

**VICTOR ADRIANO DE OLIVEIRA MARTINS**

**Síndrome de Sjögren primária: impacto do tratamento odontológico de atenção primária e estudo dos anticorpos anti-DNase I**

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

Programa de Pós-Graduação em Ciências do Sistema Musculoesquelético.

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Gofinet Pasoto

**São Paulo  
2022**

**VICTOR ADRIANO DE OLIVEIRA MARTINS**

**Síndrome de Sjögren primária: impacto do tratamento odontológico de atenção primária e estudo dos anticorpos anti-DNase I**

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

Programa de Pós-Graduação em Ciências do Sistema Musculoesquelético.

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Gofinet Pasoto

**São Paulo  
2022**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Martins, Victor Adriano de Oliveira  
Síndrome de Sjogren primária : impacto do  
tratamento odontológico de atenção primária e estudo  
dos anticorpos anti-DNase I / Victor Adriano de  
Oliveira Martins. -- São Paulo, 2022.  
Tese (doutorado)--Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.  
Programa de Ciências do Sistema  
Musculoesquelético.  
Orientadora: Sandra Gofinet Pasoto.

Descritores: 1.Síndrome de Sjogren 2.Xerostomia  
3.Cárie dentária 4.Assistência odontológica 5.Saliva  
6.Desoxirribonuclease I

USP/FM/DBD-139/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedico esta tese para minha família. A minha mãe, Thais; ao meu padrasto, João; meu pai, Adriano e minha madrasta, Karina. Aos meus irmãos: Adriany, Beatriz, Fernanda e João Guilherme.

O amor de vocês que me permitiu chegar até aqui.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por ter sempre me guiado no caminho que era de sua vontade e ter me apresentado às pessoas que permitiram que eu não caminhasse sozinho nesta jornada.

Destaco primeiramente, a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sandra Gofinet Pasoto, que me orientou em todos esses anos de doutorado, sempre se fazendo presente em cada etapa da elaboração deste trabalho, com muita disposição em me ensinar, esmero em suas correções e por toda dedicação a mim e à elaboração da tese. Obrigado Dr<sup>a</sup> Sandra por tudo, por tanto e por neste tempo ter me mostrado como vencer cada etapa do doutorado. Sem você, não seria possível.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Eloisa Bonfá, por ter me permitido integrar seu projeto temático e me introduzir no mundo da Reumatologia. Obrigado por todas as oportunidades que tive neste período de doutorado para, inclusive, além da elaboração da tese de doutorado.

Aos Prof. Dr. Clóvis, Dr<sup>a</sup> Nádia e a todos assistentes e doutores da disciplina de Reumatologia. Obrigado por contribuírem com meu ensino e vivência clínica durante este período. Sobretudo, muito obrigado pelo acolhimento em cada ambulatório. Especialmente, obrigado Dr<sup>a</sup> Lissiane Guedes, por confiar em mim junto à Dr<sup>a</sup> Sandra para os diagnósticos e assistência às pacientes com síndrome de Sjögren.

À Dr<sup>a</sup> Maria Paula Peres, por me acompanhar desde a época de residência e tornar a Divisão de Odontologia do Instituto Central do Hospital das Clínicas (ICHC) local de formação e transformação para mim. Obrigado por me ceder espaço e viabilizar a minha tese. Estendo este agradecimento ao Dr. Reynaldo Antequera, por ceder ambiente clínico para realização da tese junto à Divisão de Odontologia do Instituto de Psiquiatria (IPQ). Sem vocês, não seria possível. Agradeço a todos assistentes da Odontologia do HC, especialmente à Dr<sup>a</sup> Rita Napole, Dr<sup>a</sup> Bruna Varotto e Dr<sup>a</sup> Carol Andrade, com quem cultivei amizade durante a elaboração desta tese no IPQ.

Ao Prof. Dr. Paulo Braz, obrigado por ter feito meu primeiro contato com a ciência e por caminhar comigo ainda hoje, na vida acadêmica e pessoal. Sua orientação e amizade significam muito para mim. Também agradeço aos professores da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (USP), especialmente

os da Disciplina de Patologia Bucal, que são meus amigos e exemplos: Profª Drª Marília Martins, Profª Karem Ortega e Profª Marina Magalhães.

