

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

GRAZIELA VIEIRA CAVALCANTI

**Análise da expressão de genes ligados ao
estresse de retículo endoplasmático em pacientes
com síndrome de Sjögren**

RIBEIRÃO PRETO

2023

GRAZIELA VIEIRA CAVALCANTI

**Análise da expressão de genes ligados ao
estresse de retículo endoplasmático em pacientes
com síndrome de Sjögren**

Versão corrigida

Versão original encontra-se na unidade que aloja o Programa de Pós-graduação

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Morfofisiologia de Estruturas Faciais.

**Orientador: Prof. Dr. Hilton
Marcos Alves Ricz**

RIBEIRÃO PRETO

2023

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Cavalcanti, Graziela Vieira

Análise da expressão de genes ligados ao estresse de retículo endoplasmático em pacientes com síndrome de Sjögren. / Graziela Vieira Cavalcanti; Orientador, Hilton Marcos Alves Ricz. Ribeirão Preto. - 2023.

110p.: 33il.; 30 cm

Tese (Doutorado) - Programa de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço. Área de Concentração: Morfofisiologia de Estruturas Faciais. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

1. Síndrome de Sjögren. 2. Doença autoimune. 3. Estresse do retículo endoplasmático. 4. Resposta a proteínas não-dobradas.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aluno: CAVALCANTI, Graziela Vieira

Título: Análise da expressão de genes ligados ao estresse de retículo endoplasmático em pacientes com síndrome de Sjögren.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Morfofisiologia de Estruturas Faciais.

Aprovada em: ____ / ____ / ____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico esta tese à minha mãe, professora e maior incentivadora aos meus estudos.

Agradecimentos

Aos pacientes que aceitaram participar deste estudo, contribuindo na pesquisa de conhecimentos que podem ajudar milhares de outras pessoas que passam pelos mesmos problemas.

Aos residentes de cirurgia de cabeça e pescoço que auxiliaram na coleta de material, possibilitando o andamento da pesquisa.

Aos colegas de especialidade do serviço, Fábio, Ronei, Silvia, Pedro, Mariana, por me auxiliarem no atendimento dos pacientes.

Aos técnicos de enfermagem do serviço de cirurgia de cabeça e pescoço, Eliane, Soninha, Patrícia e Luiz, por me ajudarem com a estrutura do espaço e recepção dos pacientes.

À secretária do serviço de cirurgia de cabeça e pescoço já aposentada, Lilian Martinez, que me auxiliou muito no processo de agendamento de pacientes, armazenamento e organização dos dados.

Ao senhor Abel, por me orientar sobre o processo de preparação das lâminas de patologia e à Muriel, por me ensinar o processo de Elisa dos anticorpos.

À Profa. Dra. Ana Carolina Fragoso Motta, pela amizade, disponibilidade para retirar dúvidas e auxílio na coleta de amostras.

À Dra Fabiola Reis de Oliveira por ajudar na coleta de dados e na classificação de pacientes, além da parceria de trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Conti de Freitas, meu primeiro orientador e atual coorientador, por sempre me incentivar a seguir pelo caminho da ciência e por idealizar este projeto de pesquisa.

Aos amigos biomédicos Rafael Ferraz e Naty, que prestaram fundamental apoio nas pesquisas em laboratório, sempre dispostos a tirar dúvidas e dividir seu tempo na elaboração deste projeto.

À Cici, responsável técnica do laboratório, sempre ajudando no pedido de materiais e orientando sobre a rotina do espaço.

À Maria Cecília Onofre, pela sua imensa contribuição na redação e impressão para a finalização da tese.

Ao Prof. Dr. Hilton Marcos Alves Ricz, meu orientador, pela paciência no processo de orientação.

Apoio Financeiro

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**), cujo apoio financeiro foi imprescindível para a execução deste projeto.

"Educação não transforma o mundo. Educação muda as pessoas. Pessoas transformam o mundo."

Paulo Freire

Resumo

CAVALCANTI, G.V. **Análise da expressão de genes ligados ao estresse de retículo endoplasmático em pacientes com síndrome de Sjögren.** 2023. 110f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2023.

Introdução: O estresse do retículo endoplasmático (ERE) e a Resposta às Proteínas Mal Dobradas, ou UPR (*Unfolded Protein Response*), consistem num mecanismo adaptativo de resposta ao acúmulo de proteínas mal dobradas no Retículo Endoplasmático (RE) que regula a síntese e liberação de proteínas, preservando a função da célula em situação de alta demanda proteica. BIP é a principal chaperona envolvida no ERE, pois permanece ligado a PERK, IRE1 α e ATF-6 numa condição de equilíbrio da célula. Porém no estado de ERE, BIP se dissocia dessas 3 proteínas, ativando a via da UPR. Doenças autoimunes estão associadas a um processo inflamatório crônico e ao estado de ERE; todavia pouco se sabe a respeito deste mecanismo na síndrome de Sjögren (SS). A SS ainda apresenta duas classificações, podendo ser primária (SS1), quando o paciente tem a condição isolada, ou secundária (SS2), quando o paciente apresenta SS associada a outras doenças autoimunes. Pacientes que possuem sintomas sugestivos de SS, mas não fecham os critérios diagnósticos, são classificados como síndrome Sicca. Nenhum estudo avaliou a condição do ERE e das 3 principais vias da UPR nos pacientes com SS diferenciando a expressão dos genes entre SS1 e SS2. Da mesma forma, nenhum estudo avaliou as diferenças entre SS e Sicca nas 3 principais vias da UPR. **Objetivos:** Avaliar a expressão de mRNA de genes relacionados ao ERE em pacientes com SS. Diferenciar a expressão do ERE na SS1 e SS2, entre SS e Sicca. **Casuística e Métodos:** Biópsias de glândula salivar menor foram coletadas em 45 pacientes com suspeita de SS e 13 controles saudáveis. As amostras foram submetidas à análise histopatológica para classificação diagnóstica e qPCR para avaliação da expressão do mRNA de PERK, XBP1, ATF-6, ATF-4, CANX, CALR, CHOP e BIP. **Resultados:** Vinte e nove pacientes classificados como SS apresentaram aumento da expressão de PERK, XBP1, CANX, CALR e BIP em detrimento do decréscimo de ATF-4, ATF-6 e CHOP. A SS1 evidenciou maior expressão de genes do ERE em número e grau que SS2 e Sicca. **Conclusões:** Os dados sugerem que existe ativação do ERE e da UPR na SS com diferenças entre SS1 e SS2, bem como diferença entre SS e Sicca, com maior expressão do ERE sobretudo nos pacientes com SS1.

Palavras-chave: Síndrome de Sjögren. Doença autoimune. Estresse do retículo endoplasmático. Resposta a proteínas mal dobradas.

Abstract

CAVALCANTI, G.V. **Gene expression of endoplasmic reticulum stress in Sjögren Syndrome' patients.** 2023. 110f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2023.

Introduction: Endoplasmic reticulum stress (ERS) and the Unfolded Protein Response (UPR) are an adaptive response mechanism to the accumulation of misfolded proteins in the Endoplasmic Reticulum (ER) that regulates the synthesis and release of proteins, preserving the function of the cell in a situation of high protein demand. BIP is the main chaperone involved in the ERS, as it remains bound to PERK, IRE1 α and ATF-6 in a balanced cell condition. However, in the ERS state, BIP dissociates from these 3 proteins, activating the UPR pathway. Autoimmune diseases are associated with chronic inflammatory process and ERS state; however, little is known about this mechanism in Sjögren's syndrome (SS). SS still has two classifications, which can be primary (SS1), when the patient has the isolated condition, or secondary (SS2), when the patient has SS associated with other autoimmune diseases. Patients who have symptoms suggestive of SS but do not meet the diagnostic criteria are classified as Sicca syndrome. No study has evaluated the condition of the ERS and the 3 main UPR pathways in patients with SS, differentiating gene expression between SS1 and SS2. Likewise, no study has evaluated the differences between SS and Sicca in the 3 main pathways of the UPR.

Objectives: The aim of this study was to evaluate mRNA expression of ERS-related genes in patients with SS, as well as differentiate ERS expression in SS1 and SS2, and between SS and Sicca. **Methods:** Minor salivary gland biopsies were collected from 45 patients with suspected SS and 13 healthy controls. The samples were submitted to histopathological analysis for diagnostic classification and qPCR to evaluate the mRNA expression of PERK, XBP1, ATF-6, ATF-4, CANX, CALR, CHOP and BIP. **Results:** Twenty-nine patients classified as SS showed increased expression of PERK, XBP1, CANX, CALR and BIP at the expense of decreased ATF-4, ATF-6 and CHOP. SS1 showed greater expression of ERS genes in number and degree than SS2 and Sicca. **Conclusions:** The data suggest that there is ERS and UPR activation in SS with differences between SS1 and SS2, as well as a difference between SS and Sicca, with greater ERS expression, especially in patients with SS1.

Keywords: Sjögren Syndrome. Autoimmune disease. Endoplasmic reticulum stress. Unfolded protein response.

Lista de Figuras

Figura 1 - Diagrama do <i>Van Bijsterveld Score</i>	33
Figura 2 - Diagrama do <i>Ocular Staining Score</i>	33
Figura 3 - Interação de BIP com IRE1 α , ATF-6 e PERK em condições com ERE e sem ERE	38
Figura 4 - Processador histológico Thermo Scientific Micron STP 120®.....	48
Figura 5 - Autoinclusor Thermo Scientific Micron EC 350-1®.....	49
Figura 6 - Micrótomo Leica RM2125 RTS®.....	50
Figura 7 - Recipientes para etapa de coloração	51
Figura 8 - Microscópio Nikkon eclipse E100®	52
Figura 9 - Tubos em isopor com gelo durante o processo de extração	53
Figura 10 - Tubos com amostra adicionada ao trizol	54
Figura 11 - Sistema de homogeneização OMNI-IN international TH ®	54
Figura 12 - SpectraMax M3 da Molecular Devices	55
Figura 13 - SpectraDrop™ Micro-Volume Microplate	55
Figura 14 - Termociclador C1000 Touch™ Thermal Cycler®.....	56
Figura 15 - Biópsia de glândula salivar menor <i>focus score</i> 4 de paciente do grupo SS1. A seta indica a área com presença de infiltração linfocítica >50 linfócitos em campo de 4 mm ² (focus 4).....	60
Figura 16 - Biópsia de glândula salivar menor <i>focus score</i> 0 de paciente do grupo Controle. Não se observou infiltração linfocítica.....	64
Figura 17 - Distribuição de PERK entre os quatro grupos (SS1, SS2, Sicca e controle)	67
Figura 18 - Distribuição de PERK entre os grupos Sjögren (SS1 + SS2) e não Sjögren (Sicca + controle)	67
Figura 19: Distribuição de XBP1 entre os quatro grupos (SS1, SS2, Sicca e controle)	69
Figura 20 - Distribuição de XBP1 entre o grupo Sjögren (SS1 + SS2) e não Sjögren (Sicca e Controle)	70

Figura 21 - Distribuição de BIP entre os quatro grupos (SS1, SS2 e Sicca).....	71
Figura 22 - Distribuição de BIP entre os grupos Sjögren (SS1 + SS2) e não Sjögren (Sicca).....	72
Figura 23 - Distribuição de CALR entre os quatro grupos (SS1, SS2, Sicca e controle)	73
Figura 24 - Distribuição de CALR entre os grupos Sjögren (SS1 + SS2) e não Sjögren (Sicca e Controle)	74
Figura 25 - Distribuição de CANX entre os quatro grupos (SS1, SS2, Sicca e controle)	75
Figura 26 - Distribuição de CANX entre os grupos Sjögren (SS1 + SS2) e não Sjögren (Sicca e Controle)	76
Figura 27 - Distribuição de ATF-4 entre os quatro grupos (SS1, SS2, Sicca e controle)	77
Figura 28 - Distribuição de ATF-4 entre os grupos Sjögren (SS1 + SS2) e não Sjögren (Sicca + Controle)	78
Figura 29 - Distribuição de ATF-6 entre os quatro grupos (SS1, SS2, Sicca e controle)	79
Figura 30 - Distribuição de ATF-6 entre os grupos Sjögren (SS1 + SS2) e não Sjögren (Sicca + Controle)	80
Figura 31 - Distribuição de CHOP entre os quatro grupos (SS1, SS2, Sicca e controle)	81
Figura 32 - Distribuição de CHOP entre os grupos Sjögren (SS1 + SS2) e não Sjögren (Sicca e Controle)	82
Figura 33 - Distribuição dos genes PERK, ATF-4, ATF-6, CHOP, CALR, CANX, XBP e BIP nos grupos SS1, SS2, Sicca e Controle	83

Lista de Tabelas

Tabela 1 -	Critérios de classificação do <i>American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism</i> para a síndrome de Sjögren primária.....	31
Tabela 2 -	Sequência de oligonucleotídeos usados para análise da expressão do ERE.....	57
Tabela 3 -	Distribuição dos pacientes de acordo com as variáveis sexo, idade, <i>focus score</i> , anti-Ro e fluxo de saliva no grupo SS1.....	61
Tabela 4 -	Distribuição dos pacientes de acordo com as variáveis sexo, idade, <i>focus score</i> , anti-Ro e fluxo de saliva no grupo SS2.....	62
Tabela 5 -	Distribuição dos pacientes de acordo com as variáveis sexo, idade, <i>focus score</i> , anti-Ro e fluxo de saliva no grupo Sicca.....	63
Tabela 6 -	Distribuição dos pacientes de acordo com as variáveis sexo, idade, <i>focus score</i> , anti-Ro e fluxo de saliva no grupo controle.....	65
Tabela 7 -	Distribuição das variáveis em cada grupo de estudo para o gene PERK.....	66
Tabela 8 -	Valores de P referentes às comparações entre os grupos para o gene PERK.....	66
Tabela 9 -	Distribuição de PERK nos grupos Sjögren (SS1 + SS2) e não Sjögren (Sicca + controle).....	66
Tabela 10 -	Distribuição de XBP1 em cada grupo de estudo.....	68
Tabela 11 -	Valores de P referentes às comparações entre os grupos em XBP1.....	68
Tabela 12 -	Distribuição de XBP1 nos grupos Sjögren (SS1 + SS2) e não Sjögren (Sicca + controle).....	69
Tabela 13 -	Distribuição de BIP em cada grupo de estudo.....	70
Tabela 14 -	Valores de P referentes às comparações entre os grupos em BIP.....	71
Tabela 15 -	Distribuição de BIP nos grupos Sjögren (SS1 + SS2) e não Sjögren (Sicca + controle).....	71
Tabela 16 -	Distribuição de CALR em cada grupo de estudo.....	72

Tabela 17 -	Valores de P referentes às comparações entre os grupos em CALR	73
Tabela 18 -	Distribuição de CALR nos grupos Sjögren (SS1 + SS2) e não Sjögren (Sicca + controle)	73
Tabela 19 -	Distribuição de CANX em cada grupo de estudo.....	74
Tabela 20 -	Valores de P referentes às comparações entre os grupos em CANX.....	75
Tabela 21 -	Distribuição de CANX nos grupos Sjögren (SS1 + SS2) e não Sjögren (Sicca + controle).....	75
Tabela 22 -	Distribuição de ATF-4 em cada grupo de estudo.....	76
Tabela 23 -	Valores de P referentes às comparações entre os grupos em ATF-4.....	77
Tabela 24 -	Distribuição de ATF-4 nos grupos Sjögren (SS1 + SS2) e não Sjögren (Sicca + controle).....	77
Tabela 25 -	Distribuição de ATF-6 em cada grupo de estudo.....	78
Tabela 26 -	Valores de P referente às comparações entre os grupos em ATF-6.....	79
Tabela 27 -	Distribuição de ATF-6 nos grupos Sjögren (SS1 + SS2) e não Sjögren (Sicca + Controle).....	79
Tabela 28 -	Distribuição de CHOP em cada grupo de estudo	80
Tabela 29 -	Valores de P referentes às comparações entre os grupos em CHOP	81
Tabela 30 -	Distribuição de CHOP nos grupos Sjögren (SS1 + SS2) e não Sjögren (Sicca + controle).....	81

Lista de Símbolos e Abreviaturas

ACOL	Ambulatório de Colagenases
ACR	American College of Rheumatology
AR	Artrite reumatoide
ATF-4	<i>Activating transcription factor 4</i>
ATF-6	<i>Activating transcription factor 6</i>
ATP	Adenosina trifosfato
BIP	<i>Binding Protein</i>
CALR	Calreticulina
CANX	Calnexina
CCP-HCFMRP-USP	Cirurgia de Cabeça e Pescoço do HCFMRP-USP
CHOP	<i>C/EBP- homologous protein</i> ou GADD153
CG	Complexo de Golgi
eIF2α	<i>Eukaryotic Translation Initiation Factor 2α</i>
ERAD	Degradação Associada ao Retículo Endoplasmático
ERE	Estresse do retículo endoplasmático
EULAR	<i>European League Against Rheumatism</i>
FMRP-USP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GSAL	Ambulatório de Glândulas Salivares
HCFMRP-USP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
HHV6	Herpesvírus humano tipo 6
HHV8	Herpesvírus humano tipo 8
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
HSP	<i>Heat Shock Proteins</i>

HTLV	Vírus do linfócito T humano
IFN	Interferon
IRE1α	<i>Inositol-requiring enzyme 1α</i>
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
NF-κB	Fator nuclear- κ B
OSS	<i>Ocular Staining Score</i>
PERK	<i>Protein endoplasmic reticulum kinase</i>
RE	Retículo Endoplasmático
Ro52	Isoforma de 52-KDa da proteína SSA/Ro
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
SICCA	<i>Sjögren's International Collaborative Clinical Alliance</i>
SS	Síndrome de Sjögren
SS1	Síndrome de Sjögren Primária
SS2	Síndrome de Sjögren Secundária
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TLR3	Receptor <i>Toll-like 3</i>
UPR	<i>Unfolded Protein Response</i>
vBS	<i>Van Bijsterveld Score</i>
XBP1	<i>X-Box Protein 1</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	24
1.1. Características clínicas da síndrome de Sjögren.....	29
1.2. Diagnóstico da síndrome de Sjögren.....	30
1.3. O estresse do retículo endoplasmático	35
1.4. Resposta a proteínas não dobradas.....	36
1.5. ERE e doenças autoimunes.....	39
2. OBJETIVOS.....	42
2.1. Objetivo geral	43
2.2. Objetivos específicos.....	43
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	44
3.1. Considerações éticas	45
3.2. População do estudo.....	45
3.3. Coleta de fluxo salivar	46
3.4. Análise de anticorpos	46
3.5. Biópsia de glândula salivar menor	47
3.6. Análise histopatológica.....	48
3.7. Identificação e armazenamento da glândula salivar menor	52
3.8. Extração de RNA.....	52
3.9. Qualidade e Concentração de RNA.....	55
3.10. Síntese de cDNA.....	56
3.11. qPCR	57
3.12. Análise estatística	58
4. RESULTADOS.....	59
4.1. Grupo Síndrome de Sjögren primária	60
4.2. Grupo Síndrome de Sjögren secundária.....	61
4.3. Grupo Sicca	62
4.4. Grupo controle.....	63
4.5. Análise dos genes do estresse do retículo endoplasmático.....	65
4.5.1. Expressão de PERK	65
4.5.2. Expressão de XBP1	68
4.5.3. Expressão de BIP	70
4.5.4. Expressão de CALR	72
4.5.5. Expressão de CANX.....	74
4.5.6. Expressão de ATF-4.....	76
4.5.7. Expressão de ATF-6.....	78
4.5.8. Expressão de CHOP.....	80
4.5.9. Expressão dos genes do ERE nos quatro grupos.....	82
5. DISCUSSÃO	84
6. CONCLUSÕES.....	91

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93
8. ANEXO.....	101
9. APÊNDICES	103

1- Introdução

Henrik Sjögren descreveu pela primeira vez, em 1933, uma série de pacientes com conjunto de sinais e sintomas que incluíam xerofthalmia, xerostomia e dor musculoesquelética, posteriormente denominado síndrome de Sjögren (SS) (SJÖGREN, 1933). A SS é uma doença autoimune que acomete as glândulas exócrinas, sobretudo as glândulas salivares e lacrimais, caracterizada por infiltração linfocítica, resultando em sintomas como ceratoconjuntivite sicca e boca seca (BRITO-ZERÓN *et al.*, 2016; SJÖGREN, 1933). É a segunda doença autoimune sistêmica mais comum, estando atrás apenas da artrite reumatoide (AR) (FLAMENT *et al.*, 2016). Ela pode ser classificada como primária (SS1) ou secundária (SS2). A SS1 ocorre de forma isolada, enquanto a SS2 ocorre em pacientes com outras doenças reumáticas autoimunes associadas, como lúpus eritematoso sistêmico (LES), AR ou esclerose sistêmica (ES) (BJORDAL *et al.*, 2020; BRITO-ZERÓN *et al.*, 2016). Em pacientes com doenças autoimunes, a proporção de casos com SS2 varia conforme a condição associada, sendo de 14-18% de pacientes com LES, 7-17% com AR e 12% com ES (BRITO-ZERÓN *et al.*, 2016). Os pacientes sem critérios diagnósticos para a SS são descritos como portadores de sintomas Sicca. A denominação Sicca surgiu a partir da Sjögren's International Collaborative Clinical Alliance (SICCA), que compreende um extenso grupo de pesquisadores que realiza estudos em pacientes com sintomas de SS desde 2003 (SHIBOSKI *et al.*, 2017; SHIBOSKI, 2020).

A incidência de SS está em torno de três a 11 casos por 100.000 pessoas, enquanto a prevalência varia de 0,01% a 0,72% (BRITO-ZERÓN *et al.*, 2016). A doença pode ocorrer em qualquer idade ou sexo, mas acomete principalmente as mulheres com idade entre 30 e 50 anos, com proporção de nove mulheres para um homem (BRITO-ZERÓN *et al.*, 2016). Os homens, geralmente, desenvolvem sintomas oculares mais graves enquanto que as mulheres apresentam mais manifestações sistêmicas (BRITO-ZERÓN *et al.*, 2016). O aumento de volume das glândulas parótidas é mais predominante nas crianças, enquanto os idosos apresentam mais acometimento pulmonar (BRITO-ZERÓN *et al.*, 2016; FLAMENT *et al.*, 2016).

Os mecanismos subjacentes da SS não são totalmente compreendidos, mas acredita-se que envolva uma combinação de fatores genéticos e ambientais (BRITO-

ZERÓN *et al.*, 2016). Infecções virais são um dos fatores etiológicos atribuídos à SS. Entre os vírus associados à SS estão a família *herpesviridae*, como o vírus Epstein-Barr e o herpesvírus humano tipo 6 (HHV6) e tipo 8 (HHV8), o vírus do linfócito T humano (HTLV), o citomegalovírus, o vírus da hepatite C, elementos retrovirais e sequências de *coxsackie vírus* (BRITO-ZERÓN *et al.*, 2016; DUPIN *et al.*, 1996; FOX; PEARSON; VAUGHAN, 1986; SHATTLES *et al.*, 1992; SHILLITOE *et al.*, 1982; TRIANTAFYLLOPOULOU; TAPINOS; MOUTSOPOULOS, 2004; TZIOUFAS; KAPSOGEORGOU; MOUTSOPOULOS, 2012).

A arquitetura genética da SS permanece ainda pouco conhecida. Estudos demonstram que cerca de 35% dos pacientes com SS possuem algum familiar com SS ou doença autoimune relacionada; e ter um gêmeo com SS aumenta em 662 vezes o risco de desenvolver a doença (KUO *et al.*, 2015; REVEILLE *et al.*, 1984). A SS está relacionada à frequência aumentada de HLA-B8, HLA-Dw3 e HLA-DR3 (FYE *et al.*, 1978; MANN; MOUTSOPOULOS, 1983; WILLIAMS *et al.*, 2007). A maioria dos pacientes com SS, independente de etnia, carrega o alelo DQA1*0501, sugerindo que ele pode ser um fator determinante de certos indivíduos para desenvolver SS1 (REVEILLE *et al.*, 1991).

