerosis who underwent the biopsy procedure. The individuals with SSc were mostly women (43/50, 86%), with a mean age of 46 years ($\pm$ 11.6 years). Orofacial alterations: telangiectasia (42/50, 84%), mouth opening limitation (36/50, 72%) and buccal mucosa creddation (31/50, 62%) were frequent oral characteristics in patients with SSc. Resting salivary flow and Schirmer test in the control group showed higher values compared to the ES group (FSR = 0.58×0.93 ; $p = 0.007$) / Schirmer test = 8×24 ; $p < 0.001$). Detection of serum IL-35 was observed in 06 patients from each group ($p = 0.07$). In the group of patients with SS (24/50, 48%) have indication for biopsy procedure of minor salivary glands, however, only 17/24 proposed to perform the procedure. All biopsies showed high IL-35 expression, observed in ductal cells, acini, blood vessels and inflammatory cells. No serum expression of IL-17A was detected in the groups. There was no IL-17RA immunoreactivity in the tissues of minor salivary glands. IL-35 is suggested to be a marker of minor salivary gland damage in patients with systemic sclerosis, possibly acting on modulation of this tissue function. Future studies need to be developed to better understand the role of IL-35 in the course of the pathophysiology of systemic sclerosis.

Keywords: Systemic Sclerosis. Imuno-histoquímico. Salivary glands.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO CIENTÍFICO

Figura 1 - Nível sérico da IL-35	35
Figura 2 - Expressão da IL-17RA e IL-35 nas glândulas salivares menores	36

LISTA DE TABELAS

ARTIGO CIENTÍFICO

Tabela 1 – Dados clínicos dos pacientes com esclerose sistêmica	35
Tabela 2 - Expressão (grau) da IL-35 nas glândulas salivares	37

LISTA DE ABREVIATURAS

CL	Grupo controle
ES	Esclerose sistêmica
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
FSR	Fluxo saliva rem repouso
FSE	Fluxo salivar estimulado
IHQ	Imuno-histoquímica
IL-17A	Interleucina 17A
IL-17RA	Interleucina 17RA
IL-35	Interleucina 35
SSj	Síndrome de Sjögren

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	JUSTIFICATIVA	18
3	OBJETIVOS	19
4	METODOLOGIA	20
5	CONCLUSÃO	25
	REFERÊNCIAS	26
	APÊNDICE A – ARTICLE TO BE SUBMITTED TO JOURNAL OF ORAL DISEASES	29
	APÊNDICE B – INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS	42
	ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP	46

1 INTRODUÇÃO

A esclerose sistêmica (ES) é uma doença reumática autoimune, de etiologia desconhecida, tipicamente caracterizada por vasculopatia obstrutiva dos pequenos vasos, produção de autoanticorpos e disfunção fibroblástica conduzindo a um aumento na deposição de matriz extracelular nos tecidos. As alterações inflamatórias, fibróticas e atróficas produzidas podem levar a fibrose intensa da pele, sistema músculo-esquelético e órgãos internos, particularmente pulmões, trato gastrointestinal, coração e rins, promovendo importantes limitações funcionais e alta morbimortalidade (Hoogen *et al.*, 2013).

A ES afeta preferencialmente as mulheres (com razão mulher:homem de 4:1), com pico de incidência entre a terceira e quarta décadas de vida. Dados dos EUA estimam uma prevalência de aproximadamente 240 casos por 1 milhão de adultos, com incidência de 20 casos por 1 milhão em adultos (Barnes e Mayes, 2012). Contudo, a prevalência apresenta grande variação geográfica, incluindo 38 casos por milhão e uma incidência de 7 novos casos por milhão/ano no Japão, 88 casos por milhão na Inglaterra, 158 casos por milhão na França e 233 casos por milhão na Austrália (Chiffot *et al.*, 2018). Em relação ao Brasil, um estudo epidemiológico realizado em Campo Grande – MS, a taxa de incidência de ES em 2014 foi de 11,9 por milhão/habitantes e a de prevalência foi de 105,6 por milhão/habitantes (Horimoto *et al.*, 2017).

Clinicamente, a doença geralmente inicia o cortejo sintomático com a presença do fenômeno de Raynaud, seguido por espessamento cutâneo progressivo (Abou-Raya *et al.*, 2008). O comprometimento cutâneo representa a manifestação mais característica e permite a classificação dos pacientes em duas formas clínicas, de acordo com a extensão e localização do acometimento: a cutânea limitada (lcSSc) e a cutânea difusa (dcSSc). Outras manifestações da doença incluem: doença pulmonar intersticial, hipertensão arterial pulmonar, dismotilidade gastrointestinal e crise renal esclerodérmica (Korn, 2003). As alterações cutâneas normalmente cursam com edema inicial da pele, principalmente nos quirodático e nas mãos (Avouac *et al.*, 2011). Com o progresso de doença, pode haver um aumento de telangiectasia cutânea na face e nas mãos, calcinose cutânea e ulcerações digitais isquêmicas (Hoogen *et al.*, 2013).

Além das manifestações clínicas descritas acima, os pacientes com ES podem apresentar envolvimento orofacial de extensão variável. As manifestações orofaciais são seguidas de disfunções estéticas, devido a disfunções estática da musculatura da mímica facial, e importantes disfunções orais, tais como trismo e xerostomia. As manifestações clínicas normalmente começam com o enrijecimento da língua. A fibrose progressiva da musculatura facial, lábios e

bochechas, bem como o enrugamento dos sulcos periorais podem levar ao desenvolvimento de microstomia. O quadro pode estender-se à língua, palato e laringe, contribuindo assim para instalação do quadro de disfagia (Cazal *et al.*, 2008; Vonk *et al.*, 2009). A fibrose gengival, que pode promover perda de inserção gengival, mobilidade dental e áreas de retração, agrava o quadro dentário (Baron *et al.*, 2015).

A fibrose das glândulas salivares, por sua vez, causa diminuição do fluxo salivar com consideráveis danos à função do sistema estomatognático. Infecções fúngicas de repetição, cárie rampante e doença periodontal estão diretamente associados a alterações da função glandular (Yenisey *et al.*, 2005). Ainda, cerca de 34% dos portadores de ES evoluem com síndrome de Sjögren, e apresentam auto-anticorpos relacionados às duas doenças (Kobak *et al.*, 2013). Alterações ósseas também são importantes aspectos do envolvimento bucal da ES. Os achados radiográficos revelam alargamento difuso no espaço do ligamento periodontal, principalmente na região anterior dos maxilares. Nas radiografias panorâmicas é possível observar graus variáveis de reabsorção posterior do ramo da mandíbula, processo coronóide, mento, côndilos e alguns dentes. Acredita-se que estas áreas são reabsorvidas devido à deposição crônica de colágeno (Dagenais *et al.*, 2015).

A patogênese da ES ainda não é compreendida de modo adequado. Sabe-se que a vasculopatia se apresenta como a primeira etapa da doença, promovendo uma resposta inflamatória que evolui com formação de fibrose intensa. A atividade da ES parece estar regulada pela função de células T regulatórias (Treg), que possivelmente se apresentam em número aumentado mas com a função prejudicada nos portadores da doença (Fenoglio *et al.*, 2012).

Quando estimuladas, estas células expressam a interleucina 35 (IL-35), uma citocina heterodimérica e um novo membro da família IL-12, descrito como um fator característico das células Treg que também é expressa em células endoteliais, células de músculo liso e monócitos (Li *et al.*, 2012). Neste contexto, a IL-35 atua como uma citocina anti-inflamatória que suprime a resposta T efetora e reduz a progressão de doenças inflamatórias e autoimunes. Particularmente na ES, um estudo prévio demonstrou que as células Treg possuem função alterada e a IL-35 apresenta níveis séricos elevados em indivíduos com fibrose pulmonar e com doença mais avançada (Dantas *et al.*, 2015).

Tomcik *et al.*, 2015 mostram que os níveis séricos elevados de IL-35 em pacientes com ES estão associados à inflamação nos estágios iniciais do processo da doença e aos fibroblastos dérmicos. Além disso, o fator de crescimento transformador beta 1 (TGF- β 1), um potente indutor

de fibrose, pode induzir a expressão de IL-35, que por sua vez ativa fibroblastos em repouso, potencializando a liberação de colágeno na ES.

Um recente estudo realizado por (Yayla *et al.*, 2018), afim de avaliar os níveis sérios da IL-35 em pacientes com ES, apresentaram uma relação significativa da IL-35 em pacientes com ES, quando comparado com indivíduos saudáveis. Entretanto, não houve associação entre os níveis séricos de IL-35 e o envolvimento de órgãos.

A IL-17 humana é uma glicoproteína homodimérica de 155 aminoácidos, da família das seis citocinas, produzida pelas células Th17 com memória para CD4⁺ ativadas. Na ES, as células Th17 estão mais relacionadas com a promoção da inflamação, estes linfócitos têm a IL-17 como sua citocina de assinatura (Brembilla *et al.*, 2013).

Os linfócitos Th17, responsável pela produção de seis citocinas: IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E e IL-17F, são caracterizados por promover a inflamação e também limitar a deposição de colágeno por um mecanismo que depende da IL-17, TNF e IFN- γ (Brembilla *et al.*, 2013). Sugere-se que a Th17 esteja envolvida na patogênese de diversas doenças inflamatórias autoimunes, como por exemplo na síndrome de Sjögren. Através da IHQ em glândulas salivares menores de pacientes com síndrome de Sjögren (SSj), notou-se uma forte expressão nas estruturas morfológicas do tecido glandular pela IL-17 e IL-17R (Mieliauskaite *et al.*, 2012).

Na ES, as células imunes podem estar entre os iniciadores do processo que conduzem à fibrose, embora os fatores que motivam sua ativação permaneçam obscuros. A ativação dos fibroblastos é realizada por células T de forma direta, ou por ação de citocinas secretadas. A patogênese da ES envolve a secreção de citocinas pelas células Th1, que mediam o processo inflamatório, e Th2, que ativam a resposta fibrótica (O'reilly; Hügle; Van laar, 2012). Para que haja a diferenciação em Th17 há a necessidade da presença de diversas proteínas, entre elas o fator de crescimento de transformação beta (TGF- β) (Volpe *et al.*, 2008).

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). Em modelo animal da ES, a secreção de Th17, em pacientes com no sangue periférico, foi correlacionada positivamente com lesões inflamatórias e fibróticas na pele e nos pulmões, sugerindo sua participação na patogênese da fibrose (Lei *et al.*, 2015).

O real papel da IL-17A na ES ainda não está muito bem estabelecido. Contudo, evidências apontam a participação da interleucina na patogênese da ES, associada a atividade da doença, comprometimento pulmonar, escore de pele (rodnan) e telangiectasis (Olewicz-Gawlik *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2014).

Neste contexto, o balanço entre as células Th17 e Treg tem se mostrado importante no curso da patogênese da ES, e os dois tipos celulares parecem elevados nos portadores da doença. Este é um estudo pioneiro sobre a importância da avaliação das IL-17A e IL-35 em nível sérico e imuno-histoquímica em glândulas salivares, correlacionando com as características orais dos pacientes portadores da esclerose sistêmica.