Agradeço aos amigos e colegas doutorandos que fiz nesta jornada, especialmente à Lorena Villamarín, obrigado por desprender do seu curto tempo no Brasil comigo, seja na amizade, seja na elaboração deste trabalho, nunca vou me esquecer de você. À Juliana Gennari, por todo carinho e alegria que traz consigo em cada manhã de sexta-feira, no Ambulatório de Síndrome de Sjögren, e por ter me permitido integrar seu projeto de doutorado. Também agradeço os pós doutorandos Tatiana Pedrosa e Leonard Kanda, por serem exemplos de persistência e por me ajudarem sempre com muito carinho quando precisei.

Aos alunos de iniciação científica, Carolina Ribeiro, por demonstrar interesse em aprender qualquer conteúdo apresentado e se dedicar a ajudar de forma incondicional. À Gioanna Zou, por toda amizade e parceria no envolvimento que tive durante os outros estudos do temático. À Tamires Floriano, a quem pude ter como 'aluna de iniciação científica' mesmo no início desta jornada, aprendi muito com você além de ter sempre a certeza do seu ombro ao meu lado. Ao Giordano Devesa, amigo que a vida me trouxe e que hoje caminha ao meu lado no mundo acadêmico, obrigado por ser presente na minha vida em mais de um âmbito, fazer ciência se torna mais fácil com você por perto.

A todos residentes de Odontologia que se dispuseram em me ajudar no atendimento clínico das pacientes, obrigado. Especialmente à Letycia Mary, Laura Cavalcanti, Lays Assolini, Luiza Montano, Camila Panisello, Marcus Bueno, Mariana Bessler e Raphaella Pinto, que além de toda ajuda sempre em prontidão se tornaram colegas e amigos que levo hoje comigo.

Às biólogas do Laboratório de Investigação Médica – 17 (LIM-17), Elaine, Margarete, Elislaine e Virgínia, e a aluna de treinamento técnico Nicole Fontoura. Obrigado por me ensinarem a pesquisa e como ela se desenvolve nas bancadas do laboratório. Sobretudo nos anos de pandemia, obrigado por todo treinamento que me deram. Cada oportunidade vivida hoje é uma memória feliz de acolhimento que tenho de vocês, que hoje também levo no coração. Agradeço também a todos os funcionários do HC e da Faculdade de Medicina da USP.

Gostaria de deixar um agradecimento também às secretárias: Cláudia Reis, Mayra de Carvalho e Tânia Borges, por toda ajuda demonstrada ao longo de processo de vivência do doutorado à elaboração e depósito desta tese.

Agradeço à minha família, por ser fonte inesgotável de amor, apoio e carinho, que foram essenciais para que eu chegasse até aqui. Vocês são tudo para mim.

Aos meus amigos, obrigado por se fazerem presentes mesmo quando eu estive ausente em detrimento da dedicação à tese. Agradeço a todos vocês pela amizade e por viverem comigo essa jornada, sempre torcendo e vibrando pelas minhas conquistas.

Por fim, a todas as pacientes com síndrome de Sjögren e controles, obrigado por permitirem que fizesse ciência com o apoio e disposição de vocês. Espero que todo conhecimento aqui produzido se volte para a assistência de vocês, para que sempre o melhor seja empregado.

### **Agradecimento Especial**

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelo financiamento através do Projeto Temático *"Avaliação da relevância dos níveis sanguíneos de drogas utilizadas em doenças autoimunes reumatológicas no acompanhamento da segurança, eficácia e aderência à terapêutica"* (2015/03756-4), responsável Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Eloisa Silva Dutra de Oliveira Bonfá, e pela bolsa de Doutorado Direto concedida para o projeto *"Análise do perfil immune da saliva e soro dos pacientes com Síndrome de Sjögren Primária"* (2018/09937-9), beneficiário Victor Adriano de Oliveira Martins e responsável Dr<sup>a</sup> Sandra Gofinet Pasoto.

Esta tese de doutorado está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)*.

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentações; 2011.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

## RESUMO

Martins VAO. *Síndrome de Sjögren primária: impacto do tratamento odontológico de atenção primária e estudo dos anticorpos anti-DNase I* [tese de doutorado]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