A teoria da “Epitelite Autoimune” sugere que o epitélio é o tecido inflamado na SS (BRITO-ZERÓN *et al.*, 2016). Estudos morfológicos *in situ* e análises *in vitro* de células epiteliais de glândula salivar de pacientes com SS revelaram que essas células são capazes de mediar o desenvolvimento, a manutenção e progressão das respostas inflamatórias autoimunes locais (BRITO-ZERÓN *et al.*, 2016; TZIOUFAS; KAPSOGEORGOU; MOUTSOPOULOS, 2012).

A apoptose tem sido descrita como um mecanismo etiopatogenético associado ao comprometimento da função secretora das glândulas. Em modelos experimentais de camundongos que tiveram a expressão do fator nuclear- κ B (NF- κ B) inibidor- ζ silenciada em células epiteliais da glândula lacrimal, observou-se aumento da apoptose das células epiteliais e o surgimento de lesão inflamatória tipo SS. Essas características foram associadas com altos títulos de anticorpos anti-Ro/SSA e anti-La/SSB, denominados, a seguir, simplesmente de anti-Ro e anti-La, marcadores diagnósticos da SS, que puderam ser revertidos pelo tratamento dos

camundongos com bloqueadores de apoptose inibidoras de caspases (MANGANELLI; FIETTA, 2003; OKUMA *et al.*, 2013).

Entre as moléculas expressas pelas células epiteliais das glândulas salivares estão o HLA (Antígeno Leucocitário Humano) classe I, a superfamília de receptores do fator de necrose tumoral (TNF) membro 5 (também conhecido como CD40, uma proteína coestimuladora envolvida na apresentação de antígenos), moléculas de adesão, moléculas relacionadas com a apoptose, o receptor de TNF membro da superfamília 6 (também conhecido como receptor FAS) e o membro 6 da superfamília de ligantes TNF (também conhecido como FAS ligante), citocinas pró-inflamatórias, citocinas envolvidas na diferenciação de células linfoides e muitas quimiocinas que atraem células T e formam o centro germinativo, isto é, locais em órgãos linfoides secundários onde as células B maturam. A expressão dessas moléculas pelas células epiteliais das glândulas salivares é regulada positivamente pelas citocinas secretadas pelas células imunes, que infiltram as lesões teciduais, sugerindo interação anormal entre células epiteliais das glândulas salivares e células imunes na SS (BRITO-ZERÓN *et al.*, 2016; MANOUSSAKIS; KAPSOGEORGOU, 2010; TZIOUFAS; KAPSOGEORGOU; MOUTSOPOULOS, 2012).

Estudos revelaram que as células epiteliais glandulares expressam moléculas que são indicativas da assinatura de interferon (IFN) tipo I (predominantemente IFN β) e IFN tipo II (predominantemente IFN γ), enquanto que as células imunes expressam moléculas típicas para uma assinatura IFN tipo II (IFN γ) (BRITO-ZERÓN *et al.*, 2016; HALL *et al.*, 2012; KYRIAKIDIS *et al.*, 2014). As respostas imunes aberrantes das glândulas salivares, caracterizadas por uma assinatura de IFN tipo I, incluindo a superexpressão de genes induzíveis por IFN tipo I, como o IFN estimulado por fator de transcrição 3 γ e induzido por IFN proteínas transmembrana, apoiam ainda mais a implicação da infecção viral na patogênese da SS (BRITO-ZERÓN *et al.*, 2016; GOTTENBERG *et al.*, 2006; TZIOUFAS; KAPSOGEORGOU; MOUTSOPOULOS, 2012). Alguns genes envolvendo a resposta imune também estão substancialmente envolvidos na SS, particularmente aqueles que influenciam a resposta do IFN tipo I e tipo II (IRF5, IL12A e STAT4), sinalização NF- κ B (TNIP1, TNFAIP3) e tráfego linfocitário (CXCR5) (LESSARD *et al.*, 2013; NORDMARK *et al.*, 2009).

A assinatura IFN nas lesões das glândulas salivares em pacientes com SS, a alta expressão do receptor Toll-like 3 (TLR3) nas células epiteliais das glândulas salivares e a capacidade de resposta à sinalização TLR3 por essas células apoiam ainda mais a implicação da infecção viral na patogênese da SS (BRITO-ZERÓN *et al.*, 2016). A ativação da via de sinalização TLR3 leva à hipofunção das glândulas salivares, apoptose e apresentação dos autoantígenos Ro/SSA e La/SSB (KYRIAKIDIS *et al.*, 2014; MANOUSSAKIS; KAPSOGEORGOU, 2010; TZIOUFAS; KAPSOGEORGOU; MOUTSOPOULOS, 2012).

A robusta associação genética entre moléculas HLA classe I e classe II e a patogênese da SS sugere fortemente o envolvimento de células T nessa ativação imune. Linfócitos T que secretam IFN γ e IL-17 foram detectados em glândulas salivares de pacientes com SS e estão associados com dano tecidual (BIKKER *et al.*, 2010; NGUYEN *et al.*, 2008). Citocinas IL-7 estão superexpressas nas células epiteliais das glândulas salivares (BIKKER *et al.*, 2010). A sinalização imunológica inata via ativação de TLR, como aquela induzida por infecções virais, pode induzir a produção de IL-7 pelas células epiteliais das glândulas salivares, células dendríticas ou células endoteliais (BIKKER *et al.*, 2010; JIN *et al.*, 2013). A IL-7 pode direcionar células T efetoras para induzir sialoadenite em ratos (JIN *et al.*, 2013). Outras citocinas superexpressas nas glândulas salivares de pacientes com SS (como IL-7, IL-17, IL-21, IL-22 e IL-23) demonstraram contribuir para a resposta anormal de células T e células B e podem desempenhar papel crucial na SS, aumentando o risco de neoplasia linfóide (ALUNNO *et al.*, 2015; HILLEN *et al.*, 2014).

O aumento de citocinas como resultado de resposta anormal dos linfócitos T e B a autoantígenos, como as partículas de ribonucleoproteínas Ro/SSA e La/SSB, expressas pelo epitélio das glândulas exócrinas, leva à inflamação crônica das glândulas salivares e eventual perda das suas funções fisiológicas (BRITO-ZERÓN *et al.*, 2016; TZIOUFAS; KAPSOGEORGOU; MOUTSOPOULOS, 2012). Demonstrou-se que células epiteliais das glândulas salivares ativam células T CD4+ *in vitro* e mediam sua diferenciação em células foliculares T auxiliares, que por sua vez aumentam a sobrevivência de células B (BRITO-ZERÓN *et al.*, 2016; MANOUSSAKIS; KAPSOGEORGOU, 2010; TZIOUFAS; KAPSOGEORGOU; MOUTSOPOULOS, 2012). A exposição crônica a autoantígenos e a ativação imune

são dois fatores da SS que podem promover a linfomagenese. O achado de estruturas similares aos centros germinativos dentro dos sítios mucosos da glândulas exócrinas é um fator de risco para o desenvolvimento de linfomas (THEANDER *et al.*, 2011).

As células T reguladoras prevalecem nas lesões intermediárias, enquanto sua baixa incidência infiltrando as glândulas salivares menores correlaciona-se com o aumento das glândulas parótidas e hipocomplementemia C4, que são indicadores adversos para o desenvolvimento de linfoma (CHRISTODOULOU *et al.*, 2008; RAMOS-CASALS *et al.*, 2005; TZIOUFAS; KAPSOGEORGOU; MOUTSOPOULOS, 2012). A expressão de IL-12 tem sido correlacionada negativamente, enquanto a expressão de IL-18 tem sido correlacionada positivamente ao aumento das glândulas parótidas e hipocomplementemia C4, sugerindo que a IL-18 é um marcador prognóstico para desenvolvimento de linfoma (TZIOUFAS; KAPSOGEORGOU; MOUTSOPOULOS, 2012).

1.1 Características clínicas da síndrome de Sjögren

A SS é uma doença autoimune progressiva, lenta, com manifestações clínicas muito variáveis, desde sintomas órgão específicos à doença sistêmica e condições linfoproliferativas. Entre os sintomas mais comuns estão o de olho seco e boca seca (BRITO-ZERÓN *et al.*, 2016). Cerca de um terço dos pacientes queixam de aumento das parótidas, sendo mais comum em pacientes jovens (AFRAMIAN *et al.*, 2013). Os sintomas secos podem afetar também a via aérea superior causando rinite sicca, tosse e rouquidão persistentes. Muitos pacientes podem apresentar xerose cutânea, isto é, pele seca, que pode acometer de 23-68% deles, e as mulheres podem referir também secura vaginal (ALBRECHT *et al.*, 2006; BRITO-ZERÓN *et al.*, 2016). Cerca de 50-60% dos pacientes podem desenvolver sintomas sistêmicos. Manifestações clínicas graves são descritas em torno de 15-20% dos pacientes, enquanto a prevalência de linfoma é estimada em torno de 5% (BALDINI *et al.*, 2014).

Os sintomas gerais comuns da SS incluem febre, fadiga e perda de peso. Entre as complicações cutâneas, o eritema anular pode acometer 9% dos pacientes e a vasculite cutânea até 10%. Esta inclui vários subtipos de lesões,

predominantemente a púrpura, observada em pacientes com hipergamaglobulinemia. Artralgia pode ser um sintoma em até 60-70% dos pacientes com SS, enquanto mialgia pode chegar a 20-40%. Sinovite subclínica é frequentemente observada em ultrassom musculoesquelético de pacientes com SS, podendo chegar a 30% dos casos (BRITO-ZERÓN *et al.*, 2016).

O envolvimento do sistema pulmonar é observado em até 16% dos pacientes com SS, mas raramente é clinicamente relevante. Entre as complicações pulmonares no paciente com SS estão doença pulmonar intersticial, bronquiectasias, pleurite e doença pulmonar obstrutiva crônica (FLAMENT *et al.*, 2016). Já o sistema renal pode ser afetado por nefrite intersticial, glomerulonefrite em até 4% dos pacientes, acidose tubular renal em até 9%, cistite intersticial, osteomalácia ou cólicas renais por calculose.

Os sistemas nervosos central e periférico podem ser afetados pela SS. A prevalência das manifestações neurológicas na SS varia de 8 a 49% (MARGARETTEN, 2017). Cerca de 10% dos pacientes desenvolvem neuropatia periférica, sendo a neuropatia sensorial a mais comum, como neuralgia do trigêmeo, polineuropatia axonal sensitiva e síndrome do túnel do carpo (MARGARETTEN, 2017). O envolvimento do sistema nervoso central pode chegar a 3% e incluir mielite, meningite asséptica e lesões cerebrais que mimetizam a esclerose múltipla (BRITO-ZERÓN *et al.*, 2016).

Entre as complicações cardiovasculares, o fenômeno de Raynaud pode afetar até 13% dos pacientes. Pericardite, disautonomia, hipertensão arterial pulmonar e vasculite crioglobulinêmica são outras complicações da SS. Entre as complicações hematológicas, a SS pode cursar com anemia hemolítica, leucopenia (linfopenia e neutropenia), trombocitopenia, púrpura trombocitopênica trombótica, síndrome de Evans e linfoma de células B (BRITO-ZERÓN *et al.*, 2016). Entre os sintomas gastrointestinais, estão pancreatite aguda recorrente e enteropatia perdedora de proteínas (BRITO-ZERÓN *et al.*, 2016; RAMOS-CASALS, 2004).

1.2 Diagnóstico da síndrome de Sjögren

Devido à dificuldade de diagnóstico e classificação para a SS, em 2016 foi publicado o consenso da *American College of Rheumatology* (ACR) e da *European League Against Rheumatism* (EULAR) com critérios de classificação para SS1. Este consenso de 2016 leva em conta cinco critérios, cada um com um peso de pontuação. A presença de quatro pontos já classifica o paciente com SS1, desde que o mesmo preencha os critérios de inclusão e exclusão (Tabela 1).

Tabela 1 - Critérios de classificação do *American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism* para a síndrome de Sjögren primária

Item	Pontuação
Glândula salivar labial com sialoadenite linfocítica focal e <i>focus score</i> ≥ 1 foco /4 mm ²	3
Anti-Ro positivo	3
<i>Ocular Staining Score</i> ≥ 5 (ou <i>van Bijsterveld score</i> ≥ 4) em pelo menos um olho	1
Teste de Schirmer ≤ 5 mm/5 minutos em pelo menos um olho	1
Fluxo total de saliva não estimulada $\leq 0,1$ mL/minuto	1

A biópsia de glândula salivar é um dos critérios que mais pontua, pois avalia o número de linfócitos por área de tecido. A presença de focos de 50 linfócitos/ 4mm² contabiliza um *focus score*. A presença de pelo menos um *focus score* já soma três pontos. A presença do anticorpo anti-Ro é o segundo critério que mais pontua. Quando o anticorpo é positivo, somam-se mais três pontos. O anticorpo anti-La não foi incluído na classificação, pois os estudos revelaram que a presença dele com o anti-Ro negativo não mostrava associação com a SS. O fator antinúcleo e o fator reumatoide também foram excluídos baseando-se em análises mostrando que o número extremamente pequeno de pacientes com anti-Ro negativos apresentavam estes outros dois fatores positivos (RASMUSSEN *et al.*, 2014; SHIBOSKI *et al.*, 2017).

O teste de avaliação do olho seco é o terceiro critério. Trata-se de um exame que avalia o nível de ressecamento ocular pelo grau de desvitalização das células

da superfície da córnea ou conjuntiva. A avaliação pode ser feita usando a Pontuação de Coloração Ocular, em inglês, Ocular Staining Score (OSS), ou a Pontuação de Van Bijsterveld, em inglês, *Van Bijsterveld Score* (vBS) (RASMUSSEN *et al.*, 2019; VAN BIJSTERVELD, 1969). Ambos os testes calculam o número de erosões epiteliais puntiformes e são realizados sem preparo, com uso de colírio de fluoresceína para avaliação da córnea, ou lisamina verde para avaliação da conjuntiva (RASMUSSEN *et al.*, 2019). A análise do número e da localização das lesões é realizada por meio de biomicroscopia (exame da lâmpada de fenda).

O olho é dividido em três sessões: conjuntiva bulbar medial, conjuntiva bulbar lateral e córnea. Cada sessão pode pontuar até 3, com máximo de nove pontos. O sistema de vBS vai de 0 a 3 para cada sessão, sendo 0 para ausência de coloração, 1 para poucos pontos de erosão, 2 para muitos pontos e 3 para áreas confluentes (Figura 1) (VAN BIJSTERVELD, 1969). O OSS, no entanto, calcula os pontos baseado no número de erosões em cada olho (Figura 2). Para o teste de fluoresceína na córnea, o OSS pontua 0 na ausência de coloração, um ponto para uma a cinco erosões, dois pontos para seis a 30 erosões, três pontos para mais de 30 erosões. A coloração da lisamina verde é pontuada de forma semelhante na conjuntiva interpalpebral no sistema do OSS: zero para 0 a 9 pontos de coloração de lisamina, um ponto para 10 a 32 erosões, dois pontos para 33 a 100 erosões, três pontos para mais de 100 erosões. O OSS ainda adiciona três itens de pontuação, podendo chegar a 12 pontos: um ponto para coloração pupilar (erosão nos 4 mm centrais da córnea), um ponto para presença de um ou mais filamentos na córnea e um ponto para áreas de coloração confluyente. O vBS é considerado positivo para olho seco se pontuar ≥ 4 . O OSS é considerado positivo se pontuar ≥ 5 em cada olho pelo novo critério ACR/ EULAR (RASMUSSEN *et al.*, 2019; SHIBOSKI *et al.*, 2017). A presença de OSS ou vBS positivo pontua 1 na classificação de SS (SHIBOSKI *et al.*, 2017).

Figura 1 - Diagrama do Van Bijsterveld Score

Van Bijsterveld Score	
Conjuntiva (Lisamina Verde*) e Córnea (Fluoresceína)	
Pontuação	Erosões
0	Nenhuma
1	Poucas
2	Muitas
3	Confluentes

*Lisamina Verde ou Rosa Bengala

Positivo ≥4

Fonte: Adaptado de Rasmussen *et al.* (2019).

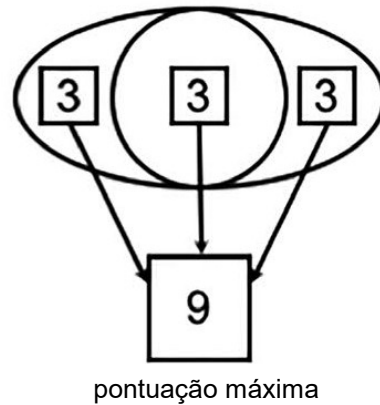


Figura 2 - Diagrama do Ocular Staining Score

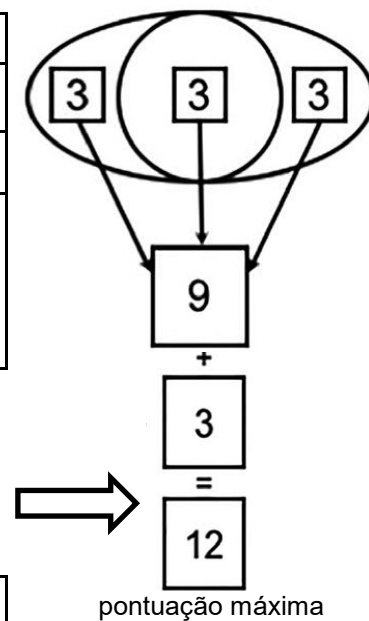
Ocular Staining Score			
Conjuntiva: Lisamina verde		Córnea: Fluoresceína	
Grau	Erosões	Grau	Erosões
0	0-9	0	0
1	10-32.	1	1-5.
2	33-100	2	6-30.
3	>100	3	>30

Coloração em pontos confluentes = +1

Coloração na córnea central = +1

1 ou mais filamentos = +1

Positivo ≥5



Fonte: Adaptado de Rasmussen *et al.* (2019). pontuação máxima

O teste de Schirmer é o quarto critério e ele serve para avaliar a produção lacrimal, especialmente em pacientes com queixa de ceratoconjuntivite seca, olho seco ou superprodução lacrimal (BROTT; RONQUILLO, 2022; SHIBOSKI *et al.*, 2017). A técnica consiste em alojar uma fita de papel milimetrada no canto lateral da pálpebra inferior e contabilizar o comprimento da área umedecida da tira de papel num período de cinco minutos. Uma medida ≤ 5 mm/5 minutos em cada olho é considerada positiva para olho seco. Uma medida maior que 10 mm em cinco minutos considera-se normal (BROTT; RONQUILLO, 2022) A presença de pelo menos um olho com teste de Schirmer ≤ 5 mm/5 minutos acrescenta um ponto na classificação (SHIBOSKI *et al.*, 2017).

O fluxo de saliva é o quinto critério da classificação. Existem dois métodos para coleta do fluxo de saliva não estimulado: o método de drenagem e o de esputação (NAVAZESH, 1993). O método de drenagem consiste em que a saliva escorra do lábio inferior para um recipiente pré-pesado ou tubo de ensaio graduado equipado com um funil e o sujeito expela no tubo de ensaio ao final do período de coleta (NAVAZESH, 1993). No método de esputação, permite-se que a saliva se acumule no assoalho da boca e o indivíduo expela no tubo de ensaio pré-pesado ou graduado a cada 60 segundos durante um período de cinco minutos (NAVAZESH, 1993). A presença de fluxo de saliva $\leq 0,1$ mL/min acrescenta mais um ponto na classificação (SHIBOSKI *et al.*, 2017).

Os critérios de inclusão para classificação são aplicados a qualquer paciente com pelo menos um sintoma de olho seco ou boca seca, definido com resposta positiva a pelo menos uma das seguintes questões: 1) Você teve incômodo de olho seco diário e persistente e por mais de três meses? 2) Você tem uma sensação recorrente de areia ou cascalho nos olhos? 3) Você usa substitutos lacrimais mais de três vezes ao dia? 4) Você já teve sensação diária de boca seca por mais de três meses? 5) Você costuma beber líquidos para ajudar a engolir alimentos secos? ou em quem há suspeita de SS pelo Questionário do Índice de Atividade de Doença SS pela EULAR (pelo menos um domínio com item positivo) (SHIBOSKI *et al.*, 2017).

Os critérios de exclusão incluem diagnóstico prévio de qualquer uma das seguintes condições, o que excluiria o diagnóstico de SS e a participação em estudos SS ou ensaios terapêuticos devido às características clínicas sobrepostas

ou interferência com testes de critérios: 1) história de tratamento com radiação de cabeça e pescoço, 2) infecção ativa por hepatite C (com confirmação por reação em cadeia da polimerase, 3) Síndrome da Imunodeficiência Humana, 4) sarcoidose, 5) amiloidose, 6) doença do enxerto contra o hospedeiro, 7) doença relacionada à IgG4 (SHIBOSKI *et al.*, 2017).

Existem várias etiologias para os sintomas de olho seco e boca seca que não a SS, por isso a importância da avaliação adequada para excluir os diagnósticos diferenciais. Há várias drogas que causam redução do fluxo salivar, como anti-histamínicos, anticolinérgicos, antidepressivos tricíclicos, diuréticos, broncodilatadores, neurolépticos, ansiolíticos, anti-hipertensivos, opioides, supressores do apetite, IFN e triptanos. Muitas doenças também podem causar xerostomia e xerofthalmia, como doenças metabólicas (diabetes, anemia, hipercalcemia, disfunção tireoidiana, doença renal crônica, hipovitaminoses, hemodiálise e hipoandrogenemia), fatores ambientais (radioterapia, queimaduras, cicatrizes, tabagismo, uso de lentes de contato, baixa umidade do ar e trabalho prolongado no computador), sialolitíase, sialoadenite, fatores hereditários (disautonomia familiar e alacrimia congênita), doenças neuropsiquiátricas (Alzheimer, Parkinson, esquizofrenia, ansiedade e depressão), doenças inflamatórias (colangite biliar primária, amiloidose, sarcoidose, doença enxerto x hospedeiro, doença de IgG4, penfigoide mucoso, líquen plano, rosácea e blefarite crônica) e doenças infecciosas (HIV, hepatite C, varicela, doença mão-pé-boca, estomatite herpética, neuropatia pós zoster e adenovírus, tracoma) (ANDRÉ; BÖCKLE, 2022).

1.3 O estresse do retículo endoplasmático

O retículo endoplasmático (RE) é a maior organela da célula. Ele é responsável pela síntese, pelo transporte e dobramento de proteínas, pela síntese de lipídeos e esteroides, pelo metabolismo de carboidratos e armazenamento de cálcio. Durante a síntese e translocação de proteínas dentro do lúmen do RE, se uma proteína é destinada à secreção, ela deve passar pelo processo de dobramento ou enovelamento, que permite a conformação ou estrutura espacial específica muito

importante para o seu funcionamento adequado. Este processo de enovelamento é guiado pelas chaperonas e enzimas de dobra (SCHWARZ; BLOWER, 2016).

As chaperonas foram descobertas durante um experimento em que células foram submetidas a choque térmico. No contexto de aumento de temperatura houve maior produção de proteínas e, conseqüentemente, a célula necessitou maior auxílio no processo de dobra e enovelamento. Devido a isso, as chaperonas ficaram conhecidas como proteínas de choque térmico ou HSP (*Heat Shock Proteins*) (RITOSSA, 1962). A palavra chaperona vem do francês *chaperon*, que significa dama de companhia, em alusão aos meninos que ajudavam os nobres renascentistas a vestir suas roupas complicadas ou às senhoras que acompanhavam as moças quando saíam com algum rapaz (ALVES-FILHO, 2008; WIKIPEDIA, 2023). São proteínas, que além de auxiliar no enovelamento proteico, também encaminham as proteínas à destruição caso não tenham atingido a configuração tridimensional correta. Trata-se de uma família de proteínas que usa a energia da hidrólise de adenosina trifosfato (ATP) para desnovelar proteínas mal dobradas e possibilitar novo enovelamento na configuração adequada (FENTON; HORWICH, 2003).

Apesar de várias chaperonas e enzimas de dobras, localizadas no lúmen do RE, o acúmulo de proteínas não dobradas ou mal dobradas pode ocorrer. Este acúmulo se deve à alta concentração de proteínas no lúmen do RE, o que dificulta o acesso das chaperonas e enzimas de dobra. Essa condição de acúmulo de proteínas mal dobradas ou não dobradas no RE é chamada de estresse do retículo endoplasmático (ERE). Quando ocorre o ERE, vários processos podem ser desencadeados para restabelecer o equilíbrio da célula e evitar que proteínas mal dobradas e nocivas sejam secretadas. Se este balanço não é restabelecido, ele pode levar à morte celular, ou seja, a apoptose (SCHWARZ; BLOWER, 2016).