2 JUSTIFICATIVA

A patogênese da ES ainda permanece desconhecida e os mecanismos envolvidos na sua evolução carecem de melhor esclarecimento. Estudos recentes apontam que os níveis séricos da IL-35 e IL-17A encontram-se elevados em pacientes com ES, e associada a diversos comprometimentos sistêmicos como fibrose cutânea e pulmonar, em comparação com indivíduos saudáveis. Até o presente momento, nenhum estudo avaliou a associação entre os níveis séricos elevados das proteínas supracitadas com os parâmetros clínicos orais, como a alteração da função das glândulas salivares. Da mesma forma, não há na literatura relatos de avaliação da expressão das proteínas IL-35 e IL-17RA em tecido de glândulas salivares menores destes pacientes. Dessa forma, faz-se necessário estabelecer se IL-35 e IL-17RA são possíveis biomarcadores de dano oral nas glândulas salivares de pacientes com ES.

3 OBJETIVOS

Objetivo geral

- Determinar os níveis séricos e a expressão tecidual em glândulas salivares menores de IL-17A e IL-35 em pacientes com ES.

Objetivos específicos

- Detectar o nível sérico de IL-17A e IL-35 em indivíduos portadores de ES;
- Avaliar a imunoexpressão de IL-17A e IL-35 em glândulas salivares menores de pacientes com ES e síndrome sicca;
- Avaliar a associação entre os níveis séricos e imunoexpressão glandular de IL-17A e IL-35 com:
 - Escore de Rodnan;
 - Subgrupo clínico;
 - Manifestações sistêmicas;
- Avaliar a associação entre os níveis séricos e imunoexpressão glandular de IL-17A e IL-35 com parâmetros de doenças orais:
 - Distância interincisal;
 - Taxas de fluxo salivar;
 - Diagnóstico de síndrome de Sjögren.

4 METODOLOGIA

Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco sob o protocolo nº (74760017.4.3001.5192) (Anexo A). Todos os indivíduos foram previamente informados sobre a natureza do estudo, seus riscos e benefícios. Aqueles que respeitassem os critérios de inclusão, e concordassem em participar do estudo assinaram previamente o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Desenho do estudo, população estudada

Foi realizado um estudo caso-controle, composto por uma amostra de 50 indivíduos com diagnóstico de ES avaliados no serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas – UFPE no período de novembro/2017 a dezembro/2018. O cálculo amostral teve como base a população da região metropolitana do Recife (3.887.261 habitantes), segundo a estimativa do IBGE para o ano 2014. O intervalo de confiança estabelecido foi de 99%, com erro amostral de 1%, e uma prevalência de estimada de 0,3%, resultando em uma amostra mínima de 50 pacientes. O tamanho da amostra foi baseado na prevalência estimada de acordo com MAYES., 2012, realizado através do programa Epi info. Os pacientes foram avaliados pelo mesmo reumatologista experiente em esclerose sistêmica, e classificados de acordo com os critérios da ACR / EULAR (2013) (Hoogen, Khanna et al., 2013), a classificação das formas clínicas cutânea limitada e cutânea difusa foram de acordo com os critérios de LeRoy and Medsger (2001). Os pacientes foram classificados como portadores da síndrome de Sjögren, com base nos critérios do Grupo de Consenso Americano-Europeu (Shiboski et al., 2016). Para tanto, foram avaliadas as queixas de xeroftalmia e xerostomia, além do fluxo salivar em repouso, teste de Schirmer e biópsia das glândulas salivares menores.

O grupo controle corresponde aos acompanhantes dos pacientes do ambulatório de estomatologia/UFPE, formado por 43 indivíduos saudáveis, sem história pessoal e familiar de doença autoimune, pareados por sexo e idade para com o grupo doente.

Critérios de Elegibilidade (grupo esclerose sistêmica):

Critérios de inclusão e exclusão :

Foram incluídos na pesquisa os pacientes de ambos os sexos que atendiam os critérios abaixo:

- Idade acima de 18 anos

- Diagnóstico de ES de acordo com os critérios de ES precoce (Leroy e Medsger, 2001) ou do ACR/EULAR – 2013 (Hoogen *et al.*, 2013).

Foram excluídos os pacientes que apresentassem ou relatassem:

- Gravidez;
- Superposição ES e outras doenças autoimunes (a exceção da síndrome de Sjögren);
- ES localizada;
- Uso de medicamentos biológicos;
- Complicações clínicas que impeçam a participação no estudo.

Critérios de Elegibilidade (grupo controle):

Critérios de inclusão e exclusão :

Foram incluídos na pesquisa os indivíduos que atendiam os critérios abaixo:

- Idade acima de 18 anos;
- Não apresentar relato de doença autoimune.

Foram excluídos os indivíduos que apresentassem ou relatassem:

- História de doença autoimune familiar;
- Uso de antibiótico nos últimos seis meses;
- História de tabagismo;
- Gravidez;
- Diabetes.

Avaliação orofacial e laboratorial

Os pacientes responderam a um questionário para obtenção dos dados sociais, os dados médicos como a forma clínica, escore de Rodnan, esquema terapêutico e envolvimento sistêmico; bem como a história da doença atual, foram extraídos dos prontuários clínicos. Em seguida, os pacientes foram submetidos a exame clínico orofacial de mensuração da abertura bucal, avaliação do fluxo salivar e avaliação do fluxo lacrimal (Apêndice B). Quando houve suspeita de síndrome de Sjögren, foi realizada a biópsia de lábio inferior, como manobra adicional para o fechamento do diagnóstico. A técnica de imuno-histoquímica foi utilizada para avaliação da imunorreatividade dos anticorpos IL-17RA e IL-35 nos tecidos de glândulas salivares menores do pacientes com esclerose sistêmica, que se submetaram ao procedimento de biópsia. Para detectar os anticorpos IL-17A e IL-35, em soro, foi utilizado a técnica de ELISA (ensaio de imunoabsorção enzimática).

1 Mensuração da amplitude da abertura bucal

A amplitude de abertura bucal foi avaliada e registrada por meio de régua milimetrada tomando-se como base as bordas incisais dos incisivos centrais superiores e inferiores após abertura máxima da cavidade oral. Nos indivíduos diagnosticados com perda dos incisivos centrais superiores e/ou inferiores, a amplitude de abertura bucal foi registrada através de dentes artificiais, sendo esses pacientes portadores de prótese parcial removível ou prótese total para os casos de edentulos totais. Valores normais para a abertura bucal máxima variam entre 40 e 60mm em pacientes adultos. (Figueiredo *et al.*, 2009; Okeson, 2000).

2 Sialometria

Foram coletadas duas amostras de saliva de todos os pacientes, uma amostra para avaliação do fluxo salivar em repouso (FSR), e uma para o fluxo salivar estimulado (FSE). A primeira amostra foi coletada para avaliação do FSR, através da obtenção da saliva total não-estimulada. A coleta seguiu no período da manhã da seguinte forma: o paciente foi orientado a não ingerir alimentos, beber ou fumar por um período mínimo de 90 minutos antes da coleta. Após deglutir, o paciente expeliu toda a saliva produzida durante o período de 15 minutos em um recipiente plástico previamente pesado. Após este intervalo, o recipiente foi novamente pesado, e a diferença em relação ao peso inicial correspondeu ao peso da saliva. Considerando a densidade da saliva como 1g/mL, o peso foi convertido em volume. A taxa de FSR foi determinada pelo valor total dividido por 15, sendo expressa em mililitros por minuto. A amostra para FSE seguiu após a coleta para o FSR. O FSE foi medido de modo semelhante num período de 5 minutos, e antes da coleta o paciente mastigou uma goma de mascar sem sabor por 2 minutos. Foram classificados como hipossalivação os resultados menores que 0,1ml/min para FSR e menores que 0,5ml/min para FSE (Falcão *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2014).

3 Teste de Schirmer

Foi colocada uma tira de papel filtro Whatman no. 41, de 5 mm de largura por 35 mm de comprimento na junção do 1/3 médio e lateral das pálpebras inferiores, sem aplicação de colírio anestésico. Após 5 minutos, as tiras de papel filtro foram retiradas. A quantificação da produção de lágrima foi feita pela medida da extensão do papel filtro que ficou úmida. Valores menores do que 5 mm após 5 minutos foram considerados positivos (Moscovici *et al.*, 2015).

4 Biópsia de glândula salivar menor

A biópsia foi realizada para avaliação clínica de síndrome Sicca, apenas quando houve dúvida quanto ao diagnóstico. Uma incisão foi realizada na mucosa labial inferior direita, a 1 cm da linha média do lábio, após o bloqueio do nervo mentoniano por infiltração no sulco gengivo-labial inferior do lado a ser biopsiado. foi utilizada uma pinça de calázio para estabilização do local a ser operado. Foi realizada uma incisão horizontal por volta de 1 cm apenas da mucosa; dissecação e remoção com pinça e tesoura de glândulas salivares menores em número de 4 a 7; 5. Sutura com fio categut 5-0. O material foi armazenada em formol a 10%. As glândulas foram dissecadas e removidas isoladamente, propiciando um número adequado de glândulas para a análise histopatológica, com menor chance de danificar vasos e nervos sensitivos labiais (Pimentel *et al.*, 2009).

5 Avaliação histopatológica

O material biopsiado foi encaminhado ao laboratório de Patologia Oral para fim de diagnóstico. As glândulas salivares menores foram avaliadas primeiramente através da macroscopia, afim de descrever suas características morfológicas, sendo elas: coloração, consistência, formato, superfície e tamanho. Em seguida, o material foi submetido a processamento histológico convencional, passando do histotécnico para a inclusão em parafina. Os blocos foram cortados em 4µm de espessura e corados pela técnica de hematoxilina e eosina. Os critérios analisados foram o infiltrado linfocítico focal que consiste em agregados de linfócitos começando ao redor dos ductos, espalhando-se e envolvendo o lóbulo inteiro das glândulas salivares. Sendo definido como um infiltrado linfocitário contendo mais de 50 células mononucleares numa área de 4mm² (escore de foco ≥ 1) (Daniels *et al.*, 2011)

6 Imuno-histoquímica (IHQ)

As amostras biopsiadas de glândulas salivares menores nos lábios dos pacientes com ES foram colocadas em formalina tamponada a 10% por 24 horas. Os tecidos fixos foram embebidos em parafina e seccionados em seções de 4 µm de espessura. Seções de tecido de 4 µm foram desparafinizadas por imersão em xilol seguida de reidratação decrescente em álcool (100%, 95%, 80% e 70%). A recuperação do antígeno foi realizada usando tampão citrato 10mM, pH 6,0 , em micro-ondas 300W por 15'. O bloqueador endógeno da peroxidase foi realizado com

peróxido de hidrogênio por 30', seguido do bloqueio da ligação inespecífica (solução salina tamponada com fosfato - albumina sérica bovina a 1% (PBS-BSA) por 60'. A incubação das amostras foi realizada com anticorpo monoclonal primário mouse anti-human IL-17RA (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA, USA) 1 : 100 com PBS-BPS a 1% em overnight 4°C, e anticorpo policlonal primário rabbit anti-human IL-35 (Abbexa, UK) 1: 100 com PBS-BPS a 1%, em overnight a 4°C. Todas as incubações foram realizadas em câmara úmida à temperatura ambiente. Foi aplicado o sistema de amplificação (Easylink On, ImmPRESS™ e DAKO EnVision™). A reação foi visualizada com diaminobenzidina (DAB-H2O2) e os tecidos foram contra-corado com hematoxilina de Mayer. Os utilizados como controles positivos e negativos foram: cólon saudável para IL-17RA, e câncer gástrico para IL-35. (Li; Mai; Virtue; Yin *et al.*, 2012; Wang; Liu; Liu; Shen *et al.*, 2013).