**Introdução:** A síndrome de Sjögren primária (SSp) é uma doença sistêmica inflamatória crônica que acomete principalmente as glândulas lacrimais e salivares. A SSp tem fisiopatologia autoimune e cursa com a produção de autoanticorpos, particularmente anti-Ro/SS-A e anti-La/SS-B. Recentemente, nosso grupo descreveu uma alta frequência de anti-DNase I no soro dos pacientes com SSp. Esse achado se torna interessante considerando a recente descrição de redução da atividade da DNase I na lágrima de pacientes com xerofthalmia de diversas causas, o que teria como consequência um acúmulo de DNA extracelular, o que poderia contribuir para o processo inflamatório na superfície ocular. É possível que tais achados também ocorram na cavidade oral. Além disso, os focos infecciosos orais podem agravar a disfunção das glândulas salivares em modelo experimental. Entretanto, existem poucos estudos avaliando o impacto do tratamento odontológico de atenção primária (TOP) na SSp. **Objetivos:** Avaliar a presença dos anticorpos anti-DNase I e atividade dessa enzima na saliva e no soro dos pacientes com SSp e o impacto do TOP sobre o grau da xerostomia, taxas de fluxo salivar e perfil de citocinas salivares. **Métodos:** Foram incluídos em um estudo prospectivo 52 pacientes com SSp [critérios de classificação do *American-European Consensus Group* (2002) e/ou do ACR (*American College of Rheumatology*) / EULAR (*European League Against Rheumatism*) (2016)] e 52 indivíduos controle sem doenças autoimunes sistêmicas, pareados para sexo, idade e raça e comparáveis aos pacientes quanto à classe socioeconômica. À entrada no estudo (D0), todos os participantes foram avaliados através de um protocolo clínico padronizado, que incluiu o Inventário de Xerostomia (IX). Os pacientes com SSp também foram avaliados através do *EULAR Sjögren's Syndrome Reported Index* (ESSPRI) e do *EULAR Sjögren's Syndrome Disease Activity Index* (ESSDAI). Foi calculado o Índice de Cariados, Perdidos e Obturados para Dentição Permanente (Índice CPO-D), feita a avaliação de periodontite (*American Academy of Periodontology*, 2000) e demais focos inflamatórios orais para todos os participantes; além de mensuradas as taxas

dos fluxos salivares não-estimulado e estimulado. À inclusão no estudo, também foram coletadas amostras de soro, plasma e saliva dos pacientes com SSp e controles para detecção do anti-DNase I IgG, determinação das concentrações séricas e salivares de DNase I e sua atividade. Foram ainda medidos os níveis salivares do fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina (IL)-1 $\beta$ , IL-6, resistina, *B-cell activating factor* (BAFF) e metaloproteinase-9 (MMP-9). Após essas coletas, foi então realizado o TOP no D0 e repetidas as avaliações clínicas e laboratoriais após três meses do TOP (D90). **Resultados:** Todos os 52 pacientes com SSp e 49 controles completaram as avaliações clínicas e odontológicas no D0 e no D90. Os grupos de pacientes e controles foram similares quanto às características demográficas: idade ( $P = 0,800$ ), sexo ( $P = 1,000$ ), raça ( $P = 1,000$ ) e nível socioeconômico ( $P = 0,821$ ). Em contraste, o índice CPO-D foi maior nos pacientes com SSp do que nos controles:  $13,3 \pm 8,2$  vs.  $8,6 \pm 6,2$  ( $P = 0,002$ ), respectivamente. As lesões cervicais não-cariosas foram também mais frequentes nos pacientes com SSp comparativamente aos controles ( $P = 0,008$ ). Em contraste, os parâmetros periodontais e a frequência de periodontite foram comparáveis nos dois grupos ( $P > 0,05$ ). A pesquisa do anti-DNase I sérico mostrou que essa reatividade é mais frequente nos pacientes com SSp (63,5%) do que nos indivíduos controle (11,5%) ( $P < 0,001$ ). Além disso, demonstramos a presença do anti-DNase I e a diminuição da atividade dessa enzima na saliva dos pacientes com SSp. A avaliação dos pacientes com SSp no D0 e três meses após o TOP (D90) mostrou melhora significativa da taxa de fluxo salivar não-estimulado ( $P < 0,001$ ) e estimulado ( $P = 0,001$ ). Não houve melhora nos valores do IX ( $P = 0,285$ ), mas 26,9% dos pacientes com SSp apresentaram melhora clinicamente significativa (redução de pelo menos seis pontos no IX). Os valores do ESSPRI e do ESSDAI permaneceram inalterados no D0 e D90 ( $P > 0,05$ ), bem como as concentrações salivares de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, resistina, BAFF e MMP-9 ( $P \geq 0,05$ ). **Conclusões:** O Índice CPO-D foi maior nos pacientes com SSp do que nos controles sem doenças autoimunes sistêmicas, confirmando a relevância das lesões cariosas nessa doença. Demonstramos a presença do anticorpo anti-DNase I no soro e na saliva dos pacientes com SSp, bem como a diminuição da atividade dessa enzima na saliva, o que, em hipótese, pode contribuir para a fisiopatologia do dano das glândulas salivares. O TOP promoveu melhora significativa das taxas de fluxo salivar não-estimulado e estimulado dos pacientes com SSp. Esse achado, embora sem melhora do IX, tem o potencial de contribuir

para a redução das complicações orais da SSp e reforça a sua recomendação para esses pacientes. **Descritores:** Síndrome de Sjogren; Xerostomia; Cárie dentária; Assistência odontológica; Saliva; Desoxirribonuclease I.