1.4 Resposta a proteínas não dobradas

O ERE é o estado de desequilíbrio entre a oferta de proteínas no lúmen do RE e a capacidade de dobra de proteínas. Quando a célula entra em ERE, o RE envia sinais ao citoplasma e núcleo para que a célula responda ao excesso de

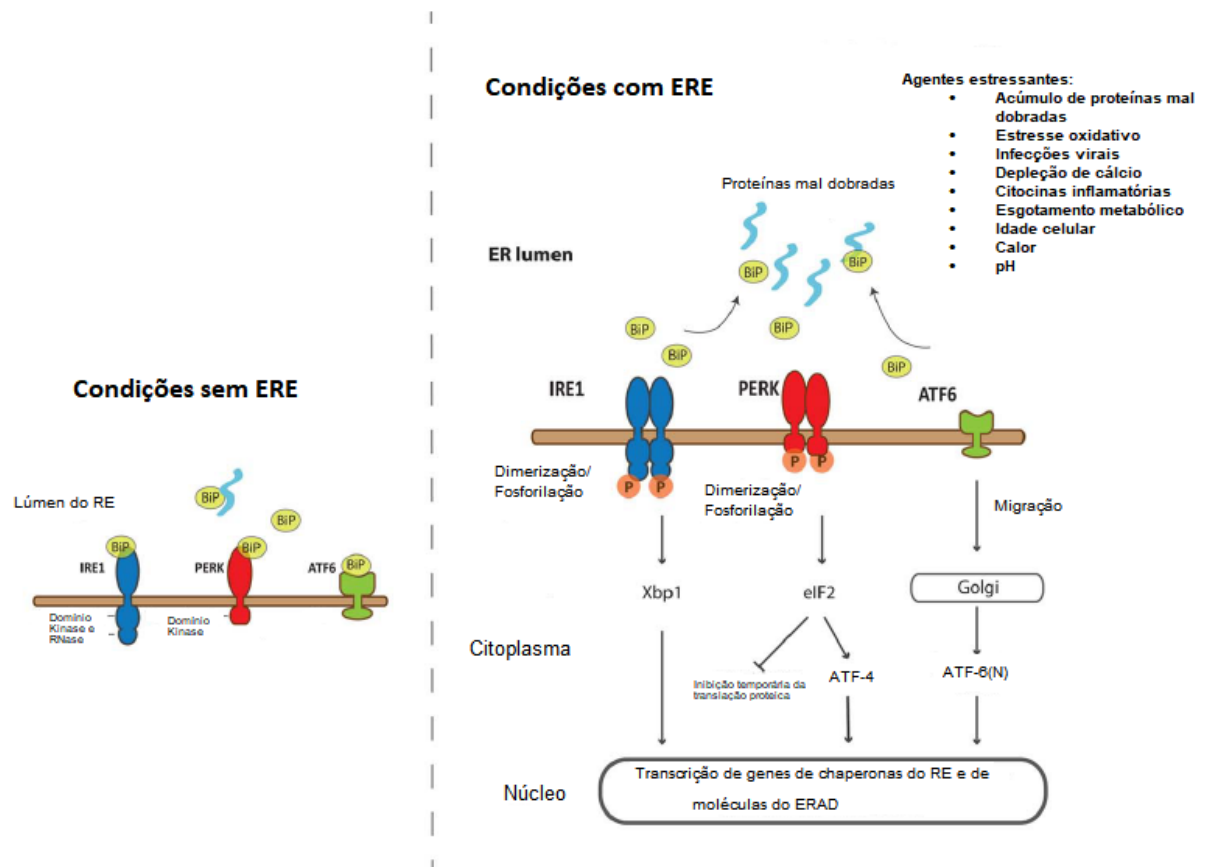
proteínas mal dobradas restabelecendo seu estado de equilíbrio, denominado homeostase (ou proteostase). Para isso existem dois mecanismos de seleção proteica: a Degradação Associada ao RE (ERAD) e a Resposta às Proteínas Não-Dobradas, ou *Unfolded Protein Response* (UPR) (OAKES; PAPA, 2015; PLUQUET; POURTIER; ABBADIE, 2015). A ERAD é responsável por enviar as proteínas não dobradas ao citoplasma e degradá-las. A UPR é responsável por reduzir a síntese proteica global e aumentar as estruturas do RE, bem como sua capacidade de dobra proteica (PLUQUET; POURTIER; ABBADIE, 2015).

O mecanismo preciso para o primeiro passo de ativação da UPR ainda permanece indefinido (CHARONIS *et al.*, 2017), mas sabe-se que se inicia por três proteínas transmembrana do RE: IRE1 α (*Inositol-Requiring Enzyme 1 α*), PERK (*PKR-like Endoplasmic Reticulum Kinase*) e ATF-6 (*Activating Transcription Factor 6*) (Figura 3). Todos os três são receptores do lúmen do RE, capazes de perceber a presença de proteínas mal dobradas ou não dobradas, bem como de realinhar o processo de dobra proteica e o retorno à homeostase para manter a célula viva e funcional (OAKES; PAPA, 2015).

Para aumentar o processo de dobra proteica, a UPR aumenta o tamanho do RE e a quantidade de elementos que permitem a degradação de proteínas mal dobradas no lúmen do RE. Alguns estudos reportam que o processo pode ser iniciado por BIP/GRP78 (*Binding Protein*), uma chaperona do lúmen do RE que permanece ligada aos domínios de PERK, IRE1 α e ATF-6 em condições normais, mantendo-os inativados; porém na presença de proteínas mal dobradas, libera essa ligação permitindo a ativação da UPR (OIKAWA *et al.*, 2009). O PERK possui uma cinase citoplasmática que fosforila eIF2 α (*Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 α*), que inibe e retarda a translação global de proteínas do RE para o Complexo de Golgi (CG), dando à célula mais tempo para realizar o dobramento das proteínas presentes no lúmen do RE, e age sobre o ATF-4 (*Activating Transcription Factor 4*) para aumentar a transcrição de proteínas que promovem a sobrevivência da célula em condições de estresse (HALPERIN; JUNG; MICHALAK, 2014). A IRE1 α remove o intron 26-nt do mRNA do fator de transcrição XBP1 (*X-Box Protein 1*), fragmentando-o em dois segmentos de mRNA, que são unificados por uma ligase, ainda a ser identificada, que é capaz de produzir o fator de transcrição XBP1s, um

importante fator de transcrição (OAKES; PAPA, 2015). A XBP1s contém um domínio ativado que permite sua translocação até o núcleo, onde induz a transcrição de vários genes que aumentam o tamanho e a função do RE, garantindo melhor controle das proteínas, transporte e degradação de proteínas mal dobradas (PLUQUET; POURTIER; ABBADIE, 2015). Já o ATF-6, na presença de proteínas mal dobradas, transloca-se para o CG, onde é clivado em dois sítios pelas proteases S1P e S2P, liberando o fator de transcrição ATF-6(N) com sua porção N-terminal na borda citoplasmática da membrana do RE. Junto com XBP1, ATF-6 migra para o núcleo e aumenta a transcrição de genes alvos, como de BIP/GRP78 e outras proteínas de controle da UPR e da ERAD, como GRP94, PDI, CHOP e XBP1 (PLUQUET; POURTIER; ABBADIE, 2015). Isso permite o aumento do RE e da capacidade de dobra proteica (OAKES; PAPA, 2015).

Figura 3 - Interação de BIP com IRE1 α , ATF-6 e PERK em condições com ERE e sem ERE



Fonte: Adaptado de Halperin, Jung e Michalak (2014)

Todavia, se a resposta adaptativa da UPR se mostra ineficiente em restabelecer o equilíbrio, a manutenção do processo de UPR sinaliza um estado de ERE crônico e elevado. No estado de ERE irreversível, a UPR altera a sinalização para o estado de UPR terminal que ativa o processo de apoptose. A hiperativação de PERK pode levar à regulação positiva do fator de transcrição CHOP (C/EBP-homologous protein ou GADD153), que inibe a expressão de um gene antiapoptótico, o BCL-2, ou seja, a hiperativação de PERK acelera o processo de morte celular. Da mesma forma, no ERE crônico, homodímeros fosforilados de IRE1 α se aglomeram em oligômeros, permitindo que sua RNase adquira afinidade a mais substratos de mRNA de XBP1, permitindo aumentar ainda mais o tamanho e a função do RE. Todavia, em estado de oligomerização sustentada, a RNase de IRE1 α leva à redução de centenas de mRNAs com sequência de sinalização N-terminal localizadas no RE, o que diminui os componentes responsáveis pelas dobras proteicas e piora ainda mais o estado de ERE. Além disso, a oligomerização de IRE1 α também tem se mostrado responsável por ativar um grupo de proteínas pró-inflamatórias e proteínas apoptóticas, reduzindo ainda mais o maquinário de dobra proteica do RE. O ATF-6 também possui alvos pró-apoptóticos, porém ainda não bem definidos (OAKES; PAPA, 2015).

1.5 ERE e doenças autoimunes

Defeitos na estrutura das proteínas podem levar ao desenvolvimento de doenças e, devido a isso, várias patologias têm sido associadas ao ERE, como diabetes, doenças neurodegenerativas e neuropsiquiátricas, câncer e doenças autoimunes (IWAKURA, 2018; LIU *et al.*, 2020; MUNEER; SHAMSHER KHAN, 2019). As doenças autoimunes, sejam órgão específicas ou sistêmicas, se caracterizam por um estado de inflamação, que se sabe estar associado ao ERE (BARRERA *et al.*, 2018).

A SS se caracteriza por uma infiltração linfocitária das glândulas lacrimais e salivares, resultando na redução das suas funções secretoras e, conseqüentemente, em queixa de olho seco e boca seca. As células acinares das glândulas salivares são células secretoras que apresentam um RE desenvolvido. Em condições

fisiológicas, essas células estão sujeitas à alta demanda de síntese proteica, o que pode induzir o estado de ERE (BARRERA *et al.*, 2016).

Várias desordens relacionadas ao ERE têm sido encontradas em pacientes com SS, como acúmulo intracelular de mucinas (SUNG *et al.*, 2015), alteração na sinalização do cálcio (ENGER *et al.*, 2014), dilatação nas cisternas do RE (GOICOVICH *et al.*, 2003) e altos níveis de citocinas pró-inflamatórias (SUN; EMMERT-BUCK; FOX, 1998). Redução na sinalização de IRE1 α /XBP1 e GRP78 em pacientes com SS sugere estado de ERE crônico (SEPÚLVEDA *et al.*, 2018). No entanto, Katsiogiannis, Tenta e Skopouli (2015) observaram expressão de GRP78 de 30 a 50% em células epiteliais de glândulas salivares de pacientes com SS e Sicca, sem diferença entre os grupos. A PERK também se mostrou elevada em glândulas salivares de pacientes com SS (BAHAMONDES *et al.*, 2016). Apesar do estado crônico de ERE, os níveis de apoptose nos pacientes com SS são baixos (OHLSSON *et al.*, 2001). Isso se deve à ativação da via da ERAD, com aumento da atividade e sinalização de ATF-6 (BARRERA *et al.*, 2016).

Calreticulina (CALR) e Calnexina (CANX) são outras duas proteínas do RE que atuam em condições de ERE para controle de qualidade proteica. Ambas são dependentes de cálcio (HALPERIN; JUNG; MICHALAK, 2014). Sabe-se que citocinas pró-inflamatórias presentes em doenças autoimunes promovem depleção de cálcio intracelular (MEEHAN *et al.*, 1997), o que pode afetar a função dessas proteínas do ERE. Staikou *et al.* (2003) evidenciaram em estudos prévios associação de anti-Ro a CALR em pacientes com LES e SS.

A SS pode estar associada a outras doenças autoimunes também relacionadas ao ERE. Na AR, GRP78, IRE1, XBP1s, ATF-6 e eIF2 α estão altamente expressos em macrófagos e tecido sinovial (KABALA *et al.*, 2017). No LES, sabe-se que existe alta expressão do fator nuclear NF- κ B no sangue periférico e as três vias do ERE ativam o NF- κ B (BRIGHTBILL *et al.*, 2018). Lee *et al.* (2015) relataram que a expressão de BIP/GRP78 levou ao aumento das respostas apoptóticas mediadas por CHOP em linfócitos T de pacientes com LES em comparação com pessoas saudáveis.

Sabe-se que a SS pode ser classificada como SS1 ou SS2. Na SS2, outras doenças autoimunes associadas podem interferir no mecanismo do ERE, o que

influencia na diversidade de manifestações clínicas da síndrome. Os poucos estudos realizados analisaram apenas alguns marcadores isolados do ERE na SS e sem diferenciar a expressão gênica entre as diferentes etiologias da síndrome. Neste estudo, analisou-se a atividade do ERE nas 3 principais vias de ativação da UPR dos pacientes com SS e nas diferentes nuances da doença. Para tanto analisamos BIP (iniciador da via da UPR), PERK, XBP1 (ativado por IRE1 α), ATF-6, ATF-4 (ativado após sinalização de PERK), CHOP (sinalizador da apoptose), CANX e CALR (chaperonas dependentes de cálcio, importante componente da saliva que se encontra depletado em glândulas salivares de pacientes com SS).

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar a presença de ativação de vias do ERE em amostras de glândula salivar menor de indivíduos com diagnóstico de síndrome de Sjögren por meio da análise da expressão gênica de PERK, XBP1, CHOP, ATF-4, ATF-6, CALR, CANX e BIP.

2.2. Objetivos específicos

Comparar a expressão dos genes do ERE analisados entre os grupos da seguinte forma:

- a) Comparar a expressão dos genes do ERE entre pacientes com síndrome de Sjögren primária e síndrome de Sjögren secundária.
- b) Comparar a expressão dos genes do ERE entre pacientes com síndrome de Sjögren e Sicca.

3. Casuística e Métodos

3.1 Considerações éticas

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), Processo HCRP nº 3424/2017 (Anexo A).

Todos os pacientes foram orientados quanto à natureza e os objetivos da pesquisa, enfatizando que a não aceitação não acarretaria interrupção ou alteração do tratamento. Apenas aqueles que concordaram em participar do estudo e espontaneamente assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndices A e B) foram incluídos.

3.2 População do estudo

Foram incluídos no estudo 47 pacientes com idade entre 18 e 65 anos, sem distinção de sexo, com queixa de xerostomia e suspeita de SS, atendidos no Ambulatório de Colagenoses (ACOL) do HCFMRP- USP e que foram encaminhados ao Ambulatório de Glândulas Salivares (GSAL) da mesma instituição para realização de biópsia de glândula salivar menor no período de 11 de março de 2016 e 13 de junho de 2022. Aqueles com suspeita de SS também tiveram o fluxo salivar e os anticorpos anti-Ro analisados.

Treze pacientes com necessidade de cirurgia para remoção de neoplasias benignas em mucosa oral ou cirurgias de reestruturação óssea funcional e estética (ortognáticas), sem sintomas secos, foram selecionados para compor o grupo controle. Esses pacientes foram recrutados pela equipe da Cirurgia de Cabeça e Pescoço (CCP) do HCFMRP-USP e convidados a ceder para a pesquisa amostras de glândula salivar menor, caso a cirurgia indicada abrangesse o lábio inferior e expusesse glândulas durante o procedimento. Além disso, foi realizado fluxo salivar não estimulado de todos os pacientes. As coletas foram realizadas no período de 04 de abril de 2021 a 13 de junho de 2022.

Após análise dos parâmetros clínicos e laboratoriais dos pacientes com suspeita de SS, estes foram classificados com base nos critérios da *ACR/EULAR* de 2016 (SHIBOSKI *et al.*, 2017) e distribuídos em três grupos:

- Grupo SS1: dezesseis pacientes classificados como SS1 após se excluir a possibilidade de SS2.
- Grupo SS2: treze pacientes com diagnóstico de doença autoimune prévia classificados como SS2.
- Grupo Sicca: dezoito pacientes com queixa de boca seca em que se excluiu SS pelas queixas e parâmetros, sendo classificados apenas como síndrome Sicca.

O grupo controle foi composto por pacientes sem queixas de boca seca e sem histórico prévio de doença autoimune. Os critérios de exclusão foram: pacientes com outras causas definidas de xerostomia, neoplasias malignas de boca ou suspeita de neoplasia de glândulas salivares menores, doenças inflamatórias da boca (líquen, lesão liquenoide), radioterapia prévia, hepatite C, AIDS, sarcoidose, amiloidose, doença enxerto *versus* hospedeiro ou doença relacionada à IgG4. Pacientes controle com biópsia de glândula salivar menor apresentando *focus* >1 associado ao fluxo salivar baixo também foram excluídos do grupo.

3.3 Coleta de fluxo salivar

Foi realizado o fluxo salivar não estimulado durante 15 minutos. Durante este intervalo o paciente foi requisitado a armazenar toda a saliva produzida em um recipiente de plástico pelo método de esputação. O volume foi contabilizado com seringa de 5 mL, sendo a espuma excluída da análise. Os resultados foram classificados como baixo fluxo, quando volume $\leq 0,1$ mL/min, e fluxo normal quando volume $> 0,1$ mL/minutos.

3.4 Análise de anticorpos

O sangue coletado foi armazenado em tubo amarelo seco com ativador de coágulo e centrifugado a 3500 rpm por 10 minutos para separar o soro. Uma alíquota de 15 μ L de soro foi transferida para um microtubo/flaconete e conservado em *freezer* a -20°C até atingir o número de amostras necessárias para o

processamento. Para as etapas seguintes, as amostras foram preparadas usando o *kit* SS-A ELISA da QUANTA Lite[®]. Foram retirados das amostras 5 µL de soro, aos quais foram adicionados 500 µL de diluente em diluição 1:101 que permanece estável por 8 horas. As amostras foram alocadas em placas de Elisa com 100 µL de SS-A Elisa baixo positivo, SS-A Elisa forte positivo, controle de Elisa negativo e encubadas em ar ambiente por 30 minutos. Após, foram lavadas três vezes com 200 a 300 µL de soro com solução tampão de lavagem HRP do *kit* na lavadora de Elisa aW1. Na sequência, foram adicionados 100 µL de HRP IgG conjugado a cada amostra e encubado em ar ambiente por mais 30 minutos. O processo de lavagem foi repetido mais três vezes com a solução tampão de lavagem. Em seguida, as amostras foram acrescidas de 100 µL de TMB cromógeno, encubadas por mais 30 minutos em ambiente escuro à temperatura ambiente e, após, adicionados mais 100 µL de solução *Stop* HRP e filtro de 450 nm para processamento do Elisa na leitora Biotek EL 808[®]. A análise foi realizada com auxílio do *software* Gen5[®]. As amostras foram consideradas positivas quando os valores foram acima de 20, conforme especificação do *kit*.

3.5 Biópsia de glândula salivar menor

A biópsia de glândula salivar menor foi realizada em lábio inferior sob anestesia local e técnica asséptica. Os pacientes foram submetidos a enxague oral com digliconato de clorexidina bucal sem álcool 0,12% e, após, assepsia adicional peribucal com digliconato de clorexidina aquosa 1%. A mucosa interna do lábio inferior em região paramediana foi anestesiada com lidocaína 2% com vasoconstritor. Uma incisão horizontal de cerca de 1 cm apenas da camada mucosa foi realizada. A dissecação cuidadosa com pinça Halstead foi realizada para evitar lesão do nervo mentual e localizar as glândulas. Quatro glândulas foram ressecadas e armazenadas em frasco com formol 10%, devidamente identificados com etiqueta para análise patológica, duas a três glândulas foram separadas para análise de qPCR (Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real). A sutura da ferida operatória foi realizada com pontos separados de fio absorvível de poliglactina 910

(vicryl®) número 4-0. Os pacientes foram reavaliados em duas a quatro semanas para checar o resultado de biópsia e condições de cicatrização da ferida operatória.

3.6 Análise histopatológica

As amostras foram fixadas em formol 10% tamponado por 24h e em seguida armazenadas em cassete histológico de polioximetileno identificados com o número do exame no Serviço de Patologia. O processamento do tecido foi realizado em aparelho Thermo Scientific Micron STP 120® (Figura 4). O processo de desidratação foi feito com inclusão dos cassetes sem formol em recipientes subsequentes de álcool durante 30 minutos cada, sendo um recipiente de álcool 80%, um recipiente de álcool 95% e cinco recipientes de álcool 100%. A clarificação foi realizada em dois recipientes de xilol 30 minutos cada. A inclusão foi feita em três recipientes de parafina a 60-62°C por uma hora cada.

Figura 4 - Processador histológico Thermo Scientific Micron STP 120®



Fonte: Foto reproduzida do Laboratório de Patologia do HCFMRP-USP.

Na sequência, os cassetes foram incluídos em parafina no autoincludor Thermo Scientific Micron EC 350-1® (Figura 5), solidificados em gelo para confecção do bloco de biópsia e armazenados em *freezer* -4°C. Após, os blocos foram cortados em micrótomo Leica RM2125 RTS® (Figura 6) em espessuras de 4 a 5 micrômetros e adicionadas em banho-maria histológico com água morna para ajustar as imperfeições. Os cortes foram, então, prontamente colocados em lâmina e armazenados em estufa a 70-75°C por cerca de 30 minutos para fixação dos cortes na lâmina.

Figura 5 - Autoincludor Thermo Scientific Micron EC 350-1®



Fonte: Foto reproduzida do Laboratório de Patologia do HCFMRP-USP.

Figura 6 - Micrótomo Leica RM2125 RTS®



Fonte: Foto reproduzida do Laboratório de Patologia do HCFMRP-USP.

A coloração das lâminas (Figura 7) foi realizada em sequência de banhos de 5-10 minutos, sendo quatro banhos de xilol para retirar a parafina e reidratados com dois banhos de álcool 100%, um de álcool 95%, um de álcool 80% e um de água. Em seguida, as lâminas foram coradas em hematoxilina para caracterização do núcleo, lavadas em água e álcool 95% por 5-10 minutos e, após, coradas em eosina, para identificação do citoplasma. As lâminas ainda recebem mais dois banhos de álcool 95%, quatro de álcool 100% e quatro de xilol por 5-10 minutos antes de serem protegidas por uma lamínula de vidro com resina interlam.

Figura 7 - Recipientes para etapa de coloração



Fonte: Foto reproduzida do Laboratório de Patologia do HCFMRP-USP.

Ao término do preparo, as lâminas foram analisadas em microscópio Nikon Eclipse E100® (Figura 8). A análise de um *focus score* foi feita com presença de 50 linfócitos por 4 mm², sendo cada mm² representado por sete campos de grande aumento no microscópio.

Figura 8 - Microscópio Nikon eclipse E100®



Fonte: Foto reproduzida do Laboratório de Patologia do HCFMRP-USP.

3.7 Identificação e armazenamento da glândula salivar menor

As amostras foram armazenadas a seco em tubo de *ependorf* de 1,5 mL, identificadas por etiqueta com o registro do paciente e colocadas em *freezer* a -80°C no Laboratório de Cultura de Células do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP), onde as análises foram realizadas.

3.8 Extração de RNA

Durante o processo de extração de RNA, os tubos de *ependorf* foram alocados em um isopor com gelo para preservação das amostras (Figura 9). Em cada tubo de *ependorf* de 1,5 mL foram adicionados 400 μL de trizol Sigma TRI-Reagent® (LOT#BCBV9270) (Figura 10). O trizol é um reagente constituído de fenol e isotiocianato de guanidina que permite a lise de células e o isolamento de uma variedade de RNA de grande ou pequeno tamanho molecular, inibindo a ação das RNAases durante o processo de extração. Em seguida, as amostras foram

homogeneizadas com ponteiros esterilizados no OMNI-IN international TH® (Figura 11). Após liquefação do tecido glandular, as amostras foram acrescidas de 100 μ L de clorofórmio Synth® (Lote 139036). O clorofórmio solubiliza os lipídeos permitindo sua remoção.