7 Avaliação da Imuno-histoquímica

A avaliação microscópica semiquantitativa da expressão pela imuno-histoquímica foi realizada através do escaneamento as lâminas pelo Pannoramic MIDI II / 3DHISTECH Ltd, sob $\times 400$ (campos de alta potência), marcando 5 campos aleatórios em 17 lâminas coradas da mesma forma, usando quatro graus: "0" = sem imunorreatividade; "1" = baixa imunorreatividade; "2" = imunorreatividade moderada; "3" = alta imunorreatividade. Em cada lâmina foram pontuados separadamente: (1) acini; (2) ductos glandulares; (3) vasos sanguíneos; (4) células inflamatórias (Mieliuskaitė *et al.*, 2012). Dois avaliadores, de forma independente, avaliaram a imunorreatividade das proteínas nos tecidos, utilizando o sistema descrito acima.

8 Coleta e dosagem sorológica das citocinas

Foram coletados 9mL de sangue periférico em tubo sem anticoagulante com gel separador, 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 até as dosagens. Os níveis séricos de IL-17A e IL-35 foram mensurados por meio de kits de ELISA específicos (Human IL-35 ELISA Kit EH3273 – FineTest, Wuhan, China; e Human IL-17A (homodimer) Human Uncoated ELISA Kit 88-7176 – Invitrogen (Thermo Fisher Scientific), Carlsbad, CA, USA), de acordo com as recomendações dos fabricantes. Os limites de detecção foram 15.625-1000.00 pg / mL para IL-35, e 4-500 pg/mL para IL-17A. O produto da reação colorida foi medido utilizando um leitor ELISA automatizado (BioTek Instruments®, Vermont, EUA) a 450 nm, e os resultados foram expressos em pg/ml. A dosagem sérica a IL-17A foi avaliada em todos

indivíduos de ambos os grupo; enquanto que IL-35 foi realizada nos 50 pacientes com ES, 27 indivíduos do grupo controle.

5 CONCLUSÃO

Sugere-se que a IL-35 seja um marcador de dano nas glândulas salivares menores de pacientes com esclerose sistêmica, possivelmente, atuando na modulação da função desse tecido. Estudos futuros precisam ser desenvolvidos para entender melhor o papel da IL-35 no curso da fisiopatologia da esclerose sistêmica.

REFERÊNCIAS

ABOU-RAYA, A.; ABOU-RAYA, S.; HELMII, M. Statins: potentially useful in therapy of systemic sclerosis-related Raynaud's phenomenon and digital ulcers. **The Journal of Rheumatology**, 35, n. 9, p. 1801-1808, 2008. ISSN 0315-162X.

AVOUAC, J.; FRANSEN, J.; WALKER, U. A.; RICCIERI, V. *et al.* Preliminary criteria for the very early diagnosis of systemic sclerosis: results of a Delphi Consensus Study from EULAR Scleroderma Trials and Research Group. **Annals of the rheumatic diseases**, 70, n. 3, p. 476-481, 2011. ISSN 1468-2060.

BARNES, J.; MAYES, M. D. Epidemiology of systemic sclerosis: incidence, prevalence, survival, risk factors, malignancy, and environmental triggers. **Current opinion in rheumatology**, 24, n. 2, p. 165-170, 2012. ISSN 1040-8711.

BARON, M.; HUDSON, M.; TATIBOUET, S.; STEELE, R. *et al.* Relationship between disease characteristics and orofacial manifestations in systemic sclerosis: Canadian Systemic Sclerosis Oral Health Study III. **Arthritis care & research**, 67, n. 5, p. 681-690, 2015. ISSN 2151-4658.

BREMBILLA, N. C.; MONTANARI, E.; TRUCHETET, M. E.; RASCHI, E. *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 research & therapy**, 15, n. 5, p. R151, 2013. ISSN 1478-6362.

CAZAL, C.; SOBRAL, A. P. V.; NEVES, R. F. N.; FREIRE-FILHO, F. W. V. *et al.* Oral complaints in progressive systemic sclerosis: two cases report. **Medicina oral patologia oral y cirugia bucal**, 13, n. 2, p. 114, 2008. ISSN 1698-4447.

CHIFFLOT, Hélène *et al.* Incidence and prevalence of systemic sclerosis: a systematic literature review. **Seminars in arthritis and rheumatism**. WB Saunders, 2008. p. 223-235. ISSN 0049-0172 .

DAGENAIS, M.; MACDONALD, D.; BARON, M.; HUDSON, M. *et al.* The Canadian Systemic Sclerosis Oral Health Study IV: oral radiographic manifestations in systemic sclerosis compared with the general population. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology**, 2015. ISSN, 1528-395X.

DANIELS, T. E.; COX, D.; SHIBOSKI, C. H.; SCHIØDT, M. *et al.* Associations between salivary gland histopathologic diagnoses and phenotypic features of Sjögren's syndrome among 1,726 registry participants. **Arthritis & Rheumatism**, 63, n. 7, p. 2021-2030, 2011. ISSN 1529-0131.

DANTAS, A. T.; GONÇALVES, S. M. C.; PEREIRA, M. C.; GONÇALVES, R. S. G. *et al.* Increased IL-35 serum levels in systemic sclerosis and association with pulmonary interstitial involvement. **Clinical rheumatology**, 34, n. 9, p. 1621-1625, 2015. ISSN 1468-2060.

DE FIGUEIREDO, V. M. G.; CAVALCANTI, A. L.; DE FARIAS, A. B. L.; DO NASCIMENTO, S. R. Prevalência de sinais, sintomas e fatores associados em portadores de disfunção temporomandibular-DOI: 10.4025/actascihealthsci. v31i2. 5920. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, 31, n. 2, p. 159-163, 2009. ISSN 1679-9291.

FENOGLIO, D.; BERNUZZI, F.; BATTAGLIA, F.; PARODI, A. *et al.* Th17 and regulatory T lymphocytes in primary biliary cirrhosis and systemic sclerosis as models of autoimmune fibrotic diseases. **Autoimmunity Reviews**, 12, n. 2, p. 300-304, 2012. ISSN 1568-9972.

FALCÃO DP; LEAL SC; VIEIRA CN, *et al.* Sialometry of Upper Labial Minor Glands: A Clinical Approach by the Use of Weighing Method Schirmer's Test Strips Paper. **The Scientific World Journal** 2014;2014. ISSN 2356-6140.

HOOGEN, F.; KHANNA, D.; FRANSEN, J.; JOHNSON, S. R. *et al.* 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative. **Arthritis & Rheumatism**, 65, n. 11, p. 2737-2747, 2013. ISSN 1529-0131.

KOBAK, S.; OKSEL, F.; AKSU, K.; KABASAKAL, Y. The frequency of sicca symptoms and Sjögren's syndrome in patients with systemic sclerosis. **International journal of rheumatic diseases**, 16, n. 1, p. 88-92, 2013. ISSN 1756-185X.

KORN, J. H. Scleroderma: a treatable disease. **Cleveland Clinic journal of medicine**, 70, n. 11, p. 954-972, 2003. ISSN 0891-1150.

LEI, L.; ZHONG, X. N.; HE, Z. Y.; ZHAO, C. *et al.* IL-21 induction of CD4⁺ T cell differentiation into Th17 cells contributes to bleomycin-induced fibrosis in mice. **Cell biology international**, 39, n. 4, p. 388-399, 2015. ISSN 1065-6995.

LEROY, E. C.; MEDSGER, T. A. Criteria for the classification of early systemic sclerosis. **The Journal of Rheumatology**, 28, n. 7, p. 1573-1576, 2001. ISSN: 1499-2752.

LI, X.; MAI, J.; VIRTUE, A.; YIN, Y. *et al.* IL-35 is a novel responsive anti-inflammatory cytokine—a new system of categorizing anti-inflammatory cytokines. **PloS one**, 7, n. 3, p. e33628, 2012. ISSN 1932-6203.

MIELIAUSKAITE, D.; DUMALAKIENE, I.; RUGIENE, R.; MACKIEWICZ, Z. Expression of IL-17, IL-23 and their receptors in minor salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome. **Clinical and Developmental Immunology**, 2012. ISSN: 1740-2530

MOSCOVICI, B. K.; HOLZCHUH, R.; SAKASSEGAWA-NAVES, F. E.; HOSHINO-RUIZ, D. R. *et al.* Treatment of Sjögren's syndrome dry eye using 0.03% tacrolimus eye drop: Prospective double-blind randomized study. **Contact Lens and Anterior Eye**, 15, p. 1367-0484, 2015. ISSN 1367-0484.

OKESON, J. P. Etiologia e identificação dos distúrbios funcionais no sistema mastigatório. **Tratamento das desordens temporomandibulares e oclusão**, 4, p. 117-272, 2000.

OLEWICZ-GAWLIK, A.; DANCZAK-PAZDROWSKA, A.; KUZNAR-KAMINSKA, B.; GORNOWICZ-POROWSKA, J. *et al.* Interleukin-17 and interleukin-23: importance in the pathogenesis of lung impairment in patients with systemic sclerosis. **International journal of rheumatic diseases**, 17, n. 6, p. 664-670, 2014. ISSN: 1756-1841.

O'REILLY, S.; HÜGLE, T.; VAN LAAR, J. M. T cells in systemic sclerosis: a reappraisal. **Rheumatology**, 51, n. 9, p. 1540-1549, 2012. ISSN: 1499-2752.

PIMENTEL, D. R. N.; DE ABREU, M. A. M. M.; HIRATA, C.; DE AVELAR ALCHORNE, M. M. *et al.* Uso da pinça de calázio para biópsia de glândula salivar menor no diagnóstico da síndrome de Sjögren. **Surgical & Cosmetic Dermatology**, 1, n. 3, p. 145-146, 2009. ISSN 1984-8773.

SILVA, L. A. D. *et al.* The role of xerostomia in burning mouth syndrome: a case-control study. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 72, n. 2, p. 91-98, 2014. ISSN 0004-282X.

SHIBOSKI, C. H.; SHIBOSKI, S. C.; SEROR, R.; CRISWELL, L. A. *et al.* 2016 ACR-EULAR Classification Criteria for primary Sjögren's Syndrome: A Consensus and Data-Driven Methodology Involving Three International Patient Cohorts. **Arthritis & rheumatology**, 69, n. 1, p. 35, 2017. ISSN:2326-5205.