## **ABSTRACT**

Martins VAO. *Primary Sjögren's syndrome: impact of primary care dental treatment and study of anti-DNase I antibodies* [PhD thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2022.

**Introduction:** Primary Sjögren's syndrome (pSS) is a chronic inflammatory systemic disease that mainly affects the lacrimal and salivary glands. pSS has an autoimmune pathophysiology and is associated with the production of autoantibodies, particularly anti-Ro/SS-A and anti-La/SS-B. Recently, our group described a high frequency of anti-DNase I in serum of pSS patients. This finding is interesting considering the recent description of a reduced DNase I activity in tears of patients with xerophthalmia of various causes, which would result in an accumulation of extracellular DNA, which could contribute to the inflammatory process on the ocular surface. It is possible that such findings also occur in the oral cavity. In addition, oral infectious foci can aggravate the salivary gland dysfunction in an experimental model. However, there are few studies evaluating the impact of primary care dental treatment (PDC) on pSS. **Objectives:** To evaluate the presence of anti-DNase I antibodies and the activity of this enzyme in saliva and serum of pSS patients, and the impact of PDC on the degree of xerostomia, salivary flow rates and salivary cytokine profile. **Methods:** Fifty-two pSS patients [American-European Consensus Group (2002) and/or ACR (American College of Rheumatology)/EULAR (European League Against Rheumatism) (2016) classification criteria] and 52 control individuals without systemic autoimmune diseases, matched for sex, age and race and with comparable socioeconomic class to pSS patients were included in a prospective study. At entry (D0), all participants were evaluated using a standardized clinical protocol, which included the Xerostomia Inventory (XI). pSS patients were also evaluated using the EULAR Sjögren's Syndrome Reported Index (ESSPRI) and the EULAR Sjögren's Syndrome Disease Activity Index (ESSDAI). The Decayed, Missing and Filled Teeth (DMFT) index was calculated, periodontitis (American Academy of Periodontology, 2000) and other oral inflammatory foci were evaluated for all participants; in addition, unstimulated and stimulated salivary flows rates were measured. At inclusion, serum, plasma and saliva samples were also collected from pSS patients and controls for detection of anti-DNase I IgG, determination of serum

and salivary concentrations of DNase I and its activity. Salivary levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, resistin, B-cell activating factor (BAFF) and metalloproteinase-9 (MMP-9) were also measured. After these collections, PDC treatment was performed on D0, and the clinical and laboratorial assessments were repeated three months after PDC (D90). **Results:** All 52 pSS patients and 49 controls completed clinical and dental evaluations on D0 and D90. The pSS and control groups were similar in demographic characteristics: age ( $P = 0.800$ ), sex ( $P = 1.000$ ), race ( $P = 1.000$ ), and socioeconomic status ( $P = 0.821$ ). In contrast, DMFT index was higher in pSS patients than in controls:  $13.3 \pm 8.2$  vs.  $8.6 \pm 6.2$  ( $P = 0.002$ ), respectively. Non-carious cervical lesions were also more frequent in pSS patients compared to controls ( $P = 0.008$ ). In contrast, periodontal parameters and periodontitis frequency were comparable in both groups ( $P > 0.05$ ). Serum anti-DNase I was more frequent in pSS patients (63.5%) than in control individuals (11.5%) ( $P < 0.001$ ). Furthermore, we demonstrated the presence of anti-DNase I and a reduced activity of this enzyme in saliva of pSS patients. Assessment of pSS patients on D0 and three months after PDC treatment (D90) showed significant improvement in unstimulated ( $P < 0.001$ ) and stimulated ( $P = 0.001$ ) salivary flow rates. There was no improvement in XI values ( $P = 0.285$ ), but 26.9% of pSS patients showed clinically significant improvement (reduction of at least 6 points in XI). ESSPRI and ESSDAI values remained unchanged on D0 and D90 ( $P > 0.05$ ), as well as salivary concentrations of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, resistin, BAFF and MMP-9 ( $P \geq 0.05$ ). **Conclusions:** DMFT index was higher in pSS patients than in controls without systemic autoimmune diseases, confirming the relevance of carious lesions in this disease. We demonstrated the presence of anti-DNase I antibody in serum and saliva of pSS patients, as well as a decreased activity of this enzyme in saliva, which, in hypothesis, may contribute to the pathophysiology of salivary gland damage. PDC treatment promoted significant improvement in unstimulated and stimulated salivary flow rates in pSS patients. This finding, although without improvement of XI, has the potential to contribute to the reduction of oral complications in pSS, and reinforces its recommendation for these patients. **Descriptors:** Sjogren's Syndrome; Xerostomia; Dental caries; Dental care; Saliva; Deoxyribonuclease I.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fluxo de pacientes com SSp (A) e indivíduos controle (B).....27
- Figura 2.** Atividade da DNase I utilizando-se calibradores com concentrações conhecidas de DNase I de pâncreas bovino. ....32
- Figura 3.** Imagem de um ensaio de *Western blotting* com DNase I bovina como substrato.....42
- Figura 4.** Imagem ilustrativa de um ensaio de *Western blotting* com DNase I bovina como substrato.....42