Figura 9 - Tubos em isopor com gelo durante o processo de extração



Fonte: Foto reproduzida do Laboratório de Cultura De Células do Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP.

Figura 10 - Tubos com amostra adicionada ao trizol

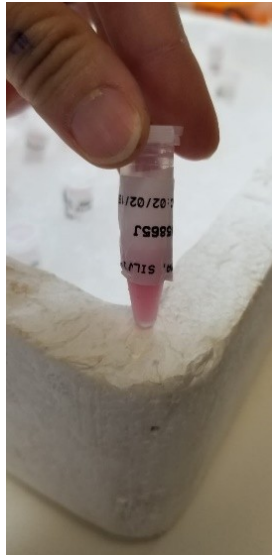


Figura 11 - Sistema de homogeneização OMNI-IN international TH ®



Fonte: Fotos reproduzidas do Laboratório de Cultura De Células do Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP.

As amostras foram levadas ao agitador de tubos Phoenix AP56® para homogeneização da solução e imediatamente levadas à centrífuga Sigma Spin 1-14k® em velocidade de 12.000 rpm, durante 15 min a 4°C. Durante a centrifugação, a amostra é dividida em três graus de sedimentação no tubo. A solução transparente, mais superficial, contém as moléculas de RNA. A porção intermediária de aspecto solidificado contém o clorofórmio e as moléculas de DNA, e a solução rosa mais profunda contém proteínas e demais componentes moleculares junto com trizol. Foi, então, extraída dos tubos a parte transparente da solução, contendo apenas as moléculas de RNA.

Para a precipitação do RNA e limpeza de sais, as amostras foram inseridas em novos tubos identificados com a mesma numeração, às quais foram acrescidos de 400 µL de isopropanol para quebrar as pontes de hidrogênio. Em seguida, as amostras foram armazenadas no *freezer* a -20°C por 2 horas, sendo então submetidas à nova centrifugação a 4°C, 12.000 rpm, durante 10 minutos. A solução de isopropanol foi então removida cuidadosamente dos tubos com preservação do *pellet* de RNA e às amostras foram adicionados 400 µL de etanol 75% Sigma® e

realizada nova etapa de centrifugação a 4°C, a 7500 rpm durante 5 minutos. Novamente, a solução de etanol foi removida com preservação do *pellet* de RNA e os tubos foram posicionados com tampa aberta e posição invertida em modo de secagem. Quando completamente secas, as amostras de *pellet* foram acrescidas de 20 µL de H₂O livre de RNAase e os tubos homogeneizados no agitador de tubos.

3.9 Qualidade e Concentração de RNA

As amostras foram testadas quanto à concentração e qualidade do RNA no aparelho SpectraMax M3 da Molecular Devices (Figura 12) e utilizado o programa SoftMaxPro 6.5.1 para análise dos dados. A medida de 2 µL de cada amostra de paciente foi inserida na placa de análise SpectraDrop™ Micro-Volume Microplate (Figura 13). A Razão de 260/280 nanômetro com Relação >1,7 foi considerada adequada para concentração e qualidade. Foram utilizadas duas medidas de amostras em duas placas e ambas analisadas duas vezes para se evitarem medidas inadequadas por erro humano. Todas as amostras apresentaram razão e relação adequadas para concentração e qualidade.

Figura 12 - SpectraMax M3 da Molecular Devices



Figura 13 - SpectraDrop™ Micro-Volume Microplate



Fonte: Fotos reproduzidas do Laboratório de Cultura De Células do Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP.

3.10 Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA, 1000 ng de RNA foram tratados com 1 μ L de DNase + 1 μ L de tampão para o volume de 10 μ L, incubados a 37°C por 30 minutos. Ao final da reação foi adicionado 1 μ L de solução STOP e mantido a 65°C por 10 minutos.

Para a reação de transcriptase reversa foram utilizados 11 μ L de RNA tratado com DNase que foi adicionado a um novo microtubo acrescido de 4 μ L de Buffer 5x iScript™ Reaction Mix® da BIO-RAD (L010174A), 1 μ L de transcriptase reversa iScript™ Reverse Transcriptase® da BIO-RAD, 4 μ L de H₂O livre de RNAase. As amostras foram levadas ao termociclador Thermal Cycler C1000 Touch™ CFX⁹⁶ Real-Time System® (Figura 14) a 25°C por 5 minutos, 42°C por 30 minutos, 85°C por 5 minutos e 12°C por tempo infinito. Por fim, as amostras foram acrescidas de 180 μ L de H₂O livre de RNAase para concentração final de RNA de 5 ng/mL.

Figura 14 - Termociclador C1000 Touch™ Thermal Cycler®



Fonte: Foto reproduzida do Laboratório de Cultura De Células do Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP.

3.11 qPCR

Determinou-se a expressão dos genes por meio da técnica de qPCR. A técnica consiste na duplicação da cadeia de DNA “in vitro” repetidas vezes. Para a reação, 2 µL de cDNA foram condicionados em microplacas para qPCR e acrescidas de 5 µL do reagente EvaGreen® da BIO-RAD (L000915A), 0,3 µL de Primer Forward (diluição 1:10), 0,3 µL de Primer Reverse (diluição 1:10) e 2,4 µL de H₂O livre de RNAase, totalizando o volume de 10 µL de solução. Em cada placa foi utilizada uma amostra controle positiva para expressão gênica, um controle branco (água) e um NTC (No Template Control). Após seladas com filme da BIO-RAD®, as amostras foram levadas ao Thermal Cycler C1000 Touch™ CFX⁹⁶ Real-Time System para termociclagem. O EvaGreen® é um mix otimizado para PCR em tempo real que contém todos os reagentes necessários para a reação de qPCR: enzima HOT FIREPol® DNA Polymerase, dNTPs, MgCl₂, fluoróforo EvaGreen® e ROX.

A ciclagem para amplificação foi igual para todos os *primers*, sendo iniciada com a etapa de ativação enzimática de 30 segundos a 95°C, seguida pela etapa de anelamento e amplificação de 5 segundos a 95°C e 30 segundos a 60°C, que foi repetida 39x e, por fim, a curva de *melting*.

Os *primers* e o gene endógeno GAPDH utilizados foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (Tabela 2).

Tabela 2 - Sequência de oligonucleotídeos usados para análise da expressão do ERE.

Gene	Forward	Reverse
BIP	CATCACGCCGTCCTATGTCTG	CGTCAAAGACCGTGTTCTCG
PERK	TGTCGCCAATGGGATAGTGACGAA	AATCCGGCTCTCGTTTCCATGTCT
XBP1	TGGCCGGGTCTGCTGAGTCCG	ATCCATGGGAAGATGTTCTGG
ATF-6	AAGGCTTGGGCTGAATTGAA	ATGTCTCCCCTTTCTTATATGGT
ATF-4	GGTTCTCCAGCGACAAGGCTAAG	AACAGGGCATCCAAGTCAACTC
CALR	CCTGCCGTCTACTTCAAGGAG	GAAGTTGCCGGAAGTGAAGAC
CANX	CCAAGGTTACTTACAAAGCTCCA	GGCCCGAGACATCAACACA
CHOP	GGAGAACCAGGAAACGGAAAC	TCTCCTTCATGCGCTGCTTT
GAPDH	AGGGCTGCTTTTAACTCTGGT	CCCCACTTGATTTTGGAGGGA

3.12 Análise estatística

Os dados foram tabelados em Excel e em seguida importados para o programa R versão 4.2.2 para as análises estatísticas. Eles foram sumarizados considerando as medidas de posição central e de dispersão sobre os valores de razão da expressão relativa/ média do controle. Gráficos de *boxplot* foram usados para se verificar a distribuição dos dados.

Para se verificar a diferença estatística entre os quatro grupos em cada gene foi realizada análise de variância (ANOVA) pelo teste *One Way* seguida do pós-teste de Tukey. Os resíduos apresentaram normalidade na distribuição. Os pressupostos do modelo foram conferidos considerando os gráficos de normalidade dos resíduos. Quando os pressupostos não foram atendidos foi aplicada transformação logarítmica na variável resposta. Para as análises de duas categorias de grupos foi utilizado o teste t de Student. A hipótese nula foi rejeitada quando $p < 0,05$. Um paciente do grupo SS2 e um do grupo Sicca foram excluídos da análise estatística, pois não apresentaram expressão do gene GAPDH ou de genes do ERE.

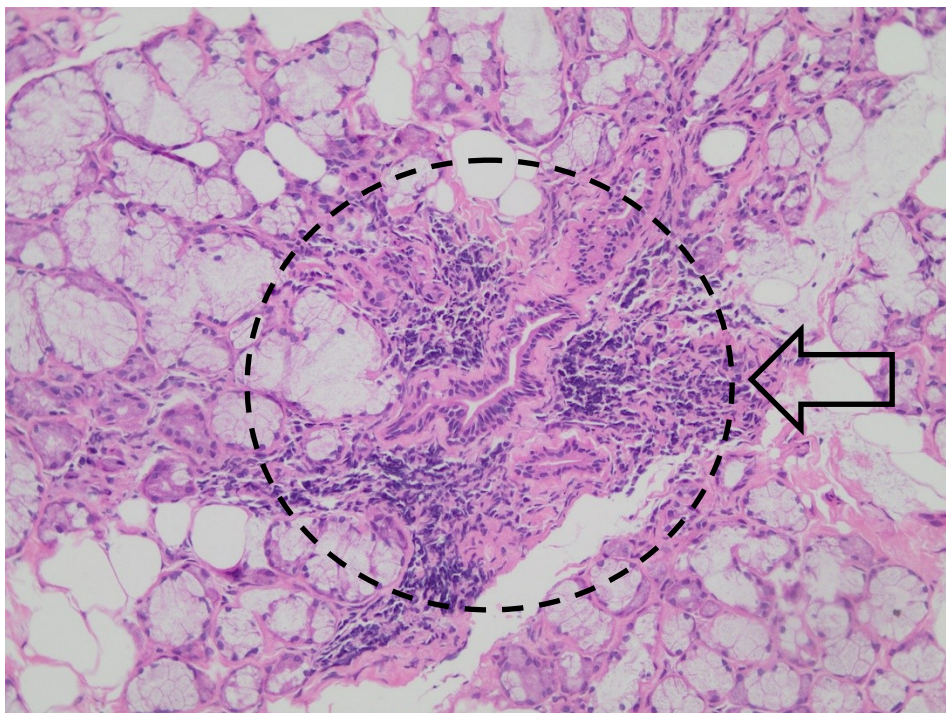
4. Resultados

A média de idade dos pacientes foi de $46,9 \pm 13,78$ anos, sendo 59 do sexo feminino e um paciente do sexo masculino. Desses pacientes, 16 foram classificados com SS1, 13 com SS2, 18 com Sicca e 13 constituíram o grupo controle.

4.1 Grupo Síndrome de Sjögren Primária

O grupo SS1 incluiu 16 pacientes do sexo feminino com média de idade de $44,06 \pm 14,55$ anos. Desses, quinze apresentaram biópsia com *focus score* ≥ 1 e um paciente apresentou *focus score* zero (Figura 15). Treze pacientes apresentaram anticorpo anti-Ro positivo e três foram negativos, dez fluxo de saliva normal e seis fluxo de saliva baixo (Tabela 3).

Figura 15 - Biópsia de glândula salivar menor *focus score* 4 de paciente do grupo SS1. A seta indica a área com presença de infiltração linfocítica >50 linfócitos em campo de 4 mm^2 (focus 4)



Fonte: Foto reproduzida do Laboratório de Patologia do HCFMRP-USP.

Tabela 3 - Distribuição dos pacientes de acordo com as variáveis sexo, idade, *focus score*, anti-Ro e fluxo de saliva no grupo SS1

Grupo SS1	Sexo	Idade	Focus Score	Anti-Ro	Fluxo de saliva
1	F	49	2	+	Normal
2	F	55	1	+	Normal
3	F	75	4	-	Normal
4	F	54	4	+	Baixo
5	F	29	4	+	Normal
6	F	53	1	+	Baixo
7	F	43	4	+	Normal
8	F	33	1	+	Normal
9	F	39	4	+	Normal
10	F	46	3	+	Baixo
11	F	35	2	+	Normal
12	F	65	4	-	Baixo
13	F	23	4	+	Baixo
14	F	50	2	+	Baixo
15	F	27	1	-	Normal
16	F	29	0	+	Normal
Total/ Média	16 F	44,06 ± 14,55 anos	1 <i>focus</i> 0 15 <i>focus</i> ≥1	13 (+) 3 (-)	10 Normais 6 Baixos

DP: Desvio padrão; F: Feminino; M: Masculino.

4.2 Grupo Síndrome de Sjögren secundária

O grupo SS2 foi constituído de doze pacientes do sexo feminino com média de idade de $51,5 \pm 12,66$ anos. Nove pacientes apresentaram biópsia de glândula salivar menor com *focus score* ≥ 1 e três obtiveram resultado *focus score* zero. Nove pacientes apresentaram anticorpo anti-Ro positivo e três anticorpo negativo. Oito pacientes apresentaram fluxo salivar baixo e quatro obtiveram fluxo normal (Tabela 4).

Tabela 4 - Distribuição dos pacientes de acordo com as variáveis sexo, idade, *focus score*, anti-Ro e fluxo de saliva no grupo SS2

Grupo SS2	Sexo	Idade	Focus Score	Anti-Ro	Fluxo de saliva
1	F	40	4	-	Baixo
2	F	39	5	+	Baixo
3	F	45	0	+	Normal
4	F	63	1	+	Normal
5	F	39	1	+	Baixo
6	F	64	4	-	Baixo
7	F	61	3	+	Baixo
8	F	67	1	-	Baixo
9	F	32	0	+	Normal
10	F	63	4	+	Normal
11	F	61	0	+	Baixo
12	F	44	4	+	Baixo
Total/ Média	12 F	51,5 ± 12,66	3 <i>focus</i> 0 9 <i>focus</i> ≥1	9 (+) 3 (-)	4 Normais 8 Baixos

DP: Desvio padrão; F: Feminino; M: Masculino.

4.3 Grupo Sicca

O grupo Sicca foi composto por 16 pacientes do sexo feminino e um do sexo masculino, com média de idade de 49,47 ± 13,75 anos. Treze pacientes apresentaram *focus score* zero e quatro *focus score* ≥1. Quinze pacientes apresentaram anticorpo negativo e dois anticorpo positivo. Oito pacientes apresentaram fluxo salivar normal e nove fluxo salivar baixo (Tabela 5). Três pacientes obtiveram pontuação ≥4 no consenso de SS, porém com critérios de exclusão. Uma paciente é portadora do vírus da hepatite C, a segunda com doença de IgG4 e a terceira tem doença enxerto x hospedeiro, sendo, portanto, classificadas com síndrome Sicca.

Tabela 5 - Distribuição dos pacientes de acordo com as variáveis sexo, idade, *focus score*, anti-Ro e fluxo de saliva no grupo Sicca

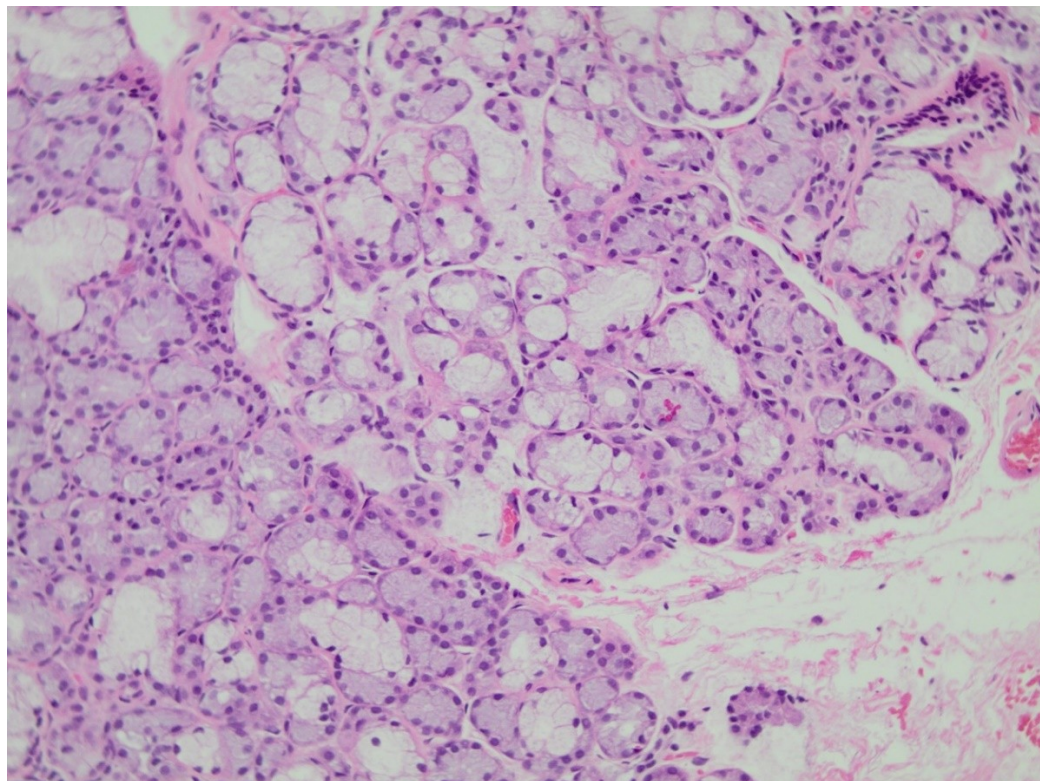
Grupo Sicca	Sexo	Idade	Focus Score	Anti-Ro	Fluxo de saliva
1	F	29	1	+	Baixo
2	F	62	0	-	Normal
3	F	36	0	-	Baixo
4	F	56	0	-	Normal
5	M	62	0	-	Normal
6	F	61	1	-	Baixo
7	F	65	0	-	Normal
8	F	55	0	-	Baixo
9	F	46	1	-	Normal
10	F	54	0	-	Zero
11	F	54	0	-	Normal
12	F	55	0	-	Baixo
13	F	29	1	-	Baixo
14	F	63	0	-	Zero
15	F	36	0	-	Normal
16	F	22	0	+	Normal
17	F	56	0	-	Baixo
Total/ Média	16 F / 1 M	49,47 ± 13,75	13 <i>focus</i> 0 4 <i>focus</i> ≥1	2 (+) 15 (-)	8 Normais 9 Baixo

DP: Desvio padrão; **F:** Feminino; **M:** Masculino.

4.4 Grupo controle

O grupo controle foi constituído por 13 pacientes do sexo feminino com média de idade de $43,30 \pm 14,25$ anos. Onze obtiveram biópsia de glândula salivar com *focus score* zero (Figura 16). Duas pacientes com resultado de *focus score* 1 apresentaram fluxo de saliva normal, duas com fluxo de saliva baixo, porém com biópsia de glândula salivar menor normal. Uma das pacientes com fluxo salivar baixo já havia feito parotidectomia parcial por adenoma pleomórfico (Tabela 6).

Figura 16 - Biópsia de glândula salivar menor *focus score* 0 de paciente do grupo Controle. Não se observou infiltração linfocítica



Fonte: Foto reproduzida do Laboratório de Patologia do HCFMRP-USP.

Tabela 6 - Distribuição dos pacientes de acordo com as variáveis sexo, idade, *focus score*, anti-Ro e fluxo de saliva no grupo controle

Grupo controle	Sexo	Idade	Focus Score	Anti-Ro	Fluxo de saliva
1	F	43	0	∅	Normal
2	F	46	0	∅	Normal
3	F	41	0	∅	Normal
4	F	31	0	∅	Normal
5	F	3)2	0	∅	Normal
6	F	54	0	∅	Normal
7	F	32	1	∅	Normal
8	F	29	1	∅	Normal
9	F	68	0	∅	Normal
10	F	26	0	∅	Normal
11	F	62	0	∅	Baixo
12	F	36	0	∅	Normal
13	F	63	0	∅	Baixo
Total/ Média ± DP	13 F	43,30 ± 14,25	11 <i>focus</i> 0 2 <i>focus</i> ≥1	∅	11 Normais 2 Baixo

DP: Desvio padrão; F: Feminino; M: Masculino.

4.5 Análise dos genes do estresse do retículo endoplasmático

A média da expressão dos *cycles threshold* dos genes em cada paciente encontra-se detalhada no Apêndice C.

4.5.1 Expressão de PERK

O gene PERK apresentou variação estatisticamente significativa entre os quatro grupos estudados ($p=0,0096$), com maior expressão nos grupos SS1 (média 2,01) e SS2 (média 2,14) (Tabela 7). Na análise entre grupos, observou-se relevância estatística entre os grupos SS1 e Sicca, SS2 e controle, SS2 e Sicca, SS2 e controle (Tabela 8). Não houve diferença estatística na análise entre SS1 e SS2, Sicca e controle. Quando unificado o grupo Sjögren (SS1 + SS2) e comparado

ao grupo não Sjögren (Sicca + controle), PERK mostrou-se mais expresso no grupo Sjögren (2,07) com $p=0,0007$ (Tabela 9). Nas Figuras 17 e 18 é possível observar a expressão de PERK entre os grupos.

Tabela 7 - Distribuição das variáveis em cada grupo de estudo para o gene PERK

Variável	Grupo	N	Média	DP	Mediana	Q1	Q3	Mín	Máx	P-valor
PERK	SS1	14	2,01	0,93	1,86	1,4	2,51	0,4	4,11	
PERK	SS2	10	2,14	1,34	2,41	1,09	2,77	0,36	4,65	
PERK	Sicca	15	0,99	0,8	0,84	0,25	1,29	0,09	2,72	0,0096
PERK	Controle	8	1	1,15	0,71	0,23	1,19	0,11	3,64	

N: Número de casos analisados; **DP:** Desvio padrão; **Q1:** quartil1; **Q3:** quartil 3; **Mín:** valor mínimo; **Máx:** valor máximo; P-valor referente a ANOVA.

Tabela 8 - Valores de P referentes às comparações entre os grupos para o gene PERK

	Grupo	Sicca	Controle
PERK	SS1	0,01	0,0312
	SS2	0,0089	0,0246

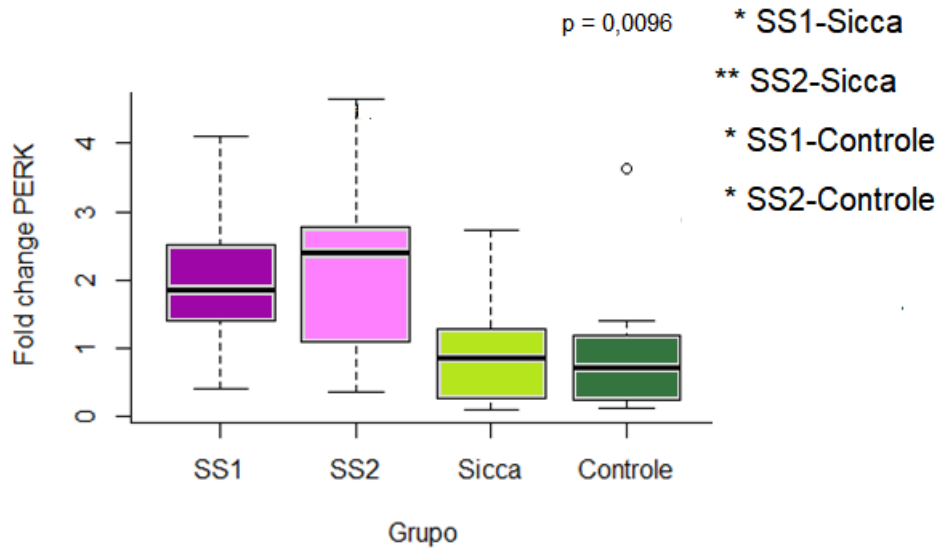
P-valor referente ao teste Tukey.