TOMCIK, M.; ZERR, P.; PALUMBO-ZERR, K.; STORKANOVA, H. *et al.* Interleukin-35 is upregulated in systemic sclerosis and its serum levels are associated with early disease. **Rheumatology**, 54, n. 12, p. 2273-2282, 2015. ISSN: 1499-2752.

VOLPE, E.; SERVANT, N.; ZOLLINGER, R.; BOGIATZI, S. I. *et al.* A critical function for transforming growth factor- β , interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T H-17 responses. **Nature immunology**, 9, n. 6, p. 650, 2008. ISSN 1529-2908

VONK, M. C.; BROERS, B.; HEIJDR, Y. F.; TON, E. *et al.* Systemic sclerosis and its pulmonary complications in The Netherlands: an epidemiological study. **Annals of the rheumatic diseases**, 68, n. 6, p. 961-965, 2009. ISSN 1468-206

WANG, Z.; LIU, J.-Q.; LIU, Z.; SHEN, R. *et al.* Tumor-derived IL-35 promotes tumor growth by enhancing myeloid cell accumulation and angiogenesis. **The Journal of Immunology**, 190, n. 5, p. 2415-2423, 2013. ISSN 1550-6606.

YANG, X.; YANG, J.; XING, X.; WAN, L. *et al.* Increased frequency of Th17 cells in systemic sclerosis is related to disease activity and collagen overproduction. **Arthritis research & therapy**, 16, n. 1, p. R4, 2014. ISSN: 1478-6354.

YAYLA, M. E.; TORGUTALP, M.; OKATAN, İ.; YURTERI, E. U. *et al.* Serum Interleukin 35 Levels in Systemic Sclerosis and Relationship With Clinical Features. **Journal of clinical rheumatology: practical reports on rheumatic & musculoskeletal diseases**, 2018. ISSN 1076-1608

YENISEY, M.; KÜLÜNK, T.; KURT, Ş.; URAL, C. A prosthodontic management alternative for scleroderma patients. **Journal of oral rehabilitation**, 32, n. 9, p. 696-700, 2005. ISSN:1365-2842

**APÊNDICE A - ARTIGO A SER ENVIADO AO PERIÓDICO ORAL DISEASE
(QUALIS A1)**

**DOSAGEM DOS NÍVEIS SÉRICOS E EXPRESSÃO TECIDUAL EM GLÂNDULAS
SALIVARES MENORES DE IL-17A E IL-35 EM PACIENTES COM
ESCLEROSE SISTÊMICA**

Palavras-chaves: Esclerodermia, Interleucina 35, Glândulas salivares

Guilherme Soares Gomes da Silva^{1#}, Andrea Tavares Dantas², Luiz Alcino Monteiro Gueiros³

1- Doutorando, Programa de Pós-graduação em Odontologia – Universidade Federal de Pernambuco. Recife, Brazil.

2- Unidade de Reumatologia, Hospital das Clínicas – Universidade Federal de Pernambuco. Recife, Brazil.

3- Unidade de Medicina Oral, Departamento de Clínica e Odontologia Preventiva, Universidade Federal de Pernambuco. Recife, Brazil.

#Corresponding Author:

Guilherme Soares Gomes da Silva

Programa de Pós-graduação em Odontologia –UFPE. Recife, Brazil.

Av. Prof. Moraes Rego, 1235 – CDU

Recife – PE, CEP 50670-901

+55 81 2126-8816

Email: guilherme_sgs@hotmail.com

Resumo

Objetivo: Determinar os níveis séricos e a expressão tecidual em glândulas salivares menores de IL-17A e IL-35 em pacientes com esclerose sistêmica. **Métodos:** Foi realizado um estudo de caso-controle no período de novembro/2017 a dezembro/2018. Noventa e três indivíduos foram incluídos, e divididos em dois grupos: esclerose sistêmica (n=50) e controle saudável (n=43). As dosagens séricas das IL-17A e IL35 foram determinadas por ELISA. Para avaliar a marcação das IL-17RA e IL-35 nas glândulas salivares menores foi utilizado a técnica da imuno-histoquímica. As biopsias foram realizadas em indivíduos com suspeita de síndrome de Sjögren. **Resultados:** Os indivíduos com ES eram majoritariamente mulheres (43/50, 86%), com média de idade de 46 anos ($\pm 11,6$ anos). A detecção da IL-35 no soro, foi observada em 06 pacientes de cada os grupos ($p=0,07$). Todas as biopsias apresentaram alta expressão de IL-35, observada em células ductais, ácinos, vasos sanguíneos e células inflamatórias. Os pacientes com esclerose sistêmica e os indivíduos do grupo controle, não secretaram IL-17A. Não houve imunorreatividade da IL-17RA nos tecidos de glândulas salivares menores. **Conclusão:** Sugere-se a participação da IL-35 na patogênese da ES, possivelmente atuando na modulação da função das glândulas salivares. Estudos futuros precisam ser desenvolvidos para entender melhor o papel da IL-35 no curso da fisiopatologia da esclerose sistêmica.

Palavras-chave: Esclerodermia; Interleucina 35; Glândulas salivares

INTRODUÇÃO

A esclerose sistêmica (ES) é uma doença reumática multissistêmica autoimune, cuja patogênese ainda não está bem estabelecida. Sugere-se que o dano vascular inicial conduza a uma resposta inflamatória, e promova o desenvolvimento de fibrose intensa, devido a deposição excessiva da matriz extracelular (MEC) (Hudson, 2015). Associada a um prognóstico reservado, é considerada a mais grave das doenças de colágeno (Hesselstrand, Scheja et al., 1998; Steen and Medsger 2007). A alteração fibrótica cursa para comprometimento cutâneo, representando a manifestação clínica mais característica (Korn 2003).

As glândulas salivares também são envolvidas pela doença, sugestivo de alterações fibróticas, que podem causar hipossalivação e danos consideráveis nas funções orais (Yenisey, Külünk et al., 2005). Além disso, cerca de 1/3 dos portadores da ES desenvolvem síndrome de

Sjögren e podem apresentar autoanticorpos relacionados a ambas as doenças (Kobak, Oksel et al., 2013).

Acredita-se que células imunes podem estar entre os iniciadores do processo que conduzem à fibrose, embora os fatores que motivam sua ativação permaneçam obscuros. A ativação dos fibroblastos é realizada por células T de forma direta, ou por ação de citocinas secretadas. A patogênese da ES envolve a secreção de citocinas pró-inflamatórias pelas células Th1, as quais participam mediando o processo inflamatório nos estágios iniciais da doença, enquanto que as citocinas Th2 promovem ativamente a resposta fibrótica secretando mediadores pro-fibróticos, correlacionando-se com a extensão da fibrose, e com comprometimento visceral (O'Reilly, Hügle et al., 2012).

A IL-17A é uma citocina produzida pelas células Th17, e exerce sua função através do seu receptor IL-17RA. Seu real papel na ES ainda não está muito bem estabelecido, contudo, evidências apontam a participação da IL-17A na patogênese da ES, associada a atividade da doença, comprometimento pulmonar, escore de pele e telangiectasias (Yang *et al.*, 2014). Imuno-histoquímica em glândulas salivares menores de pacientes com SSj, apresentam forte marcação para IL-17RA (Weng, Liu et al., 2018), sugerindo que as células Th17 estejam envolvidas na patogênese da SSj.

A IL-35 é uma citocina heterodimérica, e um novo membro recentemente identificado da família IL-12 (Ning-Wei 2010). Atuando como uma importante citocina ant-inflamatória, contudo, seu papel fisiológico ainda é incerto. Sua participação na fisiopatologia das doenças humanas ainda não está claro. Entretanto, um estudo recente mostrou alta expressão desta citocina através do soro em pacientes com ES, associada à fibrose pulmonar, em comparação com saudáveis (Dantas, Gonçalves et al., 2015). Contudo, a IL-17A e a IL-35 ainda não foram estudadas na fisiopatologia das manifestações orais da ES.

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi determinar a expressão da IL-17A e IL-35 em nível sérico e imunorreatividade tecidual, nas glândulas salivares menores, em indivíduos portadores de ES. O presente trabalho é primeiro estudo na literatura a realizar imuno-histoquímica em glândulas salivares de pacientes com ES, para determinar imunorreatividades dos anticorpos IL-17RA e IL-35.

METODOLOGIA

Aspectos Éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco sob o protocolo nº (74760017.4.3001.5192). O termo de consentimento livre e

esclarecido foi assinado antes da inclusão no estudo. Todos os indivíduos foram devidamente informados sobre a natureza do estudo, seus riscos e benefícios.

Delineamento do estudo, População estudada

Foi realizado um estudo de caso-controle, com indivíduos diagnosticados com ES avaliados no Ambulatório de Reumatologia do Hospital das Clínicas - UPFE de Novembro de 2017 a Dezembro de 2018. Indivíduos de ambos os sexos, maiores de 18 anos e com diagnóstico de ES eram elegíveis para o estudo. Os indivíduos foram avaliados pelo mesmo reumatologista experiente em esclerose sistêmica, e classificados de acordo com os critérios da ACR / EULAR (2013) (Hoogen, Khanna et al., 2013). Os pacientes foram classificados como formas clínicas cutânea limitada e cutânea difusa de acordo com os critérios de LeRoy and Medsger (2001). Foram considerados critérios de exclusão: gravidez, ES localizada e complicações clínicas graves, outras doenças auto-imunes (exceto a síndrome de Sjögren). O grupo controle foi composto por 43 indivíduos saudáveis, pareados por sexo e idade, que não relataram doença auto-imune, história de tabagismo, uso de antibióticos nos últimos seis meses antes do exame, gravidez ou diabetes.

Os pacientes foram classificados como portadores da síndrome de Sjögren, com base no documento do Grupo de Consenso Americano-Europeu (Shiboski et al., 2016). Para tanto, foram avaliadas as queixas de xerofthalmia e xerostomia, além do fluxo salivar em repouso, teste de Schirmer e biópsia das glândulas salivares menores.

Avaliação clínica oral

Os pacientes responderam a um questionário estruturado para obter dados clínicos, incluindo dados sociodemográficos, médicos, história atual da doença e condições orofaciais. Os dados médicos foram complementados através da avaliação dos prontuários

A distância interincisiva máxima foi avaliada e registrada por paquímetro digital, com base na distância das bordas dos incisivos centrais superiores e inferiores após abertura máxima da cavidade oral. Não foi possível realizar a avaliação em pacientes desdentados que não usavam prótese superior ou mandibular para eliminar a ausência de dentes incisivos (Silvestre-Rangil, Martinez-Herrera et al., 2015).