## LISTA DE TABELAS

- Tabela I.** Análise comparativa dos pacientes com SSp e indivíduos controle em relação às características demográficos e comorbidades.....36
- Tabela II.** Análise comparativa dos pacientes com SSp e indivíduos controle em relação às taxas de fluxo salivar, Inventário de Xerostomia e aos parâmetros odontológicos no *baseline* (D0) .....37
- Tabela III.** Análise comparativa dos pacientes com SSp e indivíduos controle em relação aos níveis de citocinas no *baseline* (D0) .....38
- Tabela IV.** Análise comparativa dos pacientes com SSp que completaram a avaliação clínica no *baseline* (D0) e 3 meses após o tratamento odontológico de atenção primária (D90).....39
- Tabela V.** Análise comparativa dos indivíduos controle que completaram as avaliações clínicas no *baseline* (D0) e 3 meses após o TOP (D90).....40
- Tabela VI.** Análise comparativa dos pacientes com SSp e indivíduos controle quanto aos níveis séricos de BAFF, DNase 1 e anticorpos anti-DNase 1 no soro e na saliva no *baseline* (D0) .....41

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABEP: Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa
- ACR: *American College of Rheumatology*
- Anti-DNase I: Anticorpos anti-endonuclease desoxirribonuclease I
- AR: artrite reumatoide
- BAFF: *B-cell activating factor*
- BCIP: *5-bromo-4-cloro-3'-indolil phosphate*
- CAPPesq: Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
- CPO-D: Índice de Cariados, Perdidos e Obturados para Dentição Permanente
- D0: Visita inicial no estudo
- D90: Visita após 90 dias no estudo
- DNA: Ácido desoxirribonucleico
- DNase I: endonuclease desoxirribonuclease I
- EBV: vírus Epstein-Barr
- ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
- ES: esclerose sistêmica
- ESSDAI: *EULAR Sjögren's Syndrome Disease Activity Index*
- ESSPRI: *EULAR Sjögren's Syndrome Reported Index*
- EULAR: *European League Against Rheumatism*
- FAPESP: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- FMUSP: FACULDADE DE MEDICINA DA USP
- HCFMUSP: Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo
- HIV: vírus da imunodeficiência humana
- IgG: imunoglobulina G
- IL-1: interleucina 1
- IL-10: interleucina 10
- IL-1 $\beta$ : interleucina 1 $\beta$
- IL-6: interleucina 6
- INF- $\alpha$ : interferon- $\alpha$
- IX: Inventário de Xerostomia
- LCNC: Lesão cervical não-cariosa
- LES: Lúpus eritematoso sistêmico