Tabela 9 - Distribuição de PERK nos grupos Sjögren (SS1 + SS2) e não Sjögren (Sicca + controle)

Variável	Grupo	N	Média	DP	Mediana	Q1	Q3	Mín	Máx	P-valor
PERK	SS1/SS2	24	2,07	1,09	1,98	1,35	2,76	0,36	4,65	0,0007
PERK	Sicca/Controle	23	0,99	0,91	0,81	0,24	1,29	0,09	3,64	

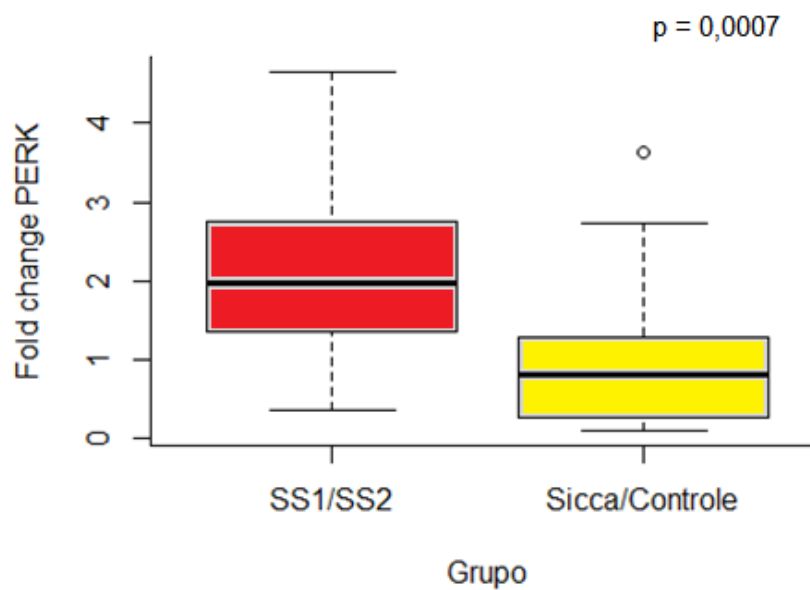
N: Número de casos analisados; **DP:** Desvio padrão; **Q1:** quartil1; **Q3:** quartil 3; **Mín:** valor mínimo; **Máx:** valor máximo; P-valor referente ao teste t.

Figura 17 - Distribuição de PERK entre os quatro grupos (SS1, SS2, Sicca e controle)



*p<0,05; **p<0,005; ***p<0,0005.

Figura 18 - Distribuição de PERK entre os grupos Sjögren (SS1 + SS2) e não Sjögren (Sicca + controle)



4.5.2 Expressão de XBP1

O gene XBP1 se mostrou mais expresso em SS1, SS2 e Sicca do que no grupo controle, porém sem relevância estatística (Tabela 10). Na análise grupo a grupo, verificou-se relevância estatística apenas entre SS1 e controle (Tabela 11). Nos grupos Sjögren e não Sjögren observou-se que a expressão de XBP1 foi ligeiramente maior no grupo Sjögren, porém sem relevância estatística (Tabela 12). A expressão de XBP1 entre os grupos pode ser observada nas Figuras 19 e 20.

Tabela 10 - Distribuição de XBP1 em cada grupo de estudo

Variável	Grupo	N	Média	Desv. Pad.	Mediana	Q1	Q3	Mín	Máx	P-valor
XBP1	SS1	14	1,67	0,88	1,71	0,99	2,44	0,18	2,85	
XBP1	SS2	12	1,5	0,76	1,47	1,17	1,88	0,07	2,75	0,1674
XBP1	Sicca	16	1,55	1,4	1,18	1,09	1,46	0,03	6,43	
XBP1	Controle	8	1	1,28	0,57	0,21	1,22	0,06	3,93	

N: Número de casos analisados; **DP:** Desvio padrão; **Q1:** quartil1; **Q3:** quartil 3; **Mín:** valor mínimo; **Máx:** valor máximo; P-valor referente à ANOVA.

Tabela 11 - Valores de P referentes às comparações entre os grupos em XBP1

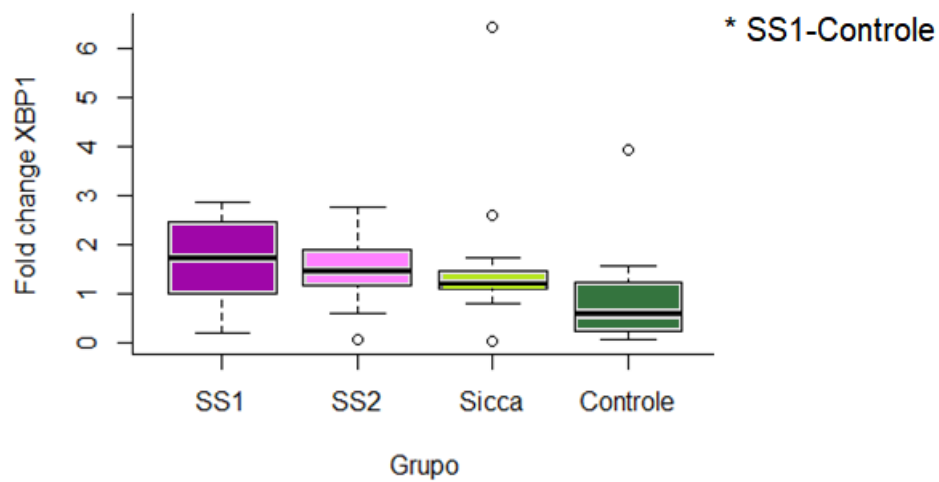
		SS2	Sicca	Controle
	SS1	0,7168	0,5651	0,0321
logXBP1	SS2		0,8584	0,0734
	Sicca			0,0829

P-valor referente ao teste Tukey.

Tabela 12 - Distribuição de XBP1 nos grupos Sjögren (SS1 + SS2) e não Sjögren (Sicca + controle)

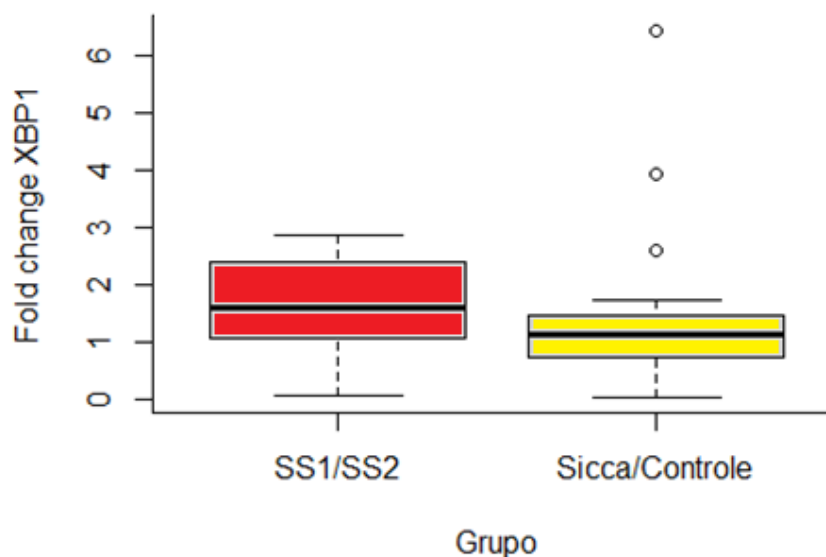
Variável	Grupo	N	Média	Desv. Pad.	Mediana	Q1	Q3	Mín	Máx	P-valor
logXBP1	SS1/SS2	26	1,59	0,82	1,58	1,06	2,39	0,07	2,85	0,1678
logXBP1	Sicca/Controle	24	1,36	1,36	1,12	0,71	1,46	0,03	6,43	

N: Número de casos analisados; **DP:** Desvio padrão; **Q1:** quartil1; **Q3:** quartil 3; **Mín:** valor mínimo; **Máx:** valor máximo; P-valor referente ao teste t.

Figura 19 - Distribuição de XBP1 entre os quatro grupos (SS1, SS2, Sicca e controle)

*p<0,05; **p<0,005; ***p<0,0005

Figura 20 - Distribuição de XBP1 entre o grupo Sjögren (SS1 + SS2) e não Sjögren (Sicca e Controle)



4.5.3 Expressão de BIP

O gene BIP se mostrou mais expresso nos grupos Sjögren (SS1 + SS2) do que em Sicca ($p < 0,0001$) (Tabela 13). A expressão de BIP no grupo controle não foi suficiente para ser mensurada. Houve relevância estatística em todos os grupos avaliados entre si (Tabela 14). Na análise agrupada (Sjögren x não Sjögren), o BIP foi mais expresso no grupo Sjögren, com relevância estatística (Tabela 15). A expressão de BIP entre os grupos pode ser vista nas Figuras 21 e 22.

Tabela 13 - Distribuição de BIP em cada grupo de estudo

Variável	Grupo	N	Média	Desv. Pad.	Mediana	Q1	Q3	Mín	Máx	P-valor
BIP	SS1	11	2,56	0,95	2,27	2,16	2,91	1,5	5,02	
BIP	SS2	9	1,47	0,32	1,4	1,35	1,61	0,85	2	<0,0001
BIP	Sicca	12	1,04	0,42	0,96	0,7	1,24	0,58	1,98	

N: Número de casos analisados; **DP:** Desvio padrão; **Q1:** quartil1; **Q3:** quartil 3; **Mín:** valor mínimo; **Máx:** valor máximo; P-valor referente a ANOVA.

Tabela 14 - Valores de P referentes às comparações entre os grupos em BIP

		SS2	Sicca
logBIP	SS1	0,0012	<,0001
	SS2		0,0127

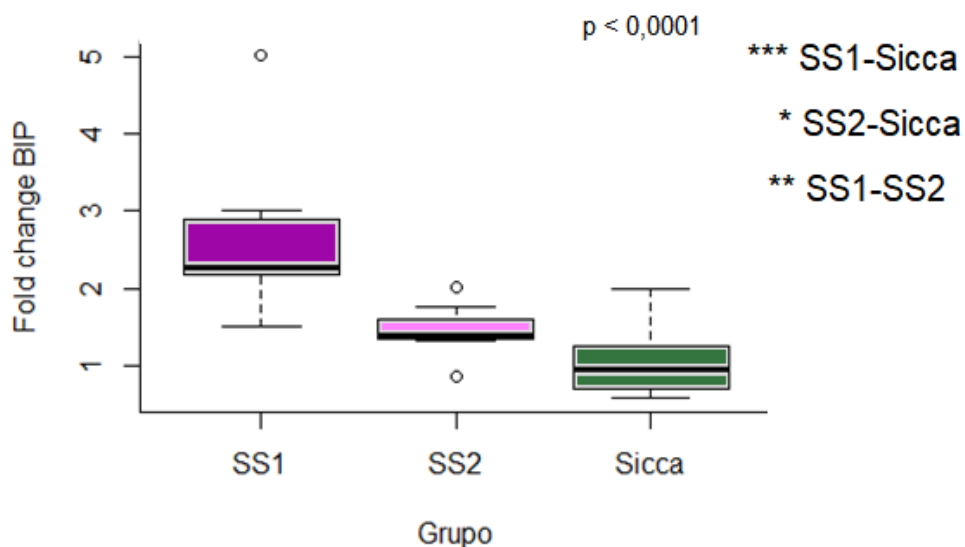
P-valor referente ao teste Tukey.

Tabela 15 - Distribuição de BIP nos grupos Sjögren (SS1 + SS2) e não Sjögren (Sicca + controle)

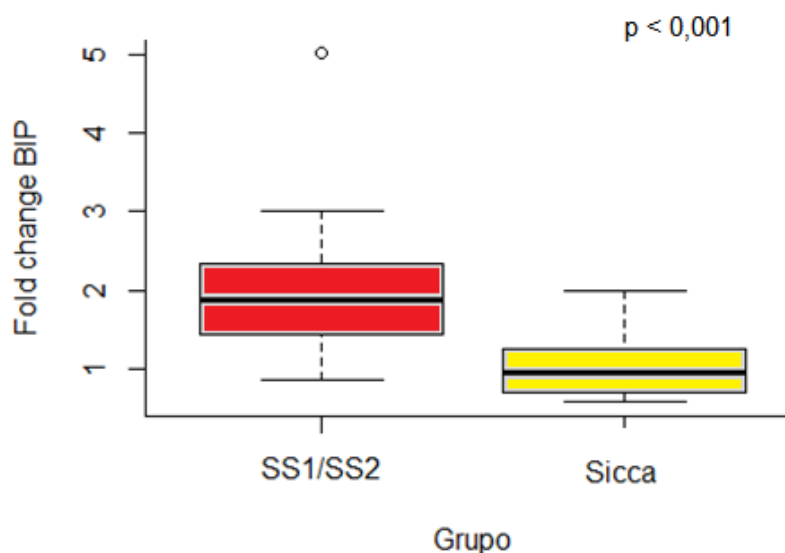
Variável	Grupo	N	Média	Desv. Pad.	Mediana	Q1	Q3	Mín	Máx	P-valor
logBIP	SS1/SS2	20	2,07	0,91	1,89	1,45	2,34	0,85	5,02	<0,001
logBIP	Sicca/Controle	12	1,04	0,42	0,96	0,7	1,24	0,58	1,98	

N: Número de casos analisados; **DP:** Desvio padrão; **Q1:** quartil1; **Q3:** quartil 3; **Mín:** valor mínimo; **Máx:** valor máximo; P-valor referente ao teste t.

Figura 21 - Distribuição de BIP entre os quatro grupos (SS1, SS2 e Sicca)



*p<0,05; **p<0,005; ***p<0,0005.

Figura 22 - Distribuição de BIP entre os grupos Sjögren (SS1 + SS2) e não Sjögren (Sicca)

4.5.4 Expressão de CALR

O gene CALR se apresentou menos expresso nos grupos SS1, SS2 e Sicca do que no grupo controle ($p < 0,0001$) (Tabela 16). Na análise grupo a grupo, houve relevância estatística entre SS1 e Sicca, SS2 e Sicca, Sicca e controle (Tabela 17). Não houve diferença entre SS1 e SS2. Na análise agrupada Sjögren (SS1 + SS2) e não Sjögren (Sicca + controle), o CALR foi mais expresso no grupo Sjögren do que no grupo não Sjögren ($p = 0,0009$) (Tabela 18). A expressão de CALR entre os grupos pode ser avaliada nas Figuras 23 e 24.

Tabela 16 - Distribuição de CALR em cada grupo de estudo

Variável	Grupo	N	Média	Desv. Pad.	Mediana	Q1	Q3	Mín	Máx	P-valor
CALR	SS1	15	0,88	0,37	0,94	0,52	1,17	0,34	1,42	
CALR	SS2	11	0,66	0,34	0,57	0,35	0,96	0,22	1,37	<0,0001
CALR	Sicca	13	0,27	0,17	0,25	0,11	0,34	0,07	0,57	
CALR	Controle	5	1	0,63	0,78	0,63	1,23	0,37	1,98	

N: Número de casos analisados; **DP:** Desvio padrão; **Q1:** quartil1; **Q3:** quartil 3; **Mín:** valor mínimo; **Máx:** valor máximo; P-valor referente à ANOVA.

Tabela 17 - Valores de P referentes às comparações entre os grupos em CALR

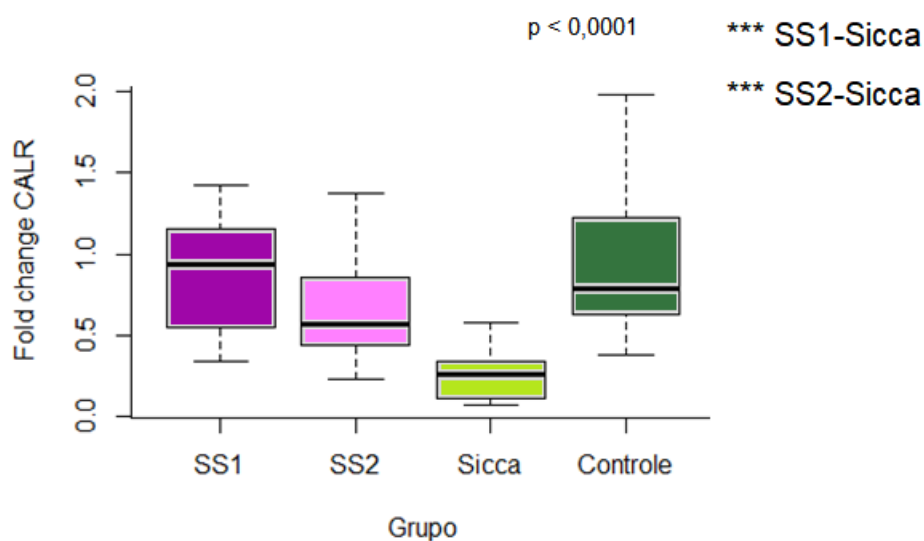
		Sicca	Controle
logCALR	SS1	<,0001	0,8419
	SS2	0,0003	0,2305
	Sicca		<,0001

P-valor referente ao teste Tukey.

Tabela 18 - Distribuição de CALR nos grupos Sjögren (SS1 + SS2) e não Sjögren (Sicca + controle)

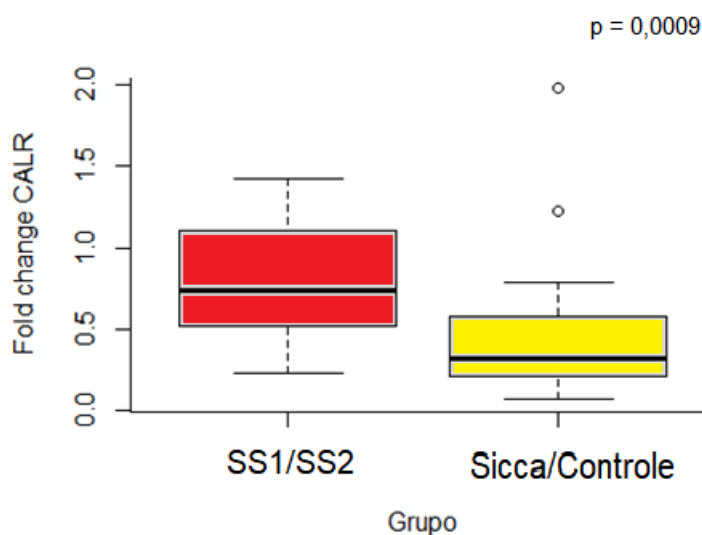
Variável	Grupo	N	Média	Desv. Pad.	Mediana	Q1	Q3	Mín	Máx	P-valor
logCALR	SS1/SS2	26	0,79	0,37	0,73	0,52	1,1	0,22	1,42	0,0009
logCALR	Sicca/Controle	18	0,48	0,47	0,31	0,21	0,57	0,07	1,98	

N: Número de casos analisados; **DP:** Desvio padrão; **Q1:** quartil1; **Q3:** quartil 3; **Mín:** valor mínimo; **Máx:** valor máximo; P-valor referente ao teste t.

Figura 23 - Distribuição de CALR entre os quatro grupos (SS1, SS2, Sicca e controle)

* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$

Figura 24 - Distribuição de CALR entre os grupos Sjögren (SS1 + SS2) e não Sjögren (Sicca e Controle)



4.5.5 Expressão de CANX

O gene CANX demonstrou variabilidade de expressão entre os quatro grupos, com maior expressão em SS1 do que nos demais grupos ($p=0,0225$) (Tabela 19). Observou-se relevância estatística apenas entre SS1 e SS2, SS1 e Sicca (Tabela 20). Não houve diferença entre Sicca e controle. Na análise agrupada (Sjögren e não Sjögren) notou-se maior expressão no grupo Sjögren, porém sem relevância estatística (Tabela 21). A expressão de CANX entre os grupos pode ser observada nas Figuras 25 e 26.

Tabela 19 - Distribuição de CANX em cada grupo de estudo

Variável	Grupo	N	Média	Desv. Pad.	Mediana	Q1	Q3	Mín	Máx	P-valor
CANX	SS1	15	1,31	0,76	1,13	0,72	2,11	0,04	2,66	
CANX	SS2	11	0,73	0,39	0,76	0,53	0,9	0,12	1,53	0,0225
CANX	SICCA	13	0,51	0,52	0,2	0,06	1,06	0,02	1,47	
CANX	Controle	5	1	1,17	0,69	0,42	0,87	0,01	3,01	

N: Número de casos analisados; **DP:** Desvio padrão; **Q1:** quartil1; **Q3:** quartil 3; **Mín:** valor mínimo; **Máx:** valor máximo; P-valor referente a ANOVA.

Tabela 20 - Valores de P referentes às comparações entre os grupos em CANX

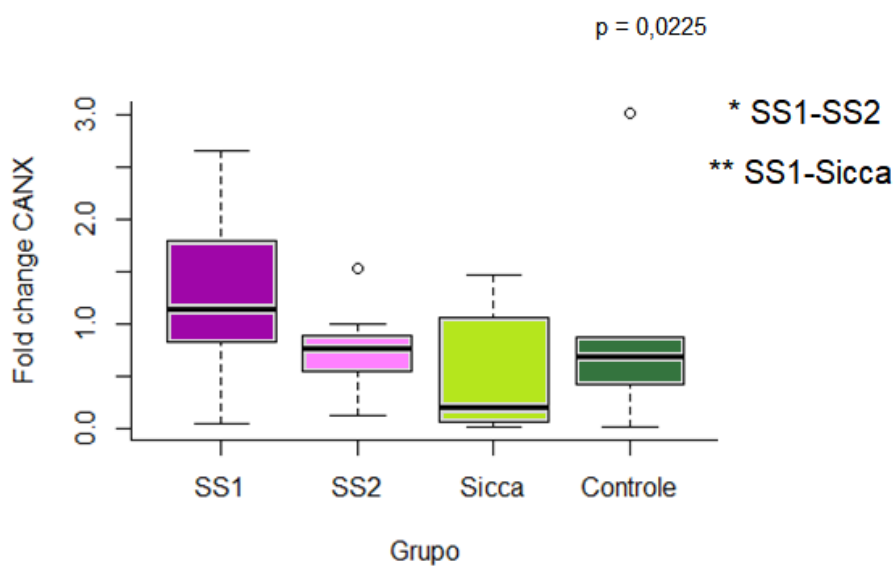
		SS2	Sicca	Controle
CANX	SS1	0,0363	0,0033	0,3849
	SS2		0,4331	0,4559

P-valor referente ao teste Tukey.

Tabela 21 - Distribuição de CANX nos grupos Sjögren (SS1 + SS2) e não Sjögren (Sicca + controle)

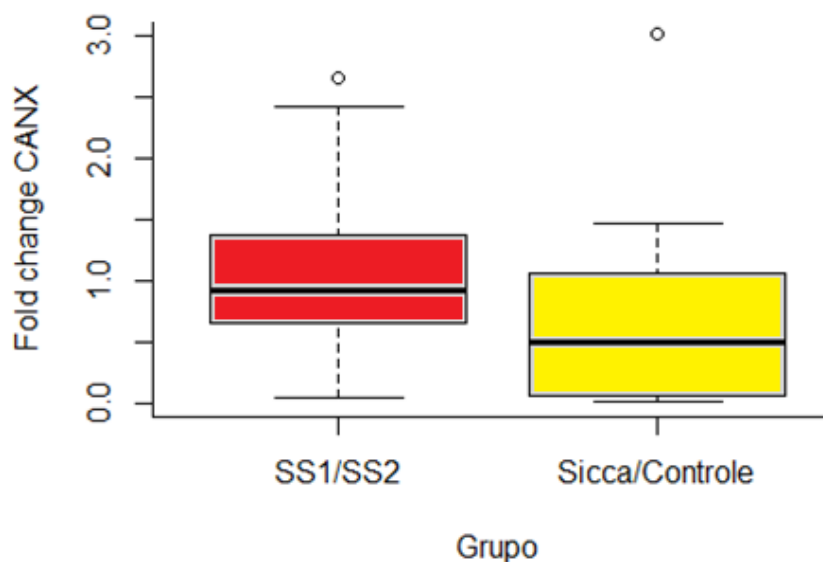
Variável	Grupo	N	Média	Desv. Pad.	Mediana	Q1	Q3	Mín	Máx	P-valor
CANX	SS1/SS2	26	1,06	0,69	0,92	0,66	1,37	0,04	2,66	0,0628
CANX	Sicca/Controle	18	0,64	0,75	0,49	0,06	1,06	0,01	3,01	

N: Número de casos analisados; **DP:** Desvio padrão; **Q1:** quartil1; **Q3:** quartil 3; **Mín:** valor mínimo; **Máx:** valor máximo; P-valor referente ao teste t.

Figura 25 - Distribuição de CANX entre os quatro grupos (SS1, SS2, Sicca e controle)

*p<0,05; **p<0,005; ***p<0,0005.