O teste de sialometria em repouso e o teste de Schirmer foram realizados durante a manhã, conforme descrito por (Oliveira, de Souza et al., 2015). Biópsia de glândulas salivares menores foi realizada em pacientes com suspeita de SSj. A avaliação microscópica foi positiva quando o escore de foco foi maior que 1. O escore de foco foi determinado pela contagem do número de

focos (50 ou mais linfócitos / 4mm²) em relação à área glandular total (Daniels, Cox et al. 2011). A crenação foi determinada com a presença persistente de marcas deixadas pelo contorno dos dentes na mucosa jugal (Ghom and Ghom 2014).

ELISA

O soro foi coletado e armazenado a -80°C até as dosagens. Os níveis séricos de IL-17A e IL-35 foram mensurados por meio de kits de ELISA comerciais para as proteínas humanas IL-35 (ELISA Kit EH3273 – FineTest®, Wuhan, China); e IL-17A (homodimer) (ELISA Kit 88-7176 – Invitrogen®-Thermo Fisher Scientific™, Carlsbad, CA, USA), de acordo com as recomendações dos fabricantes. Os limites de detecção foram 15.625-1000.00 pg / mL para IL-35, e 4-500 pg/mL para IL-17A. A absorbância foi mensurada utilizando um leitor ELISA automatizado (BioTek Instruments®, Vermont, EUA) a 450 nm, e os resultados foram expressos em pg/ml. A dosagem sérica da IL-17A foi avaliada em todos indivíduos de ambos os grupo; enquanto que a IL-35 foi quantificada nos 50 pacientes com ES, e 27 indivíduos do grupo controle.

Imunohistoquímica

As amostras biopsiadas de glândulas salivares menores dos lábios dos pacientes com ES foram fixadas em formalina tamponada a 10% por 24 horas. Os tecidos fixados foram incluídos em parafina e seccionados em seções de 4 µm de espessura. As seções foram desparafinizadas por imersão em xilol seguida de reidratação decrescente em álcool (100%, 95%, 80% e 70%). A recuperação antigênica foi realizada usando tampão citrato 10mM, pH 6,0 , em micro-ondas 300W por 15'. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com peróxido de hidrogênio por 30', seguido do bloqueio da ligação inespecíficas [solução salina tamponada com fosfato - albumina sérica bovina a 1% (PBS-BSA) por 60']. A incubação das amostras foi realizada com anticorpo primário monoclonal mouse anti-human IL-17RA (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA, USA) 1 : 100 em PBS-BPS a 1% , overnight 4°C, e anticorpo primário policlonal rabbit anti-human IL-35 (Abxexa, UK) 1: 100 em PBS-BPS a 1%, overnight a 4°C. Foi aplicado o sistema de amplificação (Easylink On, ImmPRESS™ e DAKO EnVision™) em temperatura ambiente por 60'. A marcação foi visualizada com diaminobenzidina (DAB-H₂O₂) e os tecidos foram contra-corados com hematoxilina de Mayer. Os tecidos utilizados como controles positivos foram: cólon saudável para IL-17RA, e câncer gástrico para IL-35. O controle negativo foi feito através da substituição dos anticorpo primário por PBS-BSA 1%, nas mesmas condições de incubação do anticorpo primário.

Avaliação dos resultados da IHQ

A avaliação microscópica semiquantitativa da expressão pela imuno-histoquímica foi realizada através do escaneamento das lâminas pelo Panoramic MIDI II / 3DHISTECH Ltd, sob $\times 400$ (campos de alta potência), marcando 5 campos aleatórios nas 17 lâminas coradas da mesma forma, usando quatro graus: "0" = sem imunorreatividade; "1" = baixa imunorreatividade; "2" = imunorreatividade moderada; "3" = alta imunorreatividade. Em cada lâmina foram pontuados separadamente: (1) ácinos; (2) ductos glandulares; (3) vasos sanguíneos; (4) células inflamatórias (Mielienskaite, Dumalakiene et al., 2012). Dois avaliadores, de forma independente, avaliaram a imunorreatividade das proteínas nos tecidos, utilizando o sistema descrito acima.

Resultados

O estudo incluiu 50 indivíduos com ES; 43/50 mulheres (86%) com média de idade 46 anos ($\pm 11,6$ anos). O grupo controle foi composto por 43 indivíduos, 36/43 mulheres (84%), com média de idade 44 anos (± 8 anos). A maioria dos pacientes ES apresentaram envolvimento esofágico (47/50, 94%) e pulmonar (32/50, 64%), além de úlceras digitais (32/50, 64%) e o fenômeno de Raynaud (28/50, 56%). Os achados orofaciais, telangiectasia (42/50, 84%), limitação de abertura bucal (36/50, 72%) e crenação em mucosa bucal (31/50, 62%), foram características orais frequentes nos pacientes (Tabela 1).

Dentre a população dos pacientes com ES, 24/50 pacientes (48%) apresentaram suspeita clínica de SSj com base nos resultados reduzidos dos testes de sialometria / Schirmer; dos quais apenas 17/24 pacientes (70%) realizaram biópsia de glândulas salivares menores, nenhum paciente apresentou escore de foco maior que 1. De acordo com o critérios de classificação do ACR/EULAR (2016), nenhum paciente foi classificado como portador de SSj.

Tabela 1. Forma clínica, tempo de diagnóstico, envolvimento sistêmico e oral de pacientes com esclerose sistêmica (n=50).

Características	N (%)
Forma clínica da ES	
Cutânea limitada	24 (48%)
Cutânea difusa	26 (52%)
Tempo de diagnóstico	
< 2 anos	02 (4%)
2-5 anos	12 (24%)
> 5 anos	36 (72%)
Comprometimento cutâneo	50 (100%)
Comprometimento esofágico	47 (94%)
Úceras digitais	32 (64%)
Doença pulmonar intersticial	32 (64%)
Fenômeno de Raynaud	28 (56%)
Hipertensão arterial pulmonar	13 (26%)
Miopatia	13 (26%)
Artrite	04 (8%)
Crise renal	01 (2%)
Telangiectasia	42 (84%)
Limitação de abertura bucal	36 (72%)
Crenação em mucosa bucal	31 (62%)

Dosagem sérica de IL-17A e IL-35

A IL-17A não foi secretada pelos grupos. A secreção da IL-35 foi observada em apenas 06 pacientes de cada grupo, e não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias dos níveis séricos dos grupos ($p=0,07$) (Fig. 1).

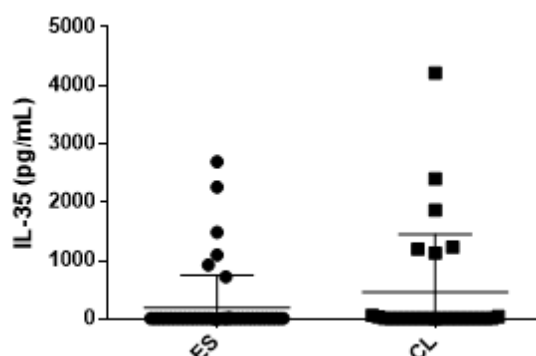
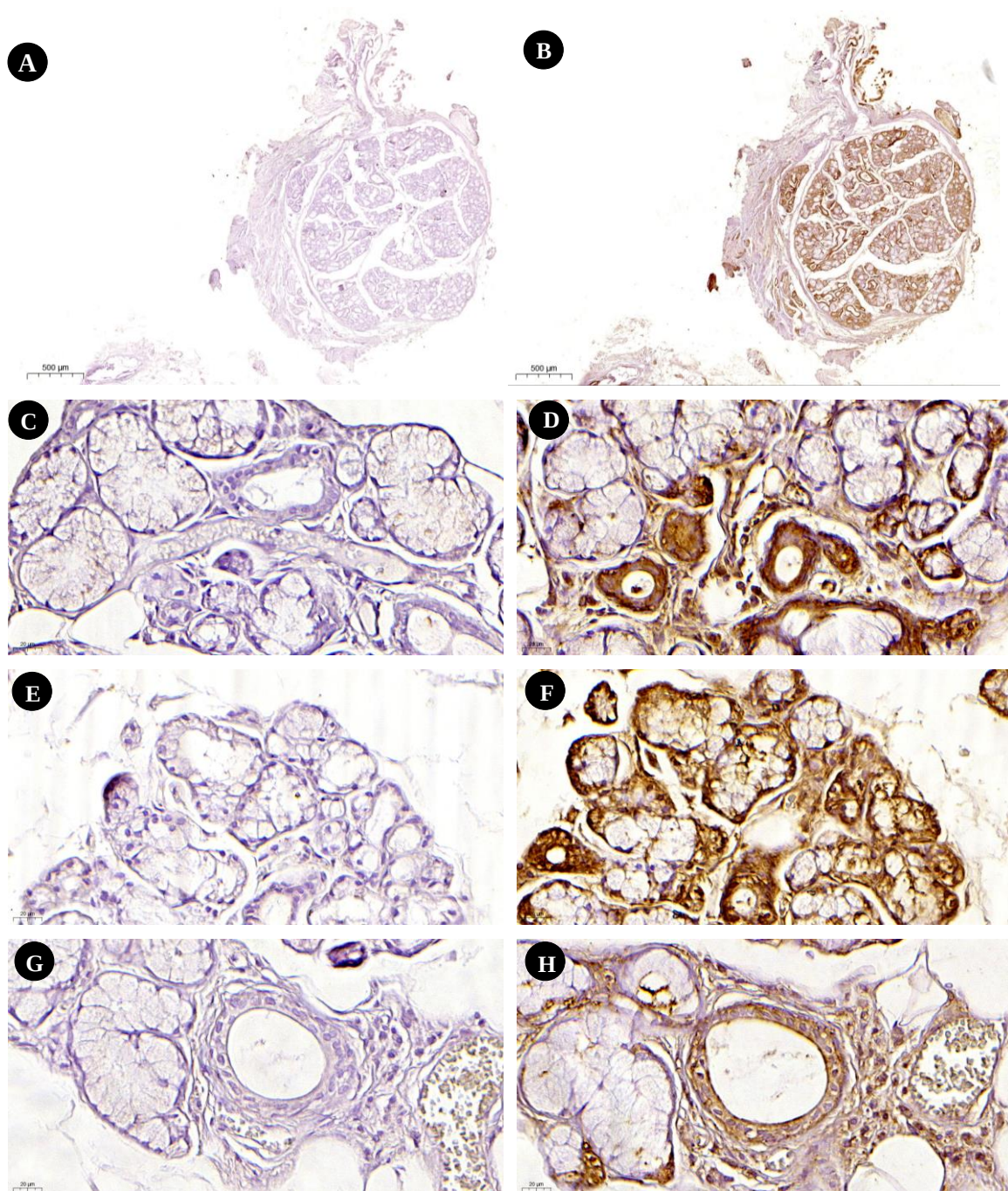


Fig.1 Nível sérico da IL-35 em pacientes com esclerose sistêmica (ES) X controles (CL).

Expressão de IL-17RA e IL-35 em glândulas salivares

A IL-35 foi marcada nos ductos glandulares, ácinos, vasos sanguíneos e células inflamatórias, das glândulas salivares menores de todos os pacientes ES. Apenas um paciente do grupo ES biopsiado, secretou IL-35 no soro. Não foi observado a imunorreatividade da IL-17RA nas amostras. Fotomicrografias representativas dos padrões de expressão de ambas proteínas são mostrados na figura (Fig. 2).