MMP-9: metaloproteinase-9

NBT: *nitroblue tetrazolium*

PDC: *primary dental care*

SDS: sódio dodecil sulfato

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS

SF-36: ***Short-Form 36***

SS-A: Ro/SS-A

SS-B: La/SS-B

SSp: síndrome de Sjögren primária

TBS: solução salina tamponada

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral- $\alpha$

TOP: tratamento odontológico de atenção primária

USP: Universidade de São Paulo

UV: ultravioleta

XI: *Xerostomia Inventory*

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>20</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>25</b>
<b>3. PACIENTES E MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
3.1. Desenho do estudo, pacientes e controles e critérios de exclusão .....	26
3.2. Tratamento odontológico de atenção primária.....	28
3.3. Avaliação clínica .....	29
3.4. Fluxo Salivar não-estimulado e estimulado e coleta das amostras de saliva .....	30
3.5. Detecção dos anticorpos anti-DNase I.....	30
3.5.1. <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)</i> .....	30
3.5.2. <i>Western blotting</i> .....	31
3.6. Determinação das concentrações séricas e salivares de DNase I .....	32
3.7. Determinação da atividade da DNase I .....	32
3.8. Perfil de citocinas inflamatórias na saliva .....	33
3.9. Análise estatística.....	33
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>35</b>
4.1. Avaliação do estado de saúde oral e resultados do tratamento odontológico de atenção primária .....	35
4.1.1. <i>Características demográficas e clínicas dos pacientes com SSp</i> .....	35
4.1.2. <i>Análise comparativa dos pacientes com SSp vs. participantes controle no baseline (D0)</i> .....	35
4.1.3. <i>Análise comparativa dos pacientes com SSp antes (D0) e após o TOP (D90)</i> .....	38
4.1.4. <i>Análise comparativa dos indivíduos controle antes (D0) e após o TOP (D90)</i> .....	40
4.2. Estudo do anticorpo anti-DNase I e da atividade enzimática.....	41
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>43</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>48</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>49</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>63</b>

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A síndrome de Sjögren primária (SSp) é uma doença inflamatória crônica autoimune que afeta principalmente as glândulas exócrinas, levando à redução dos fluxos lacrimal e salivar e, conseqüentemente, às manifestações clínicas de olho e boca secos (síndrome *sicca*). Múltiplos sistemas também podem ser afetados, causando principalmente poliartralgia/poliartrite, vasculite cutânea, bronquiolite/pneumonite, nefrite tubulointersticial e neuropatia periférica, além do risco de desenvolver linfoma (Mariette & Criswell, 2018). Vários marcadores sorológicos podem associar-se à expressão fenotípica dessa doença, principalmente os anticorpos anti-Ro/SS-A e anti-La/SS-B (Brito-Zerón *et al.*, 2018). A SSp é atualmente considerada a doença reumática autoimune sistêmica mais prevalente após a artrite reumatoide (Vivino *et al.*, 2019), com uma prevalência estimada de 60,82 casos por 100.000 habitantes (Qin *et al.*, 2015). Essa doença afeta predominantemente mulheres (9:1 a 20:1), com pico de incidência entre 40 e 60 anos (García-Carrasco *et al.*, 2002). Contudo, a prevalência da SSp varia conforme os critérios de classificação utilizados e entre diferentes regiões do globo de cerca de 0,03% a 4,5% (Bowman *et al.*, 2004; Sánchez-Guerrero *et al.*, 2005; Patel & Shahane, 2014; Brito-Zerón *et al.*, 2020).

A etiologia da SSp é ainda desconhecida. Evidências sugerem a participação em conjunto de fatores genéticos, hormonais e ambientais levando à ativação crônica do sistema imune. Entre os fatores ambientais, destacam-se os agentes infecciosos, sendo o vírus Epstein-Barr (EBV) o mais comumente implicado (Nair & Singh, 2017). Nesse aspecto, estudos de biologia molecular mostrando a presença do material genético viral nas amostras de tecido das glândulas salivares (Mariette *et al.*, 1991; Perrot *et al.*, 2003), bem como a detecção de anticorpos nos soros desses pacientes dirigidos a antígenos do EBV, como o *EBV early antigen diffuse*, demonstrado por nosso grupo (Pasoto *et al.*, 2013), reforçam a participação desse vírus na patogenia da SSp.

De fato, observa-se nesses pacientes uma resposta imune inadequada, com funções anormais das células dendríticas plasmocitoides, ativação de células T e B e de células epiteliais das glândulas salivares, promovendo a produção de numerosas citocinas e autoanticorpos, tendo como consequência a formação de infiltrado linfocitário nos tecidos alvo, levando à sua disfunção. Nas glândulas