Figura 26 - Distribuição de CANX entre os grupos Sjögren (SS1 + SS2) e não Sjögren (Sicca e Controle)



4.5.6 Expressão de ATF-4

O gene ATF-4 se mostrou menos expresso nos grupos SS1 e SS2, comparado ao controle (Tabela 22), todavia sua expressão não apresentou relevância estatística em nenhuma combinação de grupos (Tabelas 23 e 24). Sua distribuição entre os grupos pode ser visualizada nas Figuras 27 e 28.

Tabela 22 - Distribuição de ATF-4 em cada grupo de estudo

Variável	Grupo	N	Média	DP	Mediana	Q1	Q3	Mín	Máx	P-valor
ATF-4	SS1	13	0,93	0,21	0,99	0,75	1,11	0,56	1,21	
ATF-4	SS2	10	0,82	0,32	0,78	0,65	0,94	0,29	1,46	0,3042
ATF-4	SICCA	14	0,81	0,83	0,6	0,34	0,98	0,04	3,3	
ATF-4	Controle	6	1	0,61	1,06	0,65	1,47	0,1	1,66	

N: Número de casos analisados; **DP:** Desvio padrão; **Q1:** quartil1; **Q3:** quartil 3; **Mín:** valor mínimo; **Máx:** valor máximo; P-valor referente a ANOVA.

Tabela 23 - Valores de P referentes às comparações entre os grupos em ATF-4

		SS2	Sicca	Controle
logATF-4	SS1	0,5797	0,0657	0,5784
	SS2		0,2396	0,936
	Sicca			0,3592

P-valor referente ao teste Tukey.

Tabela 24 - Distribuição de ATF-4 nos grupos Sjögren (SS1 + SS2) e não Sjögren (Sicca + controle)

Variável	Grupo	N	Média	Desv. Pad.	Mediana	Q1	Q3	Mín	Máx	P-valor
logATF-4	SS1/SS2	23	0,88	0,26	0,93	0,69	1,1	0,29	1,46	0,1394
logATF-4	Sicca/Controle	20	0,87	0,76	0,68	0,35	1,21	0,04	3,3	

N: Número de casos analisados; **DP:** Desvio padrão; **Q1:** quartil1; **Q3:** quartil 3; **Mín:** valor mínimo; **Máx:** valor máximo; P-valor referente ao teste t.

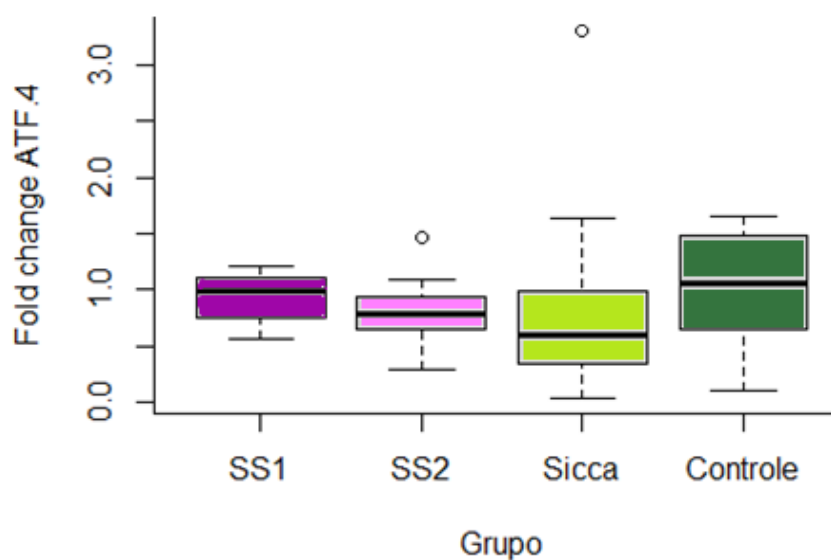
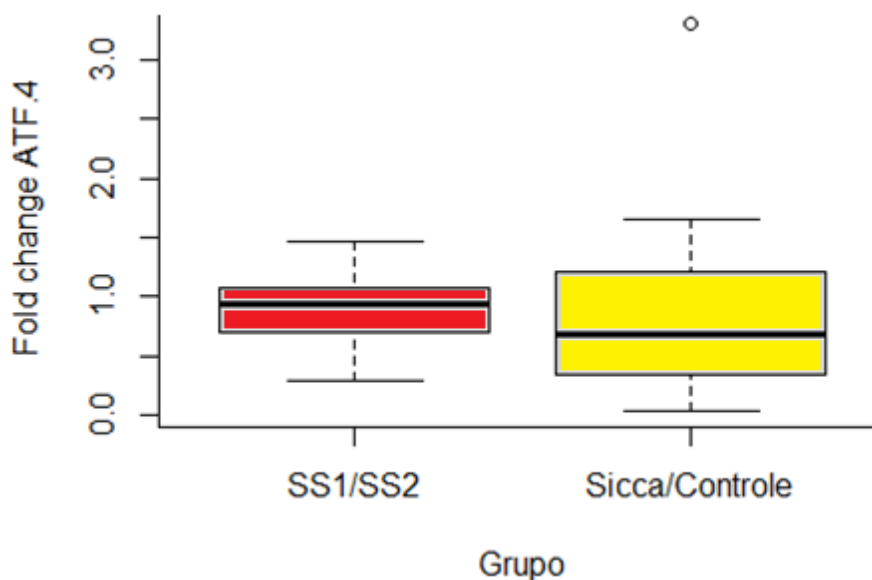
Figura 27 - Distribuição de ATF-4 entre os quatro grupos (SS1, SS2, Sicca e controle)

Figura 28 - Distribuição de ATF-4 entre os grupos Sjögren (SS1 + SS2) e não Sjögren (Sicca + Controle)



4.5.7 Expressão de ATF-6

O gene ATF-6 se mostrou menos expresso nos grupos SS1, SS2 e Sicca, comparado ao controle, com relevância estatística ($p=0,0005$) (Tabela 25). No entanto, essa significância estatística não foi observada entre todos os grupos, apenas entre SS1 x controle, SS2 x controle e Sicca x controle (Tabela 26). Não houve diferença entre SS1 e SS2. Quando analisados os grupos Sjögren x não Sjögren, o gene ATF-6 se apresentou menos expresso no grupo Sjögren, porém sem relevância estatística (Tabela 27). A distribuição da expressão do gene entre os grupos pode ser observada nas Figuras 29 e 30.

Tabela 25 - Distribuição de ATF-6 em cada grupo de estudo

Variável	Grupo	N.	Média	Desv. Pad.	Mediana	Q1	Q3	Mín	Máx	P-valor
ATF-6	SS1	16	0,43	0,53	0,24	0,15	0,32	0,09	1,97	
ATF-6	SS2	12	0,34	0,29	0,24	0,13	0,45	0,07	0,91	0,0005
ATF-6	SICCA	17	0,41	0,68	0,16	0,09	0,38	0,03	2,84	
ATF-6	Controle	13	1	0,62	0,81	0,54	1,42	0,26	2,48	

N: Número de casos analisados; **DP:** Desvio padrão; **Q1:** quartil1; **Q3:** quartil 3; **Mín:** valor mínimo; **Máx:** valor máximo; P-valor referente a ANOVA.

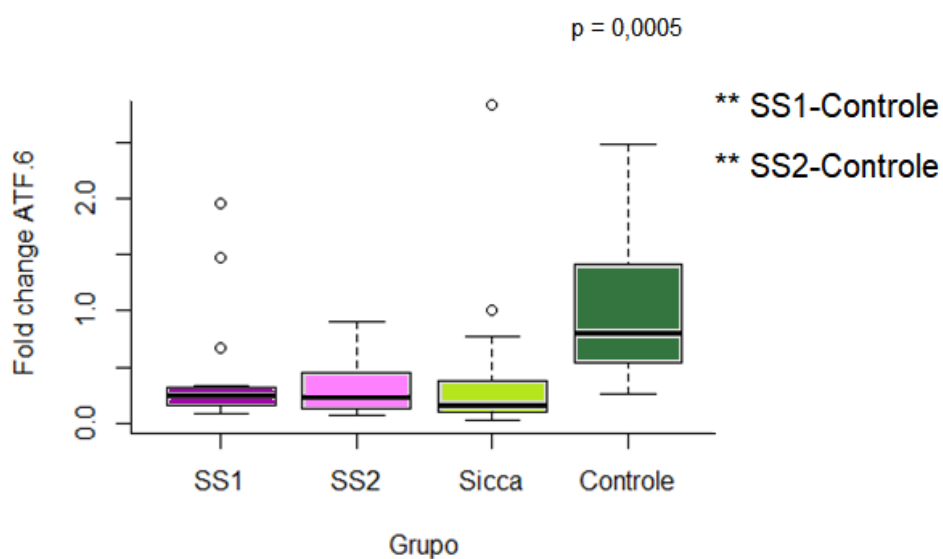
Tabela 26 - Valores de P referente às comparações entre os grupos em ATF-6

		Sicca	Controle
logATF-6	SS1	0,3271	0,0017
	SS2	0,6004	0,0011
	Sicca		<,0001

Tabela 27 - Distribuição de ATF-6 nos grupos Sjögren (SS1 + SS2) e não Sjögren (Sicca + Controle)

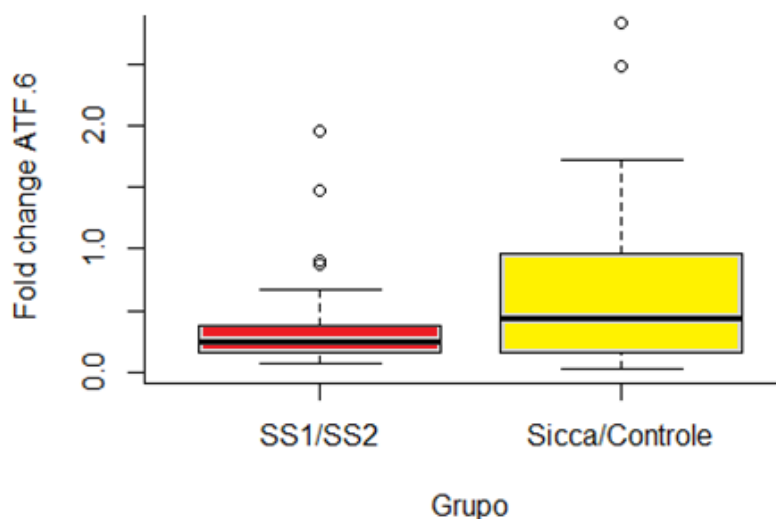
Variável	Grupo	N.	Média	Desv. Pad.	Mediana	Q1	Q3	Min	Max	P-valor
logATF-6	SS1/SS2	28	0,39	0,44	0,24	0,15	0,38	0,07	1,97	0,1836
logATF-6	Sicca/Controle	30	0,67	0,71	0,43	0,16	0,97	0,03	2,84	

N: Número de casos analisados; **DP:** Desvio padrão; **Q1:** quartil1; **Q3:** quartil 3; **Mín:** valor mínimo; **Máx:** valor máximo; P-valor referente ao teste t.

Figura 29 - Distribuição de ATF-6 entre os quatro grupos (SS1, SS2, Sicca e controle)

*p<0,05; **p<0,005; ***p<0,0005.

Figura 30 - Distribuição de ATF-6 entre os grupos Sjögren (SS1 + SS2) e não Sjögren (Sicca + Controle)



4.5.8 Expressão de CHOP

O gene CHOP apresentou menor expressão nos grupos Sjögren (SS1 e SS2) e Sicca do que no grupo controle ($p=0,0011$) (Tabela 28). Foi observada significância estatística entre os grupos SS1 e SS2, SS2 e controle e Sicca e controle (Tabela 29). Quando agrupados SS1 + SS2 e comparados com Sicca + controle, verificou-se menor expressão no grupo Sjögren, porém sem relevância estatística (Tabela 30). A distribuição da expressão de CHOP entre os grupos pode ser observada nas Figuras 31 e 32.

Tabela 28 - Distribuição de CHOP em cada grupo de estudo

Variável	Grupo	N.	Média	Desv. Pad.	Mediana	Q1	Q3	Mín	Máx	P-valor
CHOP	SS1	16	0,51	0,5	0,26	0,22	0,69	0,15	1,8	
CHOP	SS2	12	0,22	0,22	0,14	0,11	0,27	0,04	0,88	0,0011
CHOP	SICCA	17	0,55	0,9	0,17	0,07	0,61	0,02	2,98	
CHOP	Controle	13	1	0,91	0,56	0,44	1,22	0,38	3,55	

N: Número de casos analisados; **DP:** Desvio padrão; **Q1:** quartil1; **Q3:** quartil 3; **Mín:** valor mínimo; **Máx:** valor máximo; P-valor referente a ANOVA.

Tabela 29 - Valores de P referentes às comparações entre os grupos em CHOP

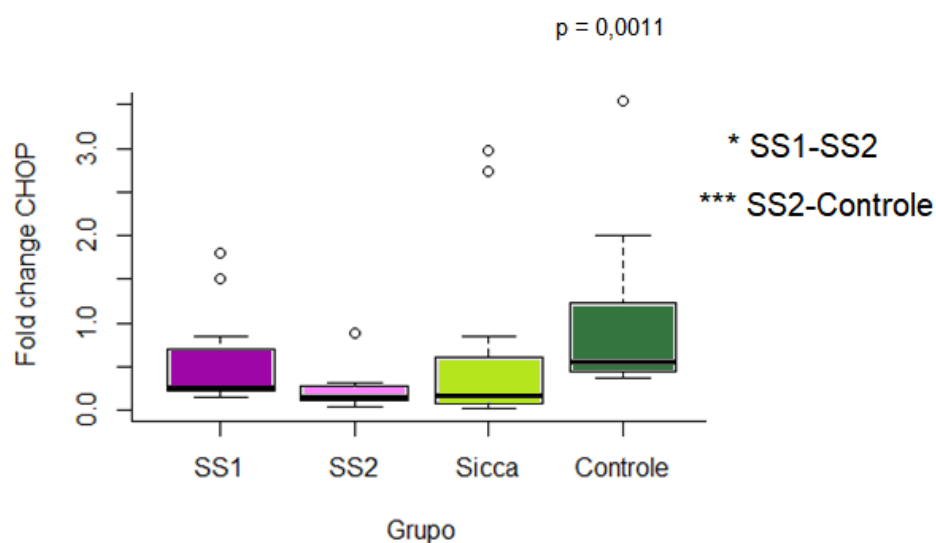
		SS2	Sicca	Controle
logCHOP	SS1	0,0469	0,0839	0,058
	SS2		0,6669	0,0004
	Sicca			0,0006

P-valor referente ao teste Tukey.

Tabela 30 - Distribuição de CHOP nos grupos Sjögren (SS1 + SS2) e não Sjögren (Sicca + controle)

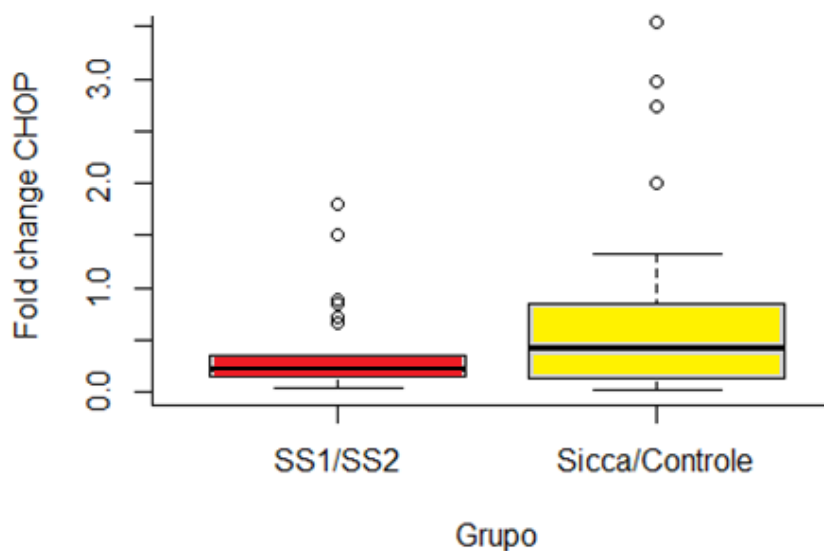
Variável	Grupo	N.	Média	Desv. Pad.	Mediana	Q1	Q3	Mín	Máx	P-valor
logCHOP	SS1/SS2	28	0,39	0,42	0,22	0,15	0,35	0,04	1,8	0,3114
logCHOP	Sicca/Controle	30	0,74	0,92	0,42	0,13	0,85	0,02	3,55	

N: Número de casos analisados; **DP:** Desvio padrão; **Q1:** quartil1; **Q3:** quartil 3; **Mín:** valor mínimo; **Máx:** valor máximo; P-valor referente ao teste t.

Figura 31 - Distribuição de CHOP entre os quatro grupos (SS1, SS2, Sicca e controle)

*p<0,05; **p<0,005; ***p<0,0005.

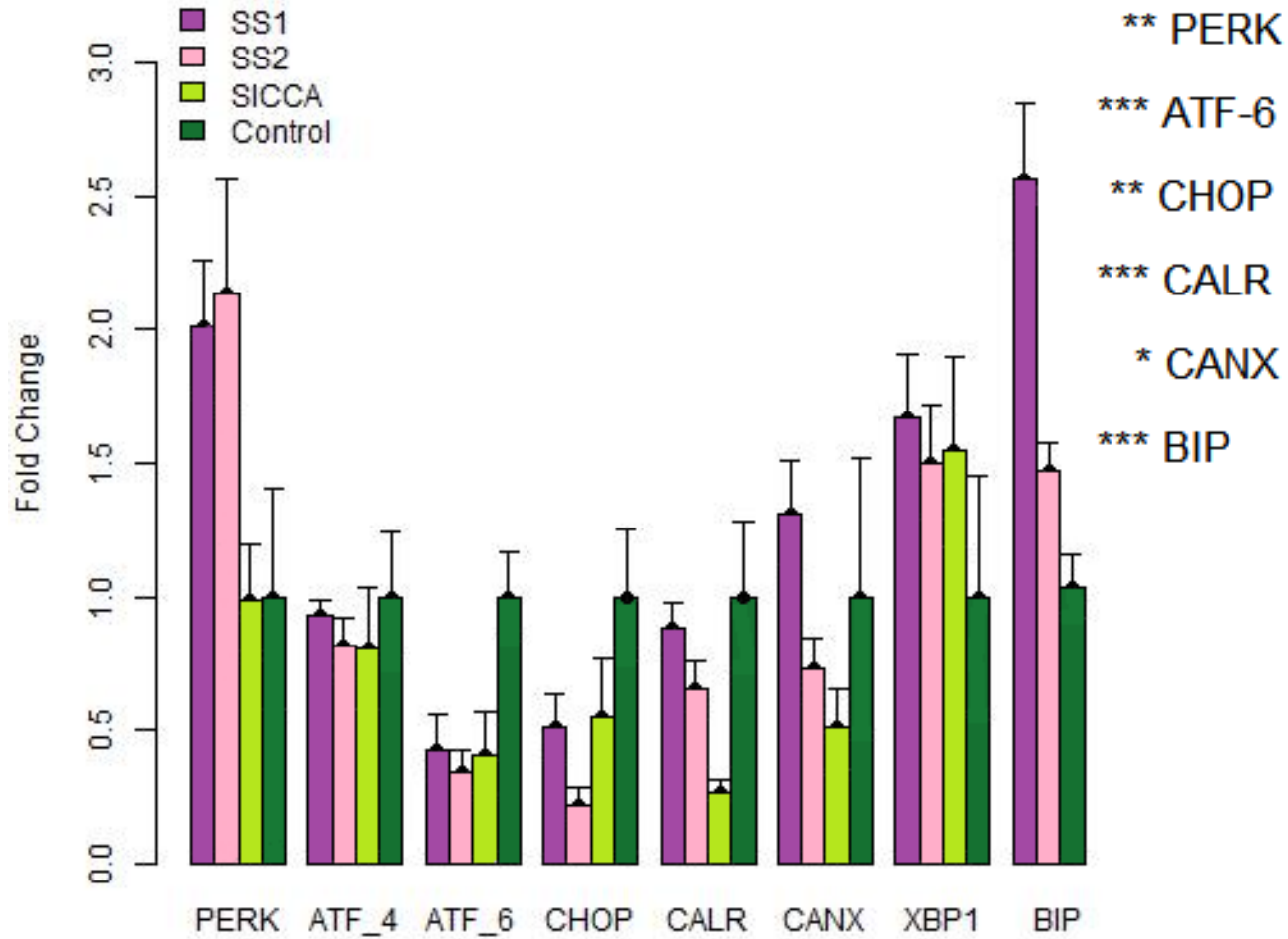
Figura 32 - Distribuição de CHOP entre os grupos Sjögren (SS1 + SS2) e não Sjögren (Sicca e controle)



4.5.9 Expressão dos genes do ERE nos quatro grupos

Houve aumento da expressão de PERK e BIP, tanto no grupo SS1 quanto no SS2 em relação aos controles, com relevância estatística. XBP1 se mostrou significativamente elevado no grupo SS1 em relação ao controle e, apesar de também elevado no grupo SS2, o resultado não foi relevante. A expressão de ATF-4, ATF-6, CHOP e CALR encontraram-se reduzidas nos grupos SS1, SS2 e Sicca em relação aos controles, porém em ATF-4 os resultados não foram significativos. Na Figura 33 é possível observar a distribuição dos genes em todos os grupos e seus respectivos desvios padrões.

Figura 33 - Distribuição dos genes PERK, ATF-4, ATF-6, CHOP, CALR, CANX, XBP e BIP nos grupos SS1, SS2, Sicca e controle



*p<0,05; **p<0,005; ***p<0,0005.

5. Discussão

A SS afeta nove mulheres/um homem, com média de idade entre 30 e 50 anos (BRITO-ZERÓN *et al.*, 2016), proporção que corrobora os achados do grupo estudado. A etiologia da SS ainda não é completamente conhecida, porém múltiplos fatores parecem estar associados. A predisposição genética é um pré-requisito, mas modificações epigenéticas também são necessárias para o desenvolvimento de doenças autoimunes. Fatores como desregulação imune, hormônios, estresse, infecções, drogas, vacinas ou implantes de silicone são atualmente discutidos como possíveis desreguladores da resposta imune inata e adaptativa. Infecções virais como pelo Epstein Barr são candidatas suspeitas para o desenvolvimento da SS (ANDRÉ; BÖCKLE, 2022). Aumento da incidência de SS também foi documentado no Brasil após a pandemia da COVID-19 comparada aos anos anteriores (MARTELLI JÚNIOR *et al.*, 2022).

Células com função secretora, como de glândulas salivares, e células do sistema imune compartilham uma característica comum: o aumento do RE para maior produção de proteínas. O equilíbrio da célula depende de um RE com bom funcionamento, capaz de secretar seus principais componentes, como as glicoproteínas envolvidas nas apresentações antigênicas. Todas as proteínas são sintetizadas e dobradas no RE, por isso qualquer distúrbio na função da dobra proteica, controle de qualidade proteico, ou homeostase do cálcio, pode promover acúmulo de proteínas não dobradas ou mal dobradas, situação conhecida como ERE (BARRERA *et al.*, 2018). Diversas condições podem induzir o estado de ERE, como infecções virais (ZHANG; WANG, 2012), hipóxia, estresse oxidativo (PLUQUET; POURTIER; ABBADIE, 2015), diabetes, doenças neurodegenerativas (OAKES; PAPA, 2015) e câncer (ROZPEDEK *et al.*, 2016).

Doenças autoimunes são caracterizadas por estado de inflamação que tem sido associado à condição de ERE. A sinalização inflamatória, como por exemplo, a mediada pelos IFN I e II, pode ativar o ERE. A ativação do ERE desencadeia um mecanismo de sobrevivência da célula para restabelecer o equilíbrio e o bom funcionamento, acionando a UPR, uma via que leva ao aumento da capacidade da célula de realizar dobras proteicas e manter a qualidade das proteínas. Alterações na expressão de moléculas relacionadas à UPR podem contribuir para o surgimento de doenças inflamatórias crônicas e autoimunes (BARRERA *et al.*, 2018).