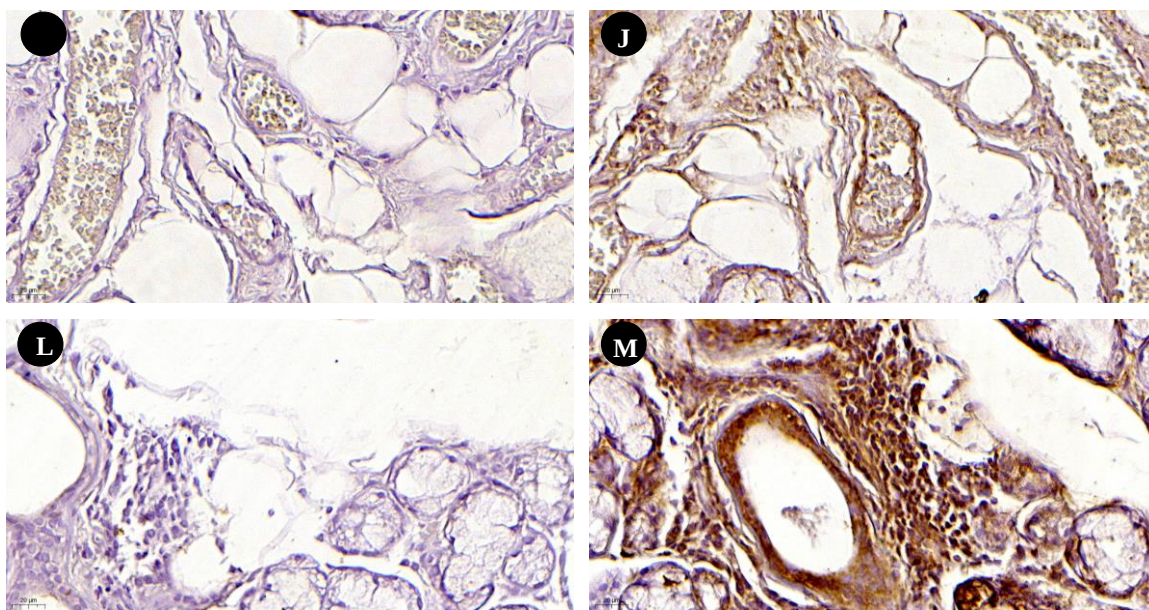


Fig.2 Expressão da IL-17RA: negativo (coluna à esquerda) e IL-35: positivo (coluna à direita) em glândulas salivares menores de pacientes com ES. (A-B) glândula salivar menor, (C-D) ácinos, ductos e vaso sanguíneo, (E-F) ácinos, (G-H) ductos, (I-J) vasos sanguíneos, (L-M) células inflamatórias. Magnificação x50 (A) – (B) ; Magnificação x400 (C) – (M).

A imunorreatividade da IL-35 foi alta em todas as estruturas morfológicas avaliadas (Tabela 2).

Tabela 2. Expressão (grau) de IL-35 em glândulas salivares menores dos pacientes com Esclerose Sistêmica (n=17): ducto(d), ácino(a), vaso sanguíneo(vs) e células inflamatórias (ci) [média $\pm$ dp, mediana (M)].

Variáveis	ES	
	Média $\pm$ dp	M
IL-35	2,65 $\pm$ 0,93	2,76
IL-35 d	2,98 $\pm$ 0,17	3
IL-35 a	2,81 $\pm$ 0,45	3
IL-35 vs	2,65 $\pm$ 0,58	3
IL-35 ci	2,65 $\pm$ 0,64	3

O FSR e teste de Schirmer no grupo controle apresentou valores mais altos em comparação com o grupo ES (FSR= 0,58 x 0,93 ; p=0.007) / teste de shirmer = 8 x 24; p<0.001).

DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo que determinou a expressão da interleucina-35 em glândulas salivares menores de indivíduos com esclerose sistêmica, evidenciando alta imunorreatividade nas estruturas glandulares. Estes achados reforçam linhas de evidências atuais quanto ao papel

da IL-35 na etiopatogênese da ES. Por outro lado, a IL-35 foi detectada no soro de apenas seis indivíduos com ES, demonstrando que estas dosagens podem não refletir a expressão clínica da doença.

(Dantas, Gonçalves et al., 2015), foi o primeiro estudo a relatar os níveis séricos elevados da IL-35, através da ELISA, em pacientes com ES (n=56) em comparação com um grupo controle de pacientes saudáveis (n=53), associando o nível sérico da interleucina com os parâmetros clínicos. No estudo, a IL-35 esteve associada à fibrose pulmonar. Esses achados foram posteriormente confirmados no estudo de (Tang, Lei et al., 2018), sugerindo que esta citocina pode ter um papel importante no curso fibrótico da doença.

Outro estudo, realizado por (Yayla, Torgutalp et al., 2018), também apresentaram níveis séricos elevados de IL-35 em pacientes com ES, quando comparado com indivíduos saudáveis. Entretanto, não houve associação entre os níveis séricos de IL-35 e o envolvimento de órgãos, como visto nos estudos anteriormente descritos. Os demais estudos sobre ES, com o mesmo objetivo, demonstraram níveis séricos elevados de IL-35 em comparação com indivíduos saudáveis (Tomcik, Zerr et al., 2015, Tang, Lei et al., 2018).

Diferente dos resultados encontrados nos estudos descritos, neste estudo, não houve diferença significativa ao determinar os níveis da IL-35 entre os pacientes com ES e pacientes saudáveis, uma vez que a maioria dos indivíduos não expressaram a interleucina no soro. Essa discrepância pode ser explicada devido a diferença dos Kits utilizados, que possuem níveis de detecção distintos.

Sabe-se que fibroblastos saudáveis aumentam a expressão de IL-35, devido ao fator de crescimento transformador beta (TGF- β), e a IL-35 também regula a expressão de colágeno ativando os fibroblastos. Dessa forma, pensa-se que há uma disfunção nessa via, e que a IL-35 possa ter um papel na fibrose da pele e pulmão na patogênese da ES, sendo um possível alvo terapêutico (Tomcik, Zerr et al. 2015).

A imunorreatividade da IL-35 no tecido glandular foi alta, sendo observada este padrão de marcação em todos os pacientes e em todas as estruturas avaliadas (ácinos, ductos, vasos sanguíneos e células inflamatórias). Esse achado sugere que as alterações morfofuncionais das glândulas salivares menores são alvo da via fisiopatológica da ES, podendo ser moduladas pela interleucina 35. Este é o primeiro trabalho na literatura a descrever tais resultados. Ainda não foi estudado o papel da IL-35 na fisiologia e nem no acometimento patológico das glândulas salivares.

Gonçalves, Pereira et al. 2018, em importante revisão sobre o papel da IL-17A na esclerose sistêmica, mostrou que indivíduos acometidos pela doença apresentam uma produção elevada de citocinas relacionadas a Th17, como por exemplo o fator de crescimento de transformação beta (TGF- β), tendo como hipótese, que a doença esteja fortemente relacionada a resposta imune da via Th17. Contudo, sabe-se que o real papel da IL-17A na ES ainda não está estabelecido.

(Olewicz-Gawlik, Danczak-Pazdrowska et al., 2014; Rolla, Fusaro et al., 2016) sugerem que a IL-17A desempenhe um papel fundamental no curso e patogênese da ES. Corroborando com os resultados propostos por Rolla, Fusaro et al., 2016, (Kurasawa, Hirose et al., 2000; Yang, Yang et al., 2014) observaram níveis séricos elevados da IL-17A nos pacientes com ES, e associados a algumas manifestações clínicas, como o comprometimento pulmonar e a extensão do comprometimento cutâneo (Murata, Fujimoto et al., 2008). Por outro lado, (Gourh, Arnett et al., 2009, Mathian, Parizot et al., 2012, Olewicz-Gawlik, Danczak-Pazdrowska et al., 2014) não observaram aumento da média dos níveis da IL-17A no soro de pacientes com ES, quando comparados a indivíduos saudáveis. No presente estudo, a IL-17A não foi detectada no soro dos pacientes com ES e nos indivíduos saudáveis.

De forma semelhante, não houve marcação da IL-17RA nos tecidos de glândulas salivares em pacientes com ES. Com um perfil patogênico distinto, pacientes com síndrome de Sjögren apresentam uma forte marcação para IL-17RA nas estruturas morfológicas das glândulas salivares menores (Weng, Liu et al., 2018). Esse achado sugere que a fisiopatologia do comprometimento glândular na ES parece ser distinto do que ocorre na SSj.

Os pesquisadores deste estudo realizaram um estudo prévio com o mesmo grupo de pacientes com ES (Gomes da Silva et al., 2019) e diagnosticaram 16 pacientes com SSj, de acordo com os critérios de diagnóstico para síndrome de Sjögren da American-European Consensus Group (Vitali, Bombardieri et al., 2002). No presente estudo, avaliando o mesmo grupo de pacientes e utilizando os critérios mais recentes da American-European Consensus Group (Shiboski, Shiboski et al., 2017) que levam em consideração os resultados da biópsia de glândula salivar, nenhum paciente fechou o critério para o diagnóstico da SSj. Dessa forma, apesar dos pacientes com ES apresentarem sintomas glândulares semelhantes à síndrome de Sjögren, os achados histopatológicos são distintos, sugerindo um processo fisiopatológico diferente.

A ausência de grupos controles para a imuno-histoquímica, como síndrome de Sjögren primária e síndrome Sicca, afim de determinar a presença da IL-35 nas glândulas salivares de pacientes com estas doenças, bem como os resultados encontrados na dosagem sérica das

interleucinas, são fatores limitantes do estudo. Contudo, os resultados encontrados fomentam a realização de maiores investigações a respeito da expressão da IL-35 em pacientes diagnosticados com ES.

Dessa forma, o presente estudo, demonstrou de forma pioneira a expressão de IL-35 em glândulas salivares em pacientes com ES, sugerindo sua participação na fisiopatologia da doença. Estudos futuros precisarão ser desenvolvidos para entender o real papel da IL-35 na esclerose sistêmica.