exócrinas, esse infiltrado localiza-se ao redor dos ductos e consiste principalmente de células T e B. Há predomínio de células T CD4 *helper* ativadas, que correspondem a 60 - 70% dos linfócitos infiltrantes e são fundamentais na patogênese da doença, pois são capazes de produzir citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), a interleucina-1 (IL-1) e interleucina-6 (IL-6) (Chiorini *et al.*, 2009; Nair & Singh, 2017). Tais citocinas podem ter um papel crucial no desenvolvimento da SSp e, além de serem produzidas pelos linfócitos infiltrantes, podem também ser produzidas pelas células epiteliais ativadas nas glândulas salivares (Chiorini *et al.*, 2009). Nesse aspecto, foi demonstrada a regulação exacerbada dos genes codificadores do interferon em células do sangue periférico e das glândulas salivares dos pacientes portadores dessa síndrome (Nikolov & Illei, 2009). Por sua vez, o interferon- $\alpha$  (INF- $\alpha$ ) é capaz de estimular a produção de outras citocinas, como o *B-cell activating factor* (BAFF), um ligante da família do TNF que estimula a maturação e a diferenciação dos linfócitos B (Mavragani, 2017). Níveis aumentados de BAFF foram detectados nas glândulas salivares, na saliva (Lavie *et al.*, 2004) e no soro dos pacientes com SSp (Lavie *et al.*, 2008) e, com seu estímulo, ocorre a produção de múltiplos autoanticorpos circulantes (Routsias & Tzioufas, 2007; Fayyaz *et al.*, 2016; Shen & Suresh, 2017; Jonsson *et al.*, 2018).

Vários autoanticorpos não-órgão específicos apresentam relevância clínica, auxiliando no diagnóstico da SSp e com implicações prognósticas. Os anticorpos anti-Ro/ SS-A e anti-La/ SS-B são associados com maior prevalência de manifestações sistêmicas (Brito-Zerón *et al.*, 2018) e maior intensidade do infiltrado linfocítico em glândulas salivares (Harley *et al.*, 1986).

Vários possíveis mecanismos têm sido implicados na produção de múltiplos autoanticorpos nas doenças autoimunes sistêmicas. Em um estudo desenvolvido por Yasutomo e cols., foi demonstrada a mutação em genes envolvidos na expressão e atividade da endonuclease desoxirribonuclease I (DNase I), a qual atua na hidrólise da molécula do DNA em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) (Yasutomo *et al.*, 2001; Shin *et al.*, 2004). Recentemente, foi descrito por Sonawane e cols. (2012) que a redução da atividade da DNase I na lágrima em pacientes com olho seco associou-se ao acúmulo de DNA extracelular e de infiltrado inflamatório neutrofílico na superfície ocular (Sonawane *et al.*, 2012). Posteriormente, o mesmo grupo demonstrou que o uso da DNase I em forma de colírio em pacientes com olho

seco resultou na diminuição da inflamação da superfície ocular, levando a uma melhora dos sintomas e sinais do olho seco, sugerindo um possível papel da inibição da atividade da DNase I na patogenia da SSp (Tibrewal *et al.*, 2013). De fato, foi descrita a diminuição da atividade dessa enzima no sangue periférico dos pacientes com SSp, o que poderia comprometer o *clearance* de debris celulares resultantes do processo de apoptose com persistência de DNA extracelular e consequente estimulação crônica do sistema imunológico (Wallport, 2000; Fragoulis *et al.*, 2015). Mais recentemente, nosso grupo descreveu a presença dos anticorpos dirigidos à DNase I no soro dos pacientes com SSp pelo método de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), o que, possivelmente, poderia ocasionar a diminuição da atividade dessa enzima (Griffo *et al.*, 2020).

A DNase I é uma enzima extracelular com massa molecular de 30 - 38 kDa capaz de hidrolisar preferencialmente moléculas de DNA de fita dupla para liberar oligonucleotídeos. É secretada pelas glândulas exócrinas, como o pâncreas e as glândulas parótidas (Nadano *et al.*, 1993; Napirei *et al.*, 2004), mas também pode ser detectada no soro, na urina, nos rins e fígado (Kishi *et al.*, 1990; Liao, 1997). Assim, esse mesmo mecanismo possivelmente poderia contribuir para outra manifestação clínica frequente da SSp que é a xerostomia. Não se sabe, no entanto, se esses anticorpos estão presentes na saliva desses pacientes e se teriam a capacidade de inibir a atividade da enzima e causar um processo inflamatório crônico com redução do fluxo salivar.

Os sintomas mais frequentes da SSp são a xerostomia (90 - 98%) e a xeroftalmia (93 - 95%) (Rosas *et al.*, 2019). A hipossalivação tem consequências importantes. A saliva contém glicoproteínas, IgA, lipídios e eletrólitos, os quais desempenham um papel crucial na manutenção da saúde bucal, inibindo o crescimento bacteriano, lubrificando e protegendo a mucosa e os dentes, participando dos processos de mastigação, deglutição, gustação e digestão de carboidratos (Loo *et al.*, 2010). Nesse aspecto, os pacientes com SSp apresentam diminuição do fluxo salivar, do pH e da capacidade tamponante da saliva, bem como aumento das concentrações salivares de sódio e cloreto em comparação com indivíduos saudáveis da mesma idade (Pedersen *et al.*, 2005). Essas anormalidades salivares quantitativas e qualitativas podem levar a múltiplas cáries com perda dentária e candidíase oral (Pedersen *et al.*, 2005; Vivino *et al.*, 2019). Notavelmente,

um estudo recente mostrou que pacientes com SSp têm maior risco de cárie do que indivíduos com outras causas de hipossalivação (Berman *et al.*, 2019).