As três vias principais da UPR são IRE1 α , ATF-6 e PERK. Nenhum estudo realizou a análise destas três vias em paralelo em quatro grupos: SS1, SS2, Sicca e controle. Em condições em que não há ERE, o BIP permanece ligado aos sensores da UPR. Em condições de ERE, como acúmulo de proteínas mal dobradas, estresse oxidativo, depleção de cálcio, citocinas inflamatórias, esgotamento metabólico, alteração de temperatura ou pH, o BIP se dissocia de IRE1 α , ATF-6 e PERK. A liberação e ativação de PERK levam à fosforilação de eIF2 α , que atenua, temporariamente, a translação de proteínas e age sobre o ATF-4 para aumentar a transcrição de proteínas que promovem a sobrevivência da célula em condições de estresse (HALPERIN; JUNG; MICHALAK, 2014). Bahamondes *et al.* (2016) realizaram um estudo em 11 pacientes com SS sem diferencial de subtipo e 12 controles, evidenciando aumento da expressão de ATF-4 nos pacientes com SS, porém com ativação de PERK semelhante aos controles. Já Wang *et al.* (2014), em uma análise com 76 pacientes com LES, encontraram redução significativa de PERK. Sabe-se que uma das formas de tratamento do LES é a cloroquina. Os derivados 4-aminoquinolinas ligam-se às nucleoproteínas e interferem na síntese de proteínas, bem como inibem a polimerase do DNA e RNA. Além disso, o mecanismo anti-inflamatório deste medicamento no LES e na AR ainda não é completamente compreendido (FIOCRUZ, 2017). Este pode ser um possível fator para achados de PERK reduzidos no estudo de Wang *et al.* (2014). Neste estudo, o PERK se mostrou aumentado, tanto para SS1 quanto para SS2 em detrimento dos controles, demonstrando que esta via é ativada na SS, independente da etiologia. Apesar de estar correlacionado à via de PERK, neste estudo o ATF-4 se mostrou menos expresso nos grupos com SS, porém sem relevância estatística.

Quando liberado o IRE1 α , este ativa o XBP1, que se transloca até o núcleo, onde induz a transcrição de vários genes que aumentam o tamanho e a função do RE, garantindo melhor controle das proteínas, transporte e degradação de proteínas mal dobradas (PLUQUET; POURTIER; ABBADIE, 2015). O aumento da expressão de XBP1 nos pacientes com SS e Sicca em relação aos controles é um sinal de que existe relação desta via com a UPR, todavia o estudo só mostrou aumento significativo no grupo de SS1 em relação ao controle, o que pode sinalizar maior gravidade do ERE em SS1. Considerando que a SS2 tem relação com outras

doenças autoimunes, o achado de aumento de XBP1 em SS2 corrobora os resultados do estudo de Wang *et al.* (2014) que compararam a expressão dos genes do ERE em 76 pacientes com LES e 69 controles, encontrando regulação positiva de XBP1, apesar da regulação negativa em IRE1, PERK e CHOP. Já Sepulveda *et al.* (2018) encontraram resultados discrepantes na análise de 47 pacientes com SS e 37 controles, com decréscimo na expressão de IRE1 α , XBP1 e BIP.

O ATF-6 é uma proteína transmembrana tipo II do RE que se torna ativada no ERE e se transloca para o CG, onde é clivada pelas proteases S1P e S2P liberando no citosol os fragmentos de ATF-6(N), com uma porção N-terminal livre. O ATF-6(N) migra para o núcleo e ativa a transcrição de genes da UPR e da ERAD. O sistema ERAD é responsável por retirar as proteínas mal dobradas da luz do RE e levá-las ao citoplasma para que possam ser degradadas, auxiliando no processo da homeostase (OAKES; PAPA, 2015). Takahata *et al.* (2008) relataram que a isoforma de 52-KDa da proteína SSA/Ro (Ro52) possui atividade E3 ubiquitina ligase, uma proteína do sistema ERAD que promove a degradação de imunoglobulinas IgG1 mal dobradas. Além disso, Ro52 interage com a chaperona P97/VCP, outra proteína do sistema ERAD (TAKAHATA *et al.*, 2008). Barrera *et al.* (2016) encontraram aumento de ATF-6 e da via da ERAD associada ao aumento de citocinas pró-inflamatórias no estudo com 13 pacientes com SS1. Neste estudo, no entanto, o ATF-6 foi menos expresso, tanto em SS1 quanto em SS2, sem diferença entre os dois. Isso sugere que o ATF-6 não participa do ERE neste grupo de pacientes, porém não é possível avaliar especificamente a via da ERAD, uma vez que mais genes precisariam ser avaliados.

A hiperativação de PERK acelera o processo de morte celular por meio da regulação positiva de CHOP e inibição do gene antiapoptótico BCL-2. O processo de apoptose encontra-se relacionado à perda da função glandular e redução do fluxo de saliva e lágrima. Neste estudo, PERK se mostrou aumentado no grupo SS, porém CHOP foi menos expresso nos grupos SS e Sicca do que nos controles, o que pode sinalizar a não ativação da via da apoptose nesses pacientes. Enquanto Bahamondes *et al.* (2016) encontraram aumento de PERK correlacionado ao aumento de CHOP, Manganelli e Fietta (2003) descreveram a correlação da expressão de BCL-2 em pacientes com SS associada ao prolongamento do

processo inflamatório e risco para o desenvolvimento de linfoma em pacientes com SS. Isso sugere que pode haver mais mecanismos envolvidos na via do ERE que sustentam o processo de estresse, como o aumento de PERK, sem ativação da via da apoptose, favorecendo o desenvolvimento de linfoma em pacientes com SS.

Para a secreção salivar normal, é essencial uma apropriada sinalização de cálcio, transporte de água, regulação do volume celular e estímulo nervoso autonômico. Enger *et al.* (2014) constataram importante redução da resposta de cálcio após estímulo parassimpático em pacientes com SS. Sabe-se que citocinas pró-inflamatórias depletam os estoques de cálcio intracelular, interferindo na atividade da bomba de cálcio-ATPase, o que, portanto, afeta a sinalização de cálcio e a função das células ductais das glândulas salivares de pacientes com SS (MEEHAN *et al.*, 1997). Além disso, o cálcio é também um cofator para chaperonas dependentes de cálcio, como BIP, CALR e CANX (HALPERIN; JUNG; MICHALAK, 2014). Pacientes com SS apresentam níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, como TNF α , IFN, IL-6, que alteram a sinalização de cálcio e exarcebam o mal dobramento de proteínas, induzindo o ERE (FOX; BRENNAN; DI SUN, 1999).

Staikou *et al.* (2003) observaram reação do anticorpo anti-Ro contra o complexo CALR - peptídeo da isoforma de 60KDa da proteína SSA/Ro em todos os 38 pacientes com LES e SS com anti-Ro sérico positivo, o que sugere que CALR pode induzir o reconhecimento do epítipo Ro e de seu respectivo anticorpo. Nesta análise, CALR encontrou-se significativamente aumentada no grupo Sjögren. Isso reforça achados de outros estudos que também encontraram evidências da associação de CALR ao ERE em SS.

CALR e CANX são duas proteínas do RE com alto grau de similaridade e que atuam em conjunto no sistema de controle de qualidade das proteínas do RE (CHARONIS *et al.*, 2017). Não há estudos prévios de CANX em SS, no entanto Weber *et al.* (2010) encontraram anticorpos contra CANX em pacientes com LES e AR. Neste estudo, CANX mostrou-se elevado em pacientes com SS1 e reduzido naqueles com SS2, Sicca e controle, porém com relevância apenas entre SS1 e SS2, SS1 e Sicca. Isso sugere que CANX pode estar relacionado à via da UPR apenas em pacientes com SS1.

O BIP/GRP78 é uma das principais chaperonas do RE. Ela permanece ligada às três proteínas da via da UPR no estado de homeostase, mas se desconecta no estado de ERE liberando PERK, IRE1 α e ATF-6 para controlar o acúmulo de proteínas mal dobradas. Estudos prévios sugerem que a redução de BIP associada à redução de IRE1 α e XBP1 em pacientes com SS está relacionada ao estado de ERE crônico e disfunção glandular (SEPÚLVEDA *et al.*, 2018). Todavia, Lee *et al.* (2015) encontraram expressão de BIP associada ao aumento de respostas apoptóticas mediadas por CHOP em linfócitos T de pacientes com LES. No presente estudo, o BIP se mostrou significativamente elevado em pacientes com SS, associado à elevação de PERK e XBP1, sobretudo em SS1, apesar de CHOP reduzido, o que sugere ativação da via da UPR, porém sem ativação da via de apoptose, sinalizando o estado de ERE crônico.

Sabe-se que a SS2 possui relação com outras doenças autoimunes que podem desencadear e afetar o ERE por mecanismos diferentes. Da mesma forma, existem dois tipos de Sicca não Sjögren, os pacientes que preenchem os critérios objetivos do consenso internacional de 2016, porém devido aos critérios de exclusão, têm o diagnóstico de SS descartado; e aqueles que não preenchem os critérios para SS por diversos outros motivos. Nos pacientes Sicca não Sjögren, que preenchem critérios para SS, mas fazem parte do grupo de exclusão, é possível esperar alguma alteração no ERE. Já naqueles com Sicca não Sjögren, que não preenchem critérios para SS, apesar de não se esperar uma atividade do ERE mediada pelos mesmos princípios das doenças autoimunes, sabe-se que fatores externos também podem interferir no ERE por outros meios ainda não totalmente compreendidos. Neste estudo, três pacientes classificados como Sicca não Sjögren possuíam critérios objetivos para SS, porém faziam parte do grupo de exclusão. Alterações na expressão dos genes do ERE no grupo Sicca foram observadas em relação ao grupo controle, porém não com o mesmo grau de expressão do grupo SS. ATF-6, CHOP e CALR se mostraram menos expressos no grupo Sicca, o que sinaliza uma diferença da expressão do ERE neste grupo.

Os resultados deste estudo mostraram aumento da expressão de PERK, CALR e BIP nos pacientes com SS, sinalizando ativação do ERE e da via da UPR nesses pacientes. Houve diferença de expressão dos genes entre os pacientes com

SS1 e SS2 em análise separada. No grupo com SS1 observou-se aumento de PERK, XBP1 e BIP com redução de ATF-6. Já nos pacientes com SS2, houve aumento de PERK e BIP com redução de ATF-6 e CHOP. A redução de ATF-6, tanto em SS1 quanto em SS2, sugere que esta via é pouco recrutada independente da etiologia do SS. O CHOP, apesar de reduzido, foi mais expresso em SS1, o que pode reforçar a maior gravidade do ERE neste grupo. Assim como CANX, que foi mais expresso em SS1, quando comparado a SS2, e XBP1 que esteve aumentado apenas em SS1. Isso pode sugerir que, apesar de se tratar de uma mesma síndrome, há diferenças nos mecanismos que levam ao seu desenvolvimento, bem como sinaliza que o ERE pode ser mais grave em SS1 do que em SS2, pela maior expressão tanto de número quanto do grau de expressão dos genes.

Foram observadas diferenças entre SS e Sicca pelo aumento da expressão de PERK, CALR e BIP, tanto para SS1 quanto para SS2. Já CANX se mostrou aumentado apenas em SS1 quando comparado ao Sicca, o que novamente sugere a possibilidade de maior gravidade do ERE em SS1. Essas alterações reforçam a associação da SS com o ERE e as diferenças de SS e Sicca como doenças de etiologias e mecanismos fisiopatológicos distintos.

6. Conclusões

Os resultados deste estudo permitiram responder ao objetivo principal da tese da seguinte forma:

- Observou-se evidência de ERE em glândulas salivares menores de pacientes com síndrome de Sjögren devido ao aumento da expressão gênica de PERK, CALR e BIP. O BIP foi o principal indicador do estresse, com relevância na análise de todas as combinações dos grupos.

Os objetivos específicos da tese serão respondidos a seguir:

- a) Evidenciou-se maior expressão de genes do ERE na síndrome de Sjögren primária em relação à síndrome de Sjögren secundária, tanto em número quanto em grau, o que sugere diferenças do ERE entre os grupos que podem estar relacionadas à etiologia e ao mecanismo de ação.
- b) Houve maior expressão de genes do ERE na síndrome de Sjögren comparada à Sicca. Isso reforça que o estresse do retículo não está condicionado à presença dos sinais e sintomas observados em Sicca, mas sim ao perfil dos indivíduos que preenchem o conjunto de critérios diagnósticos da síndrome da Sjögren.

7. Referências Bibliográficas¹

¹Elaboradas de acordo com as Diretrizes para Apresentação de Dissertações e Teses da USP: Documento Eletrônico e Impresso - Parte I (ABNT) 4ª ed. São Paulo: SIBi/USP, 2020.

- AFRAMIAN, D. *et al.* Urban legends series: Sjögren's syndrome. **Oral Dis**, v. 19, n. 1, p. 46-58, 2013.
- ALBRECHT, J. *et al.* Skin involvement and outcome measures in systemic autoimmune diseases. **Clin Exp Rheumatol**, v. 24, n. 1, Suppl 40, p. S52-59, 2006.
- ALUNNO, A. *et al.* T Regulatory and T helper 17 cells in primary Sjögren's syndrome: facts and perspectives. **Mediators of Inflamm**, 2015, p. 243723, 2015.
- ALVES-FILHO, M. Chaperonas, as 'damas de companhia' das proteínas. **J Unicamp**, p. 9, 2008. Disponível em: https://www.unicamp.br/unicamp/unicamp_hoje/ju/outubro2008/ju413pdf/Pag09.pdf. Acesso em: 5 mar 2023.
- ANDRÉ, F.; BÖCKLE, B. C. Sjögren's syndrome. **J Dtsch Dermatol Ges**, v. 20, n. 7, p. 980-1002, 2022.
- BAHAMONDES, V. *et al.* OP0271 perk pathway characterization in labial salivary glands of Sjögren Syndrome's patients: Could it be an adaptive response? **Ann Rheum Dis**, v. 75, n. Suppl 2, p. 161-161, 2016.
- BALDINI, C. *et al.* Primary Sjogren's syndrome as a multi-organ disease: impact of the serological profile on the clinical presentation of the disease in a large cohort of Italian patients. **Rheumatology (Oxford)**, v. 53, n. 5, p. 839-844, 2014.
- BARRERA, M. J.; *et al.* Pro-inflammatory cytokines enhance ERAD and ATF6 α pathway activity in salivary glands of Sjögren's syndrome patients. **J Autoimmun**, v. 75, p. 68-81, 2016.
- BARRERA, M. J. *et al.* Endoplasmic reticulum stress in autoimmune diseases: Can altered protein quality control and/or unfolded protein response contribute to autoimmunity? A critical review on Sjögren's syndrome. **Autoimmun Rev**, v. 17, n. 8, p. 796-808, 2018.
- BIKKER, A. *et al.* Increased expression of interleukin-7 in labial salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome correlates with increased inflammation. **Arthritis Rheum**, v. 62, n. 4, p. 969-977, 2010.
- BJORDAL, O. *et al.* Primary Sjögren's syndrome and the eye. **Surv Ophthalmol**, v. 65, n. 2, p. 119-132, 2020.
- BRIGHTBILL, H. D. *et al.* NF- κ B inducing kinase is a therapeutic target for systemic lupus erythematosus. **Nat Commun**, v. 9, n. 1, p. 179, 2018.
- BRITO-ZERÓN, P. *et al.* Sjögren syndrome. **Nat Rev Dis Primers**, v. 2, n. 1, p. 16047, 2016.

- BROTT, N. R.; RONQUILLO, Y. **Schirmer Test**. [Updated 2022 May 8]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559159/>. Acesso em: 5 mar 2023.
- CHARONIS, A. S. *et al.* Endoplasmic reticulum in health and disease: the 12th International Calreticulin Workshop, Delphi, Greece. **J Cell Mol Med**, v. 21, n. 12, p. 3141-3149, 2017.
- CHRISTODOULOU, M. I. *et al.* Foxp3+ T-regulatory cells in Sjogren's syndrome: correlation with the grade of the autoimmune lesion and certain adverse prognostic factors. **Am J Pathol**, v. 173, n. 5, p. 1389-1396, 2008.
- DUPIN, N. *et al.* Detection of HHV-8 in Sjögren's syndrome. **Am J Med**, v. 101, n. 6, p. 657-658, 1996.
- ENGER, T. B. *et al.* Calcium signaling and cell volume regulation are altered in Sjögren's Syndrome. **Acta Odontol Scand**, v. 72, n. 7, p. 549-556, 2014.
- FENTON, W. A.; HORWICH, A. L. Chaperonin-mediated protein folding: fate of substrate polypeptide. **Q Rev Biophys**, v. 36, n. 2, p. 229-256, 2003.
- FIOCRUZ. **Farmanguinhos cloroquina. Difosfato de cloroquina**. Rio de Janeiro, 2017. Disponível em: <https://www.far.fiocruz.br/wp-content/uploads/2017/02/Cloroquina-ProfSaude.pdf>. Acesso em: 08 abr. 2023.
- FLAMENT, T. *et al.* Pulmonary manifestations of Sjögren's syndrome. **Eur Respir Rev**, v. 25, n. 140, p. 110-123, 2016.
- FOX, P. C.; BRENNAN, M.; DI SUN, P. Cytokine expression in human labial minor salivary gland epithelial cells in health and disease. **Arch Oral Biol**, v. 44 Suppl 1, p. S49-52, 1999.
- FOX, R. I.; PEARSON, G.; VAUGHAN, J. H. Detection of Epstein-Barr virus-associated antigens and DNA in salivary gland biopsies from patients with Sjogren's syndrome. **J Immunol**, v. 137, n. 10, p. 3162-3168, 1986.
- FYE, K. H. *et al.* Relationship of HLA-Dw3 and HLA-B8 to Sjögren's syndrome. **Arthritis Rheum**, v. 21, n. 3, p. 337-342, 1978.
- GOICOVICH, E. *et al.* Enhanced degradation of proteins of the basal lamina and stroma by matrix metalloproteinases from the salivary glands of Sjögren's syndrome patients: correlation with reduced structural integrity of acini and ducts. **Arthritis Rheum**, v. 48, n. 9, p. 2573-2584, 2003.
- GOTTENBERG, J.-E. *et al.* Activation of IFN pathways and plasmacytoid dendritic cell recruitment in target organs of primary Sjögren's syndrome. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 8, p. 2770-2775, 2006.

HALL, J. C. *et al.* Precise probes of type II interferon activity define the origin of interferon signatures in target tissues in rheumatic diseases. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 43, p. 17609-17614, 2012.

HALPERIN, L.; JUNG, J.; MICHALAK, M. The many functions of the endoplasmic reticulum chaperones and folding enzymes. **IUBMB Life**, v. 66, n. 5, p. 318-326, 2014.

HILLEN, M. R. *et al.* Dendritic cells, T-cells and epithelial cells: a crucial interplay in immunopathology of primary Sjögren's syndrome. **Expert Rev Clin Immunol**, v. 10, n. 4, p. 521-531, 2014.

IWAKURA, R. **Análise da expressão de genes ligados ao estresse de retículo endoplasmático no adenoma de paratireoide**. 2018. 83f. Tese (Doutorado) - Programa de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

JIN, J. O. *et al.* Interleukin-7 enhances the Th1 response to promote the development of Sjögren's syndrome-like autoimmune exocrinopathy in mice. **Arthritis Rheum**, v. 65, n. 8, p. 2132-2142, 2013.

JIN, J. O.; SHINOHARA, Y.; YU, Q. Innate immune signaling induces interleukin-7 production from salivary gland cells and accelerates the development of primary Sjögren's syndrome in a mouse model. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e77605, 2013.

KABALA, P. A. *et al.* Endoplasmic reticulum stress cooperates with Toll-like receptor ligation in driving activation of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. **Arthritis Res Ther**, v. 19, n. 1, p. 207, 2017.

KATSIIOUGIANNIS, S.; TENTA, R.; SKOPOULI, F. N. Endoplasmic reticulum stress causes autophagy and apoptosis leading to cellular redistribution of the autoantigens Ro/Sjögren's syndrome-related antigen A (SSA) and La/SSB in salivary gland epithelial cells. **Clin Exp Immunol**, v. 181, n. 2, p. 244-252, 2015.

KUO, C. F. *et al.* Familial Risk of Sjögren's Syndrome and Co-aggregation of Autoimmune Diseases in Affected Families: A Nationwide Population Study. **Arthritis Rheumatol**, 67, n. 7, p. 1904-1912, 2015.

KYRIAKIDIS, N. C. *et al.* Toll-like receptor 3 stimulation promotes Ro52/TRIM21 synthesis and nuclear redistribution in salivary gland epithelial cells, partially via type I interferon pathway. **Clin Exp Immunol**, v. 178, n. 3, p. 548-560, 2014.

LEE, W.-S. *et al.* A pathogenic role for ER stress-induced autophagy and ER chaperone GRP78/BiP in T lymphocyte systemic lupus erythematosus. **J Leukoc Biol**, v. 97, n. 2, p. 425-433, 2015.

LESSARD, C. J. *et al.* Variants at multiple loci implicated in both innate and adaptive immune responses are associated with Sjögren's syndrome. **Nat Genet**, v. 45, n. 11, p. 1284-1292, 2013.

LIU, Q. *et al.* Endoplasmic reticulum stress in autoimmune diseases. **Immunobiology**, v. 225, n. 2, p. 151881, 2020.

MANGANELLI, P.; FIETTA, P. Apoptosis and Sjögren syndrome. **Semin Arthritis Rheum**, v. 33, n. 1, p. 49-65, 2003.

MANN, D. L.; MOUTSOPOULOS, H. M. HLA DR alloantigens in different subsets of patients with Sjogren's syndrome and in family members. **Ann Rheum Dis**, v. 42, n. 5, p. 533-536, 1983.

MANOUSSAKIS, M. N.; KAPSOGEORGOU, E. K. The role of intrinsic epithelial activation in the pathogenesis of Sjögren's syndrome. **J Autoimmun**, v. 35, n. 3, p. 219-224, 2010.

MARGARETTEN, M. Neurologic Manifestations of Primary Sjögren Syndrome. **Rheum Dis Clin North Am**, v. 43, n. 4, p. 519-529, 2017.

MARTELLI JÚNIOR, H. *et al.* Increase in the number of Sjögren's syndrome cases in Brazil in the COVID-19 Era. **Oral Dis**, v. 28 Suppl 2, p. 2588-2590, 2022.

MEEHAN, S. *et al.* Interferon-gamma induces a decrease in the intracellular calcium pump in a human salivary gland cell line. **Am J Physiol**, v. 273, n. 6, p. C2030-2036, 1997.

MUNEER, A.; SHAMSHER KHAN, R. M. Endoplasmic Reticulum Stress: Implications for Neuropsychiatric Disorders. **Chonnam Med J**, v. 55, n. 1, p. 8, 2019.

NAVAZESH, M. Methods for collecting saliva. **Ann N Y Acad Sci**, v. 694, p. 72-77, 1993.

NGUYEN, C. Q. *et al.* Salivary gland tissue expression of interleukin-23 and interleukin-17 in Sjögren's syndrome: findings in humans and mice. **Arthritis Rheum**, v. 58, n. 3, p. 734-743, 2008.

NORDMARK, G. *et al.* Additive effects of the major risk alleles of IRF5 and STAT4 in primary Sjögren's syndrome. **Genes Immun**, v. 10, n. 1, p. 68-76, 2009.

OAKES, S. A.; PAPA, F. R. The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology. **Annu Rev Pathol**, v. 10, p. 173-194, 2015.

OHLSSON, M. *et al.* Fas-induced apoptosis is a rare event in Sjögren's syndrome. **Lab Invest**, v. 81, n. 1, p. 95-105, 2001.

OIKAWA, D. *et al.* Activation of mammalian IRE1alpha upon ER stress depends on dissociation of BiP rather than on direct interaction with unfolded proteins. **Exp Cell Res**, v. 315, n. 15, p. 2496-2504, 2009.

OKUMA, A. *et al.* Enhanced Apoptosis by Disruption of the STAT3-IkB- ζ Signaling Pathway in Epithelial Cells Induces Sjögren's Syndrome-like Autoimmune Disease. **Immunity**, v. 38, n. 3, p. 450-460, 2013.