REFERÊNCIAS

- Baron, M., Hudson, M., Tatibouet, S., Steele, R., Lo, E., Gravel, S., ... Masetto, A. (2015). Relationship between disease characteristics and orofacial manifestations in systemic sclerosis: Canadian Systemic Sclerosis Oral Health Study III. *Arthritis care & research*, **67**(5), 681-690. doi: 10.1002/acr.22490.
- Daniels, T. E., D. Cox, C. H. Shiboski, M. Schiødt, A. Wu, H. Lanfranchi, H. Umehara, Y. Zhao, S. Challacombe and M. Y. Lam (2011). "Associations between salivary gland histopathologic diagnoses and phenotypic features of Sjögren's syndrome among 1,726 registry participants." *Arthritis & Rheumatism* **63**(7): 2021-2030.
- Dantas, A. T., S. M. C. Gonçalves, M. C. Pereira, R. S. G. Gonçalves, C. D. L. Marques, M. J. B. de Melo Rego, I. da Rocha Pitta, A. L. B. P. Duarte and M. G. da Rocha Pitta (2015). "Increased IL-35 serum levels in systemic sclerosis and association with pulmonary interstitial involvement." *Clinical rheumatology* **34**(9): 1621-1625.
- Ghom, A. G. and S. A. L. Ghom (2014). *Textbook of oral medicine*, JP Medical Ltd.
- Gomes da Silva, G. S., M. L. Maymone de Melo, J. C. Leão, A. T. Carvalho, S. Porter, A. L. B. P. Duarte, A. T. Dantas and L. A. Gueiros (2019). "Oral features of systemic sclerosis: A case-control study." *Oral diseases*.
- Gonçalves, R. S. G., M. C. Pereira, A. T. Dantas, A. R. d. Almeida, C. D. L. Marques, M. J. B. M. Rego, I. R. Pitta, A. L. B. P. Duarte and M. G. R. Pitta (2018). "IL-17 and related cytokines involved in systemic sclerosis: Perspectives." *Autoimmunity* **51**(1): 1-9.
- Gourh, P., F. C. Arnett, S. Assassi, F. K. Tan, M. Huang, L. Diekman, M. D. Mayes, J. D. Reveille and S. K. Agarwal (2009). "Plasma cytokine profiles in systemic sclerosis: associations with autoantibody subsets and clinical manifestations." *Arthritis research & therapy* **11**(5): R147.
- Hesselstrand, R., A. Scheja and A. Åkesson (1998). "Mortality and causes of death in a Swedish series of systemic sclerosis patients." *Annals of the rheumatic diseases* **57**(11): 682-686.
- Korn, J. H. (2003). "Scleroderma: a treatable disease." *Cleveland Clinic journal of medicine* **70**(11): 954-972.
- Kurasawa, K., K. Hirose, H. Sano, H. Endo, H. Shinkai, Y. Nawata, K. Takabayashi and I. Iwamoto (2000). "Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis." *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology* **43**(11): 2455-2463.
- LeRoy, E. C. and T. A. Medsger (2001). "Criteria for the classification of early systemic sclerosis." *The Journal of Rheumatology* **28**(7): 1573-1576.
- Mathian, A., C. Parizot, K. Dorgham, S. Trad, L. Arnaud, M. Larsen, M. Miyara, M. Hié, J.-C. Piette and C. Frances (2012). "Activated and resting regulatory T cell exhaustion concurs with high levels of interleukin-22 expression in systemic sclerosis lesions." *Annals of the rheumatic diseases* **71**(7): 1227-1234.

- Mieliauskaite, D., I. Dumalakiene, R. Rugiene and Z. Mackiewicz (2012). "Expression of IL-17, IL-23 and their receptors in minor salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome." *Clinical and Developmental Immunology* **2012**.
- Murata, M., M. Fujimoto, T. Matsushita, Y. Hamaguchi, M. Hasegawa, K. Takehara, K. Komura and S. Sato (2008). "Clinical association of serum interleukin-17 levels in systemic sclerosis: is systemic sclerosis a Th17 disease?" *Journal of dermatological science* **50**(3): 240-242.
- Ning-Wei, Z. (2010). "Interleukin (IL)-35 is raising our expectations." *Rev Med Chil* **138**(6): 758-766.
- Olewicz-Gawlik, A., A. Danczak-Pazdrowska, B. Kuznar-Kaminska, J. Gornowicz-Porowska, K. Katulska, D. Trzybulska, H. Batura-Gabryel, W. Silny, D. Poplawski and P. Hrycaj (2014). "Interleukin-17 and interleukin-23: importance in the pathogenesis of lung impairment in patients with systemic sclerosis." *International journal of rheumatic diseases* **17**(6): 664-670.
- Oliveira, H. F., T. R. de Souza, C. N. Carvalho, A. Duarte, A. T. Carvalho, J. C. Leão and L. A. Gueiros (2015). "Serologic profile and clinical markers of Sjögren syndrome in patients with rheumatoid arthritis." *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology* **119**(6): 628-635.
- O'Reilly, S., T. Hügle and J. M. Van Laar (2012). "T cells in systemic sclerosis: a reappraisal." *Rheumatology* **51**(9): 1540-1549.
- Rolla, G., E. Fusaro, S. Nicola, C. Bucca, C. Peroni, S. Parisi, M. C. Cassinis, A. Ferraris, F. Angelino and E. Heffler (2016). "Th-17 cytokines and interstitial lung involvement in systemic sclerosis." *Journal of breath research* **10**(4): 046013.
- Shiboski, C. H., S. C. Shiboski, R. Seror, L. A. Criswell, M. Labetoulle, T. M. Lietman, A. Rasmussen, H. Scofield, C. Vitali and S. J. Bowman (2017). "2016 ACR-EULAR Classification Criteria for primary Sjögren's Syndrome: A Consensus and Data-Driven Methodology Involving Three International Patient Cohorts." *Arthritis & rheumatology* (Hoboken, NJ) **69**(1): 35.
- Silvestre-Rangil, J., M. Martinez-Herrera and F.-J. Silvestre (2015). "Dental management of patients with microstomia. A review of the literature and update." *Journal of Oral Research* **4**(5): 340-350.
- Steen, V. D. and T. A. Medsger (2007). "Changes in causes of death in systemic sclerosis, 1972–2002." *Annals of the rheumatic diseases* **66**(7): 940-944.
- Tang, J., L. Lei, J. Pan, C. Zhao and J. Wen (2018). "Higher levels of serum interleukin-35 are associated with the severity of pulmonary fibrosis and Th2 responses in patients with systemic sclerosis." *Rheumatology international* **38**(8): 1511-1519.
- Tomcik, M., P. Zerr, K. Palumbo-Zerr, H. Storkanova, H. Hulejova, M. Spiritovic, O. Kodet, J. Stork, R. Becvar and J. Vencovsky (2015). "Interleukin-35 is upregulated in systemic sclerosis and its serum levels are associated with early disease." *Rheumatology* **54**(12): 2273-2282.
- Weng, X., Y. Liu, S. Cui and B. Cheng (2018). "The role of ROR α in salivary gland lesions in patients with primary Sjögren's syndrome." *Arthritis research & therapy* **20**(1): 205.
- Yang, X., J. Yang, X. Xing, L. Wan and M. Li (2014). "Increased frequency of Th17 cells in systemic sclerosis is related to disease activity and collagen overproduction." *Arthritis research & therapy* **16**(1): R4.
- Yayla, M. E., M. Torgutalp, İ. Okatan, E. U. Yurteri, O. Küçükşahin, A. B. K. Dinçer, E. G. A. Gülöksüz, S. Sezer, E. Us and T. M. Turgay (2018). "Serum Interleukin 35 Levels in Systemic Sclerosis and Relationship With Clinical Features." *Journal of clinical rheumatology: practical reports on rheumatic & musculoskeletal diseases*.
- Yenisey, M., Külünk, T., Kurt, Ş., & Ural, C. (2005). A prosthodontic management alternative for scleroderma patients. *Journal of oral rehabilitation*, 32(9), 696-700. doi.org/10.1111/j.1365-2842.2005.01474.x

APÊNDICE B – INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS

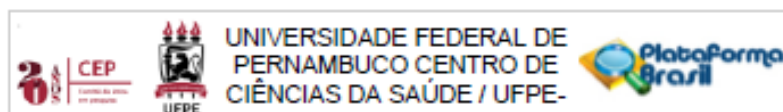
IDENTIFICAÇÃO									
Número da Ficha				Data de preenchimento	____ / ____ / ____	Sexo	1. Masculino 2. Feminino		
Nome do paciente									
Telefone				7. Idade (anos)		Raça	1. Branca 2. Negra 3. Parda	4. Indígena 5. Amarela	
CLASSIFICAÇÃO									
16. Forma Clínica					17. Tempo de Doença				
1. Cutânea Limitada 2. Cutânea Difusa 3. Sine Escleroderma 4. Overlap (EXCLUIR) 5. Localizada (EXCLUIR)					____ meses 1. < 2 anos 2. 2-5 anos 3. > 5 anos				
Comprometimento Sistemas									
1. Pele 2. Raynaud 3. Úlceras 4. Doença pulmonar intersticial					5. Hipertensão arterial pulmonar 6. Musculo-esquelético 7. Comprometimento esofageano 8. Renal				
Pele					Fenômeno de Raynaud objetivo				
1. Sim 2. Não					1. Sim 2. Não				
Úlceras digitais (prévias ou atuais)					Doença pulmonar intersticial (TC de tórax)				
1. Sim 2. Não					1. Sim 2. Não				
Hipertensão arterial pulmonar (ECO)					Artrite (atual)				
1. Sim 2. Não					1. Sim 2. Não				
Miopatia (elevação de enzimas)					Comprometimento esofageano				
1. Sim 2. Não					1. Sim 2. Não				
Crise renal									
1. Sim 2. Não									
	DIREITO				ESQUERDO				
	0	1	2	3	0	1	2	3	
Dedos									
Dorso das mãos									
Antebraço									
Braço									
Face									
Tórax anterior									
Abdome									
Coxa									
Perna									
Dorso dos pés									

				ESCORE DE RODNAN:	
MEDICAÇÕES (especificar a dose)					
1. Sim- atual 2. Não- parou há < 30 dias 3. Não- parou há > 30 dias 4. Nunca usou 5. Não sabe informar					
102. BCC ☐ Nifedipina ☐ Anlodipina ☐ Diltiazem ☐ Verapamil		103. IECA ☐ Captopril ☐ Enalapril		104. BRA ☐ Losartan ☐ Valsartan	
105. AAS ☐		106. Pentoxifilina ☐		107. Sildenafil ☐	
108. Bosentana ☐		109. Corticoide ☐ Prednisona ☐ Prednisolona ☐		110. Metotrexato ☐	
111. Azatioprina ☐		112. Micofenolato ☐		113. Ciclofosfamida VO ☐	
114. Ciclofosfamida EV Data da última aplicação: ____/____/____		115. IBP ☐ Omeprazol ☐ Pantoprazol		116. Procinético ☐ Bromoprida ☐ Domperidona	
117. AINE ☐		118. OUTROS (Especificar):			
EXAMES LABORATORIAIS (DATA:)					
Hb :		Albumina:		CPK:	
Ht:				PCR:	
				Creatinina:	
				VSH:	