PLUQUET, O.; POURTIER, A.; ABBADIE, C. The unfolded protein response and cellular senescence. A review in the theme: cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 308, n. 6, p. C415-425, 2015.

RAMOS-CASALS, M. Primary Sjogren's syndrome: new clinical and therapeutic concepts. **Ann Rheum Dis**, v. 64, n. 3, p. 347-354, 2004.

RAMOS-CASALS, M. *et al.* Hypocomplementaemia as an immunological marker of morbidity and mortality in patients with primary Sjogren's syndrome. **Rheumatology (Oxford)**, v. 44, n. 1, p. 89-94, 2005.

RASMUSSEN, A. *et al.* Comparison of the American-European Consensus Group Sjogren's syndrome classification criteria to newly proposed American College of Rheumatology criteria in a large, carefully characterised sicca cohort. **Ann Rheum Dis**, v. 73, n. 1, p. 31-38, 2014.

RASMUSSEN, A. *et al.* Reproducibility of ocular surface staining in the assessment of Sjögren syndrome-related keratoconjunctivitis sicca: Implications on disease classification. **ACR Open Rheumatol**, v. 1, n. 5, p. 292-302, 2019.

REVEILLE, J. D. *et al.* Primary Sjögren's syndrome and other autoimmune diseases in families. Prevalence and immunogenetic studies in six kindreds. **Ann Intern Med**, v. 101, n. 6, p. 748-756, 1984.

REVEILLE, J. D. *et al.* Specific amino acid residues in the second hypervariable region of HLA-DQA1 and DQB1 chain genes promote the Ro (SS-A)/La (SS-B) autoantibody responses. **J Immunol**, v. 146, n. 11, p. 3871-3876, 1991.

RITOSSA, F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. **Experientia**, v. 18, p. 571-573, 1962.

ROZPEDEK, W. *et al.* The Role of the PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP Signaling Pathway in Tumor Progression During Endoplasmic Reticulum Stress. **Curr Mol Med**, v. 16, n. 6, p. 533-544, 2016.

SCHWARZ, D. S.; BLOWER, M. D. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. **Cell Mol Life Sci**, v. 73, n. 1, p. 79-94, 2016.

SEPÚLVEDA, D. *et al.* Impaired IRE1 α /XBP-1 pathway associated to DNA methylation might contribute to salivary gland dysfunction in Sjögren's syndrome patients. **Rheumatology (Oxford)**, v. 57, n. 6, p. 1021-1032, 2018.

SHATTLES, W. G. *et al.* Expression of antigen reactive with a monoclonal antibody to HTLV-1 P19 in salivary glands in Sjögren's syndrome. **Clin Exp Immunol**, v. 89, n. 1, p. 46-51, 1992.

SHIBOSKI, C. *et al.* American College of Rheumatology classification criteria for Sjogren's syndrome: a data-driven, expert consensus approach in the Sjogren's International Collaborative Clinical Alliance cohort. **Arthritis Care Res (Hoboken)**. v. 64, n. 4, p. 475-487, 2012.

SHIBOSKI, C. H. *et al.* 2016 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism Classification Criteria for Primary Sjögren's Syndrome: A Consensus and Data-Driven Methodology Involving Three International Patient Cohorts. **Arthritis Rheumatol**, v. 69, n. 1, p. 35-45, 2017.

SHIBOSKI, C. **Sjögren's International Collaborative Clinical Alliance Next Generation Studies (SICCA-NextGen)**. 2020. Disponível em: <https://globalprojects.ucsf.edu/project/sj%C3%B6gren%E2%80%99s-international-collaborative-clinical-alliance-next-generation-studies-sicca>. Acesso em: 11 fev. 2023.

SHILLITOE, E. J. *et al.* Antibody to cytomegalovirus in patients with sjögren's syndrome. As determined by an enzyme-linked immunosorbent assay. **Arthritis Rheum**, v. 25, n. 3, p. 260-265, 1982.

SJÖGREN, H. Zur Kenntnis der Keratoconjunctivitis sicca. **Acta Ophthalmol**, v. 11/12, Suppl. 2, p. 1-151, 1933.

STAIKOU, E. V. *et al.* Calreticulin binds preferentially with B cell linear epitopes of Ro60 kD autoantigen, enhancing recognition by anti-Ro60 kD autoantibodies. **Clin Exp Immunol**, v. 134, n. 1, p. 143-150, 2003.

SUN, D.; EMMERT-BUCK, M. R.; FOX, P. C. Differential cytokine mRNA expression in human labial minor salivary glands in primary Sjögren's syndrome. **Autoimmunity**, v. 28, n. 3, p. 125-137, 1998.

SUNG, H. H. *et al.* MUC1/SEC and MUC1/Y overexpression is associated with inflammation in Sjögren's syndrome. **Oral Dis**, v. 21, n. 6, p. 730-738, 2015.

TAKAHATA, M. *et al.* Ro52 functionally interacts with IgG1 and regulates its quality control via the ERAD system. **Mol Immunol**, v. 45, n. 7, p. 2045-2054, 2008.

THEANDER, E. *et al.* Lymphoid organisation in labial salivary gland biopsies is a possible predictor for the development of malignant lymphoma in primary Sjogren's syndrome. **Ann Rheum Dis**, v. 70, n. 8, p. 1363-1368, 2011.

TRANTAFYLLOPOULOU, A.; TAPINOS, N.; MOUTSOPOULOS, H. M. Evidence for coxsackievirus infection in primary Sjögren's syndrome. **Arthritis Rheum**, v. 50, n. 9, p. 2897-2902, 2004.

TZIOUFAS, A. G.; KAPSOGEORGOU, E. K.; MOUTSOPOULOS, H. M. Pathogenesis of Sjögren's syndrome: what we know and what we should learn. **J Autoimmun**, v. 39, n. 1-2, p. 4-8, 2012.

VAN BIJSTERVELD, O. P. Diagnostic tests in the Sicca syndrome. **Arch Ophthalmol**, v. 82, n. 1, p. 10-14, 1969.

VITALI, C. *et al.* Classification criteria for Sjögren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. **Ann Rheum Dis**, v. 61, n. 6, p. 554-558, 2002.

WIKIPEDIA. **Chaperona**. 28/12/2021 2023. Disponível em: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Chaperona>. Acesso em: 26 fev. 2023.

WANG, J. *et al.* Deficiency of IRE1 and PERK signal pathways in systemic lupus erythematosus. **Am J Med Sci**, v. 348, n. 6, p. 465-473, 2014.

WEBER, C. K. *et al.* Antibodies to the endoplasmic reticulum-resident chaperones calnexin, BiP and Grp94 in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. **Rheumatology (Oxford)**, v. 49, n. 12, p. 2255-2263, 2010.

WILLIAMS, P. H. *et al.* Horizons in Sjögren's Syndrome Genetics. **Clin Rev Allergy Immunol**, v. 32, n. 3, p. 201-209, 2007.

ZHANG, L.; WANG, A. Virus-induced ER stress and the unfolded protein response. **Front Plant Sci**, v. 3, p. 293, 2012.

8. Anexo

COMPROVANTE DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



Ribeirão Preto, 26 de julho de 2017

Ofício nº 2209/2017
CEP/MGV

Prezados Senhores,

O trabalho intitulado **“ESTRESSE DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO EM SIALOADENITES AUTO-IMUNES” – versão 2, de 18/07/2017** foi analisado “AD REFERENDUM” pelo Comitê de Ética em Pesquisa, e enquadrado na categoria: **APROVADO**, bem como o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – versão 3, de 18/07/2017**, de acordo com o Processo HCRP nº 3424/2017.

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 466/12 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DR^a. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores

PROF.DR.LUIZ CARLOS CONTI DE FREITAS
JACQUELINE XAVIER DE SÃO JOSE(Aluna)

Depto. de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço

9. Apêndices

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO GRUPO DE ESTUDO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: “Estresse do Reticulo Endoplasmático em Sialoadenites Autoimunes”.

Pesquisador Responsável: Dr. Luiz Carlos Conti de Freitas
Aluna de Graduação: Jacqueline Xavier de São José

(Contato: Av. Bandeirantes 3900. Ambulatório Utilidade 08 – Ambulatório de Cirurgia de Cabeça e Pescoço – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- USP - 2 andar. Ribeirão Preto – SP Fone: 16 36022353/36022801)

A síndrome de Sjogren é uma doença autoimune sistêmica que atinge principalmente as glândulas lacrimais (dos olhos) e as glândulas salivares, responsáveis para produção de saliva, reduzindo o tamanho e a eficiência da mesma. Convidamos você a participar de nossa pesquisa sobre a ativação do estresse do retículo endoplasmático, presente nas glândulas salivares com a síndrome de sjogren. O estudo será realizado durante a cirurgia e com análises laboratoriais posteriores.

Para o estudo, será necessário a coleta de uma amostra da biópsia que será realizada no ambulatório de Glândulas Salivares da Divisão de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. Neste estudo, as coletas serão realizadas sem prejuízos as glândulas, em sua perda de função. Ao iniciar a cirurgia, com você já anestesiado será retirado o material que será encaminhado para a biopsia, juntamente com ele será retirado uma amostra de aproximadamente 7 centímetros que será encaminhada para a utilização na pesquisa, para as investigações laboratórios. O objetivo é avaliar os stress causado pela doença e onde este processo se inicia. A biopsia realizada no estudo é a mesma que é utilizada habitualmente, não havendo diferença de técnica cirúrgica ou de evolução do pós-operatório.

Você não é obrigado a participar da pesquisa e pode desistir de participar a qualquer momento, sem prejuízo em relação ao tratamento recebido neste hospital.

Você não terá nenhum gasto com essa pesquisa, e a sua participação não oferece riscos à sua saúde, o material retirado para a pesquisa não acarretara em perda de função da glândula salivar. Além disso, será garantido o sigilo de seus dados pessoais utilizados. Se você aceitar participar, todas as dúvidas sobre a pesquisa serão respondidas. Caso você queira desistir durante a pesquisa, não haverá nenhum problema e o tratamento que você estava fazendo antes continuará da mesma forma. Quanto aos resultados obtidos neste estudo, meu telefone está escrito nesta folha, e você poderá me ligar a qualquer hora para tirar suas dúvidas.

No futuro, este estudo poderá ajudar no tratamento de pessoas que tem a mesma síndrome, com a possibilidade de frear o processo de stress que é o desencadeador da perda de função da glândula. Diminuindo assim os incômodos da causados pela doença.

Assim, _____ eu,

abaixo assinado, tendo sido esclarecido sobre todas as condições descritas acima, de que trata o Projeto de Pesquisa intitulado “Estresse do Reticulo Endoplasmático em Sialoadenites Auto-imune”, que tem como pesquisador responsável o Dr. Luiz Carlos Conti de Freitas (fone: 16 3602 2801) declaro que tenho pleno conhecimento dos direitos e das condições que me foram assegurados, a seguir relacionados:

- A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida durante a realização do estudo;
- A liberdade de retirar o meu consentimento e deixar de participar do estudo a qualquer momento;
- A segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada à minha privacidade;
- O compromisso de que me será prestada informação atualizada durante o estudo, mesmo que essa possa afetar a minha vontade de continuar dele participando;
- O compromisso de que serei devidamente acompanhado durante todo o período de minha participação no projeto e após a conclusão dos trabalhos da pesquisa.

Declaro, ainda, que concordo inteiramente com as condições que me foram apresentadas e que, livremente, manifesto a minha vontade em participar do referido projeto.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de _____

Nome e Assinatura do paciente

Nome e Assinatura do pesquisador

APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO GRUPO CONTROLE

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: “Estresse do Reticulo Endoplasmático em Sialoadenites Autoimunes”.

Pesquisador Responsável: Dr. Luiz Carlos Conti de Freitas
Aluna de Graduação: Jacqueline Xavier de São José

(Contato: Av. Bandeirantes 3900. Ambulatório Utilidade 08 – Ambulatório de Cirurgia de Cabeça e Pescoço – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- USP - 2 andar. Ribeirão Preto – SP Fone: 16 36022353/36022801)

A síndrome de Sjogren é uma doença autoimune sistêmica que atinge principalmente as glândulas lacrimais (dos olhos) e as glândulas salivares, responsáveis para produção de saliva, reduzindo o tamanho e a eficiência da mesma. Convidamos você a participar de nossa pesquisa sobre a ativação do estresse do retículo endoplasmático, presente nas glândulas salivares com a síndrome de sjogren. O estudo será realizado durante a cirurgia e com análises laboratoriais posteriores.

Para o estudo, será necessário a coleta de uma amostra da biópsia que será realizada no ambulatório de Glândulas Salivares da Divisão de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. Neste estudo, as coletas serão realizadas sem prejuízos as glândulas, em sua perda de função. Ao iniciar a cirurgia, com você já anestesiado será retirado o material que será encaminhado para a biopsia, juntamente com ele será retirado uma amostra de aproximadamente 7 centímetros que será encaminhada para a utilização na pesquisa, para as investigações laboratórios. O objetivo é avaliar os stress causado pela doença e onde este processo se inicia. A biopsia realizada no estudo é a mesma que é utilizada habitualmente, não havendo diferença de técnica cirúrgica ou de evolução do pós-operatório.

Você não é obrigado a participar da pesquisa e pode desistir de participar a qualquer momento, sem prejuízo em relação ao tratamento recebido neste hospital.

Você não terá nenhum gasto com essa pesquisa, e a sua participação não oferece riscos à sua saúde, o material retirado para a pesquisa não acarretará em perda de função da glândula salivar. Além disso, será garantido o sigilo de seus dados pessoais utilizados. Se você aceitar participar, todas as dúvidas sobre a pesquisa serão respondidas. Caso você queira desistir durante a pesquisa, não haverá nenhum problema e o tratamento que você estava fazendo antes continuará da mesma forma. Quanto aos resultados obtidos neste estudo, meu telefone está escrito nesta folha, e você poderá me ligar a qualquer hora para tirar suas dúvidas.

peçoais utilizados, assistência integral, gratuita, pelo tempo que for necessário e direito de solicitação de uma indenização por danos decorrentes da pesquisa. Todas as providências e cautelas serão tomadas para assegurar seu sigilo e privacidade. Você não terá nenhum gasto com essa pesquisa, pois todas as despesas tidas com a pesquisa serão de responsabilidade do pesquisador responsável e equipe de pesquisa, isto é, o participante da pesquisa, os planos de saúde, o SUS não arcarão com qualquer custo referente a procedimentos e/ou exames do estudo. Você não é obrigado a participar da pesquisa. Se você aceitar participar, todas as dúvidas sobre a pesquisa serão respondidas. Caso você queira desistir durante a pesquisa, não haverá nenhum problema e o tratamento que você estava fazendo antes continuará da mesma forma. Quanto aos resultados obtidos neste estudo, meu telefone está escrito nesta folha, e você poderá me ligar a qualquer hora para tirar suas dúvidas. Asseguramos também que haverá acompanhamento e encaminhamento clínico para os participantes da pesquisa nos quais forem evidenciados quaisquer problemas de saúde não identificados previamente

No futuro, este estudo poderá ajudar no tratamento de pessoas que tem a mesma síndrome, com a possibilidade de frear o processo de estresse que é o desencadeador da perda de função da glândula, diminuindo assim os incômodos causados pela doença.

Um Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) é composto por um grupo de pessoas que são responsáveis por supervisionarem pesquisas em seres humanos que são realizadas na instituição e tem a função de proteger e garantir os direitos, a segurança e o bem-estar de todos os participantes de pesquisa que se voluntariam a participar da mesma.

O CEP do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto é localizado no subsolo do hospital e funciona de segunda a sexta-feira, das 8:00 às 17:00hs, telefone de contato (016) 3602-2228.

Assim, eu, _____, abaixo assinado, tendo sido esclarecido sobre todas as condições descritas acima, de que trata o Projeto de Pesquisa intitulado "Estresse do Reticulo Endoplasmático em Sialoadenites Auto-imune", que tem como pesquisador responsável o Prof. Dr. Luiz Carlos Conti de Freitas (fone: 16 3602 2801/ 3602-1000-BIP 7191 -24h) declaro que tenho pleno conhecimento dos direitos e das condições que me foram assegurados, a seguir relacionados:

- A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida durante a realização do estudo;
- A liberdade de retirar o meu consentimento e deixar de participar do estudo a qualquer momento;
- A segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada à minha privacidade;
- O compromisso de que me será prestada informação atualizada durante o estudo, mesmo que essa possa afetar a minha vontade de continuar dele participando;

Rubrica do pesquisador	Rubrica do participante/responsável
------------------------	-------------------------------------

- O compromisso de que serei devidamente acompanhado durante todo o período de minha participação no projeto e após a conclusão dos trabalhos da pesquisa.
- A garantia de indenização conforme as leis vigentes no país caso ocorra algum dano decorrente da participação na pesquisa

Solicitamos seus dados de contato e sua assinatura, tendo recebido as informações acima, para confirmação de aceitação de participação. Também afirmamos que uma via deste documento, devidamente assinada e rubricada, será entregue ao senhor (a).

Declaro, ainda, que concordo inteiramente com as condições que me foram apresentadas e que, livremente, manifesto a minha vontade em participar do referido projeto.

Dados do participante:

Nome: _____, RG: _____,
Endereço: _____, n° _____, Bairro
_____, cidade _____, telefone _____

Abaixo também seguem os dados de contato do pesquisador responsável, caso o(a) senhor(a) tenha alguma dúvida posteriormente.

Nome do participante: _____

Assinatura: _____ **data:** _____

Nome do pesquisador: _____

Assinatura: _____ **data:** _____

Dados do responsável legal ou testemunha (caso aplicável):

Nome legível: _____

Assinatura: _____ data: _____

Rubrica do pesquisador	Rubrica do participante/responsável
------------------------	-------------------------------------

APÊNDICE C – RESULTADOS DA EXPRESSÃO DOS GENES ESTUDADOS POR PACIENTE

Média da expressão dos CTs dos genes do estresse do retículo endoplasmático em cada paciente do grupo SS1 e média \pm desvio padrão.

SS1	PERK (EIF2 α K3)	ATF4	ATF6	CHOP	CALR	CANX	XBP1	BIP (GRP78)
1	34,925	33,32	33,27	33,235	32,89	31,235	34,705	33,6
2	33,195	30,925	31,34	29,085	31,075	29,085	31,19	30,765
3	35,14	33,245	32,545	30,31	31,905	30,31	31,26	32,34
4	31,225	28,645	30,295	28,21	30,14	28,345	30,71	30,265
5	31,065	29,46	28,79	28,24	28,3	28,24	28,335	29,5
6	32,39	30,19	31,96	31,06	31,52	31,01	29,7	29,34
7	34,76	33,29	34,45	32,37	32,77	31,89	31,39	32,23
8	32,09	29,35	30,81	29,06	29,22	29,15	27,85	28,23
9	34,34	32,99	33,94	33,3	33,47	31,95	30,92	32,23
10	31,48	29,21	30,43	30,15	30,43	29,6	27,12	28,25
11	32,57	30,75	32,03	31,44	30,38	30,27	28,45	29,75
12	-	-	34,05	32,66	34,03	39,24	-	-
13	38,06	34,03	34,65	30,82	32,96	34,71	-	-
14	-	-	32,795	33,325	-	-	37,89	-
15	37,38	34,93	33,7	33,685	34,29	35,36	35,27	-
16	35,885	-	34,72	30,935	33,05	33,165	32,72	-
Média \pm DP	33,89 \pm 2,24	31,56 \pm 2,2	32,48 \pm 1,78	31,11 \pm 1,85	31,76 \pm 1,79	31,57 \pm 3,01	31,25 \pm 3,06	30,59 \pm 1,79

Média da expressão dos CTs dos genes do estresse do retículo endoplasmático em cada paciente do grupo SS2 e média \pm desvio padrão.

SS2	PERK (EIF2 α K3)	ATF4	ATF6	CHOP	CALR	CANX	XBP1	BIP (GRP78)
1	30,32	29,035	30,125	28,205	29,45	28,205	30,13	30,06
2	35,14	32,785	32,8	31,465	33,915	31,465	32,795	33,505
3	34,89	30,21	33,59	33,58	31,38	32,04	29,12	30,39
4	35,89	34,81	36,4	36	36,14	37,61	34,05	35,36
5	34,19	33,04	34,24	33,46	31,75	32,79	30,9	32,01
6	33,63	31,63	32,54	32,84	31,01	31,92	30,04	30,77
7	35,48	33,28	35,13	33,51	32,45	33,28	31,71	32,28
8	36,51	35,31	36,56	36,57	35,81	34,93	33,29	34,8
9	33,51	31,89	32,78	33,33	32,14	32,71	30,13	30,59
10	37,77	-	34	33,005	-	35,11	34,13	-
11	-	-	33,84	33,4	33,815	36,96	33,46	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-
13	39,4	35,51	35,14	35,23	36,79	35,35	32,15	34,98
14	-	35,3	-	33,24	34,035	-	38,11	-
Média \pm DP	35,15 \pm 2,38	32,98 \pm 2,16	32,98 \pm 2,16	33,37 \pm 2,07	33,22 \pm 2,25	33,53 \pm 2,61	32,30 \pm 2,41	32,47 \pm 2,05

Média da expressão dos CTs dos genes do estresse do retículo endoplasmático em cada paciente do grupo Sicca e média \pm desvio padrão.

Sicca	PERK (EIF2 α K3)	ATF4	ATF6	CHOP	CALR	CANX	XBP1	BIP (GRP78)
1	30,32	27,595	30,215	28,31	28,795	28,31	28,26	29,205
2	32,16	30,855	30,44	30,165	30,785	30,165	29,915	31,84
3	33,69	29,96	31,31	30,635	31,855	30,635	29,405	31,325
4	34,38	34,46	33,88	32,305	34,815	32,305	34,6	36,18
5	35,03	35,14	33,2	30,755	35,035	30,755	34,63	35,88
6	32,405	30,655	31,72	29,07	30,58	29,07	30,62	31,4
7	33,43	32,12	32,45	33,78	31,11	30,03	29,05	31,45
8	37,99	32,8	34,82	33,97	35,19	36,62	31,73	33,29
9	35,63	35,61	34,89	35,15	35,47	39,78	32,18	34,36
10	35,13	30,29	30,86	32,42	32,55	34,41	28,97	30,4
11	37,57	31,78	31,47	33,36	34,74	34,19	30,06	32,09
12	39,06	33,875	34,72	32,115	-	-	33,71	-
13	-	-	33,375	32,385	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	35,1	31,61	-	-	39,32	-
16	37,33	33,21	33,425	32,72	34,44	-	34,49	-
17	38,36	-	33,76	31,91	-	39,43	34,335	-
Média \pm DP	35,17 \pm 2,63	32,18 \pm 2,30	32,85 \pm 1,66	31,91 \pm 1,80	32,94 \pm 2,27	32,97 \pm 3,92	32,08 \pm 3,05	32,49 \pm 2,20

Média da expressão dos CTs dos genes do estresse do retículo endoplasmático em cada paciente do grupo controle e média \pm desvio padrão.

Controle	PERK (EIF2 α K3)	ATF4	ATF6	CHOP	CALR	CANX	XBP1	BIP (GRP78)
1	-	-	33,08	32,815	-	39,57	-	-
2	-	-	32,36	32,465	34,21	-	-	-
3	39,09	34,3	32,43	33,18	-	-	-	-
4	38,12	-	33,515	32,245	33,76	35,17	-	-
5	-	-	32,11	33,27	-	-	39,21	-
6	38,955	32,97	33,72	32,87	-	35,13	33,85	-
7	-	-	34,055	32,805	-	-	-	-
8	-	-	34,455	32,7	33,64	-	39,1	-
9	38,88	-	33,57	33,245	-	-	36,93	-
10	36,705	33,54	33,67	32,7	34	34,42	36,47	-
11	38,525	34,76	33,92	32,41	-	-	36,3	-
12	35,18	34,5	34,115	30,145	34,16	32,47	32,7	-
13	39,05	36	33,765	32,125	-	-	34,16	-
Média \pm DP	38,06 \pm 1,40	34,34 \pm 1,04	33,44 \pm 0,73	32,53 \pm 0,80	33,95 \pm 0,24	35,35 \pm 2,60	36,09 \pm 2,38	-