Exame Oral	Lesão: 1. Sim 2 – Não
Candidose: 1. Sim 2 – Não	Língua despapilada: 1. Sim 2 – Não
Questionário de xerostomia	
1. Sinto minha boca seca ☐ Nunca ☐ Quase nunca ☐ ocasionalmente ☐ quase sempre ☐ sempre	
2. Tenho dificuldade em comer alimentos secos ☐ Nunca ☐ Quase nunca ☐ ocasionalmente ☐ quase sempre ☐ sempre	
3. Acordo a noite para beber água ☐ Nunca ☐ Quase nunca ☐ ocasionalmente ☐ quase sempre ☐ sempre	
4. Minha boca fica seca durante a alimentação ☐ Nunca ☐ Quase nunca ☐ ocasionalmente ☐ quase sempre ☐ sempre	
5. Eu molho a boca para facilitar a deglutição ☐ Nunca ☐ Quase nunca ☐ ocasionalmente ☐ quase sempre ☐ sempre	
6. Eu como balas e chicletes doces para aliviar a secura da boca ☐ Nunca ☐ Quase nunca ☐ ocasionalmente ☐ quase sempre ☐ sempre	
7. Tenho dificuldade em deglutir algumas comidas ☐ Nunca ☐ Quase nunca ☐ ocasionalmente ☐ quase sempre ☐ sempre	
8. A pele do meu rosto é ressecada	

4. Histopatologia:		Positivo ☐ Negativo ☐
Número de focos: _____		
5. Envolvimento de glândula salivar		Positivo ☐ Negativo ☐
Fluxo salivar não estimulado: _____ ml/min ($\leq 1,5$ ml em 15 min)		Positivo ☐ Negativo ☐
Sialografia da parótida mostrando sialectasias difusas, sem evidência de obstrução dos ductos maiores.		Positivo ☐ Negativo ☐
Cintigrafia salivar com atraso na captação, redução na concentração e/ou atraso na secreção do traçador.		Positivo ☐ Negativo ☐
6. Auto-anticorpos:		Positivo ☐ Negativo ☐
Presença de anti-Ro/SSA:	sim ☐ não ☐	Resultado: _____
Presença de anti-La/SSB:	sim ☐ não ☐	Resultado: _____
CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO – SÍNDROME DE SJÖGREN (ACR)		
1. Anti-SSA/Ro e/ou anti-SSB/La positivos ou FR positivo e título de ANA $\geq 1:320$		Positivo ☐ Negativo ☐
2. Biópsia da glândula salivar labial exibindo sialadenite linfocítica focal com uma pontuação ≥ 1 foco/4 mm ²		Positivo ☐ Negativo ☐
3. Queratoconjuntivite seca com o score de coloração ocular ≥ 3 (assumindo que o doente não usa colírios diários para glaucoma e não foi submetido a cirurgia oftalmológica nos últimos 5 anos).		Positivo ☐ Negativo ☐
AVALIAÇÃO DENTOFACIAL		
1. Mensuração da amplitude da abertura bucal:		_____ mm
Avaliação em mucosa		
Presença de telangiectasia	Sim ☐ Não ☐	
Presença de indentação em mucosa jugal	Sim ☐ Não ☐	

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DO PAPEL DA IL-17A E IL-35 NO COMPROMETIMENTO ORAL SECUNDÁRIO À ESCLEROSE SISTÊMICA.

Pesquisador: Guilherme Soares Gomes da Silva

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 74760017.4.0000.5208

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Patrocinador Principal: MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.337.192

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um trabalho que tem a finalidade de ser a Tese de Doutorado do cirurgião-dentista Guilherme Soares Gomes da Silva, pertencente ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, que tem como Orientador o Prof. Dr. Luiz Alcino Monteiro Gueiros e co-orientadora a Prof. Drª. Andrea Tavares Dantas, e buscará avaliar papel das interleucinas IL-17A e IL-35 na evolução do envolvimento oral em pessoas com Esclerose sistêmica.

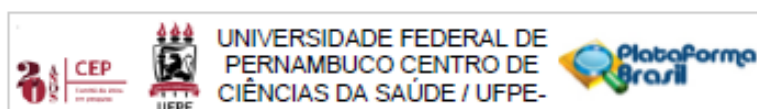
Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral: Avaliar o papel da IL-17A e IL-35 nas manifestações orofaciais da esclerose sistêmica (ES).

Objetivos específicos

- Avaliar o nível sérico de IL-17A e IL-35 em indivíduos portadores de ES;
- Avaliar a imunexpressão de IL-17A e IL-35 em glândulas salivares menores coletadas para fins de diagnóstico de síndrome de Sjögren secundária;
- Avaliar a associação entre os níveis séricos e expressão glandular de IL-17A e IL-35 com marcadores sistêmicos: Escore de Rodnan; Subgrupo clínico; Manifestações sistêmicas; Auto-anticorpos.
- Avaliar a associação entre os níveis séricos e expressão glandular de IL-17A e IL-35 com

Endereço: Av. de Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-500
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81) 2125-0588 E-mail: cepce@ufpe.br



Continuação do Parecer: 2.337.192

Indicadores de doenças orais: Distância interincisal; Parâmetros periodontais; Taxas de fluxo salivar; Diagnóstico de síndrome de Sjögren secundária.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos inerentes à pesquisa podem ser enumerados como aqueles pertinentes às intervenções clínicas como: irritação ocular (relacionada ao teste de Shimer), dor pós-operatória, parestesia do lábio inferior, infecção, edema, reações alérgicas (relacionados com a realização da biópsia de glândulas salivares menores) e desconforto no momento da coleta de sangue. O participante terá acesso à assistência integral de modo que todas as complicações serão prontamente atendidas pelo grupo envolvido na pesquisa, tendo o paciente amplo acesso às informações do tratamento caso assim deseje.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

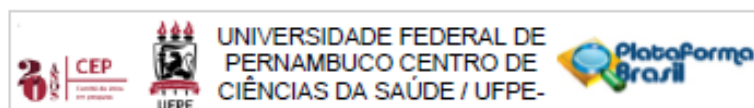
Será realizado um estudo caso-controle, composto por uma amostra de 63 indivíduos com diagnóstico de ES avaliados no serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas – UFPE no período de novembro/2017 a dezembro/2018. Ambulatório de Esclerose Sistêmica do Hospital das Clínicas – UFPE. O grupo controle será composto por 50 indivíduos saudáveis, selecionados na clínica de estomatologia/UFPE, pareados por sexo e idade, e que não apresentassem relato de doença autoimune, história de tabagismo, gravidez ou diabetes. No HC será realizado uma avaliação inicial do prontuário com revisão dos exames sorológicos seguida de exame clínico realizado por um reumatologista para confirmação dos dados clínicos. Depois, os participantes serão entrevistados para preenchimento de um prontuário de pesquisa para obtenção dos dados sociodemográficos, médicos, história da doença atual e condição orofacial. Serão avaliados a forma clínica, escore de Rodnan, esquema terapêutico e envolvimento sistêmico. Em seguida, serão submetidos a exame clínico orofacial detalhado, com determinação de avaliação periodontal, avaliação da abertura bucal, avaliação do fluxo salivar e avaliação do fluxo lacrimal. Quando houver suspeita de síndrome de Sjögren secundária, será realizada biópsia de lábio inferior caso haja dúvida na classificação da doença. Será realizado coleta de sangue para Dosagem sorológica das citocinas e a imunohistoquímica para os tecidos coletados.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O pesquisador responsável anexou os seguintes documentos conforme solicita a resolução nº466/12:

1- Carta de anuência da clínica de Estomatologia do Curso de Odontologia,

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-500
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8888 E-mail: cepcos@ufpe.br



Continuação do Parecer: 2.337.192

para o desenvolvimento no projeto.

- 2- Folha de rosto adequadamente preenchida e assinada;
- 3- Currículo lattes dos pesquisadores envolvidos no desenvolvimento do projeto;
- 5- Termo de compromisso e confidencialidade;
- 6- O orçamento e cronogramas estão adequados a proposta;
- 7- TCLE;
- 8- Declaração de Matrícula do pesquisador responsável no doutorado.
- 9- Carta de anuência do Centro de Ensino e Pesquisa de Laser em Odontologia;
- 10- Projeto World.

Recomendações:

Sem recomendação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O pesquisador responsável atendeu a todas os requisitos éticos necessários para o desenvolvimento da sua pesquisa, e o projeto poderá ser iniciado.

Considerações Finais a critério do CEP:

As exigências foram atendidas e o protocolo está APROVADO, sendo liberado para o início da coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio do Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP/CCS/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

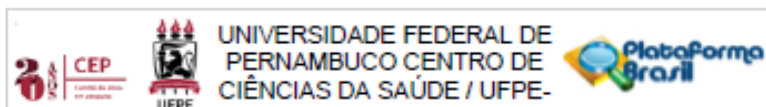
Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (Item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

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

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (Item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

O CEP/CCS/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-900
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (011)2125-0908 E-mail: cepccs@ufpe.br



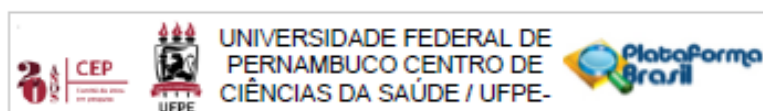
Continuação do Parecer: 2.337.192

pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PE_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_975349.pdf	16/10/2017 10:30:34		Aceito
Outros	Carta_resposta2.docx	16/10/2017 10:30:08	Gulherme Soares Gomes da Silva	Aceito
Outros	Carta_resposta.docx	09/10/2017 10:23:31	Gulherme Soares Gomes da Silva	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	Projeto.docx	09/10/2017 10:22:52	Gulherme Soares Gomes da Silva	Aceito
Investigador	TCLE.docx	09/10/2017 10:22:32	Gulherme Soares Gomes da Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência				
Outros	Declaracao_Doutorado.pdf	29/08/2017 22:07:36	Gulherme Soares Gomes da Silva	Aceito
Outros	termo_de_confidencialidade.pdf	29/08/2017 22:06:14	Gulherme Soares Gomes da Silva	Aceito
Outros	Lattes_AndreaDantas.pdf	20/08/2017 14:33:15	Gulherme Soares Gomes da Silva	Aceito
Outros	Lattes_LuizAlcino.pdf	20/08/2017 14:32:15	Gulherme Soares Gomes da Silva	Aceito
Outros	Lattes_GulhermeSoares.pdf	20/08/2017 14:31:00	Gulherme Soares Gomes da Silva	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	cartadeanuencia_reumatologia.pdf	20/08/2017 14:29:32	Gulherme Soares Gomes da Silva	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	cartadeanuencia_HC.pdf	20/08/2017 14:29:07	Gulherme Soares Gomes da Silva	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	cartadeanuencia_lab_ceplo.pdf	20/08/2017 14:28:40	Gulherme Soares Gomes da Silva	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	cartadeanuencia_estomatologia.pdf	20/08/2017 14:27:54	Gulherme Soares Gomes da Silva	Aceito

Endereço: Av. de Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-800
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81) 2126-0585 E-mail: cepcos@ufpe.br



Continuação do Parecer: 2.337.192

Cronograma	cronograma.docx	20/08/2017 14:25:46	Guilherme Soares Gomes da Silva	Aceito
Orçamento	orcamento.docx	20/08/2017 14:25:19	Guilherme Soares Gomes da Silva	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	20/08/2017 14:23:42	Guilherme Soares Gomes da Silva	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 19 de Outubro de 2017

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
(Coordenador)

Endereço: Av. de Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-500
UF: PE Município: RECIFE
Telefone: (81) 2125-8588 E-mail: cepce@ufpe.br