Além disso, é possível que os pacientes com SSp tenham os parâmetros de doença periodontal e de biofilme patogênico aumentados. Nesse aspecto, foram observados maiores níveis de anticorpos séricos contra patógenos periodontais nesses pacientes (Celenligil *et al.*, 1998; Scardina *et al.*, 2010). Tais achados podem estar relacionados a uma pior resposta à colonização e infecção por patógenos presentes em maior número no biofilme subgengival. Também se acredita que a maior presença de citocinas pró-inflamatórias na SSp poderia influenciar a resposta inflamatória local durante o curso da periodontite (Lugonja *et al.*, 2016). Por outro lado, mais recentemente, uma meta-análise conduzida por Goés e cols. não mostrou evidência sugerindo que a condição periodontal seja alterada pela SSp (de Goés *et al.*, 2017). Contudo, esses autores enfatizam as limitações metodológicas para suportar essa hipótese. De fato, muitos artigos foram excluídos dessa meta-análise em decorrência da subjetividade dos parâmetros para determinação da periodontite, além de não utilizarem controles saudáveis sem xerostomia para comparação com os pacientes com SSp (Goés *et al.*, 2017). De fato, os dados disponíveis sobre uma possível associação clínica entre a SSp e a periodontite são conflitantes (Antoniuzzi *et al.*, 2009; Lugonja *et al.*, 2016; de Goés *et al.*, 2018; Maarse *et al.*, 2019; Chuang *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2021).

Independentemente de haver ou não uma associação clínica entre a SSp e a periodontite, é interessante que, em um modelo experimental de periodontite induzida em roedores, observou-se que essa condição pode causar danos às glândulas salivares e hipossalivação (Nakamura-Kiyama *et al.*, 2014). Além disso, o tratamento da periodontite experimental levou à melhora da função glandular (Nakamura-Kiyama *et al.*, 2014). De forma similar, uma redução do fluxo salivar não-estimulado e estimulado foi relatada em indivíduos adultos da população geral com periodontite crônica, o que pode ser devido ao dano das glândulas salivares induzido por mediadores inflamatórios e radicais livres produzidos nessa condição (Vallabhan *et al.*, 2020).

Entretanto, os dados sobre o possível impacto do tratamento odontológico de atenção primária (TOP) sobre os sintomas de secura e os parâmetros de atividade sistêmica, bem como sobre a qualidade de vida na SSp são escassos. Na literatura, o tratamento da periodontite crônica em uma pequena amostra de pacientes com

SSp (n = 7) levou a uma melhora do fluxo salivar e dos sintomas de secura desses pacientes (Ambrósio *et al.*, 2017). Entretanto, nesse estudo, a avaliação dos desfechos clínicos de xerostomia não foi realizada por um instrumento específico, além disso não foram mensuradas as taxas de fluxo salivar não-estimulado e estimulado e não foi avaliada a qualidade de vida (Ambrósio *et al.*, 2017). Dessa forma, o pequeno número de pacientes com SSp incluídos, bem como a falta de uma avaliação completa incluindo um questionário sobre xerostomia e a medição das taxas de fluxo salivar não-estimulado e estimulado limitam a interpretação de seus achados (Ambrósio *et al.*, 2017).

Assim, os objetivos do presente estudo foram avaliar a presença dos anticorpos anti-DNase I no soro e na saliva dos pacientes com SSp, bem como a atividade enzimática da DNase I nessas amostras biológicas. Além disso, estudamos os possíveis impactos do TOP sobre a xerostomia, as taxas de fluxo salivar não-estimulado e estimulado e o perfil de citocinas pró-inflamatórias salivares nesses pacientes.

## **2. OBJETIVOS**

- Avaliar o impacto do tratamento odontológico de atenção primária sobre o grau da xerostomia, taxas de fluxo salivar não-estimulado e estimulado, perfil de citocinas pró-inflamatórias salivares, bem como a qualidade de vida dos pacientes com SSp.

- Avaliar a presença dos anticorpos anti-DNase I na saliva e no soro dos pacientes com SSp, bem como a atividade enzimática da DNase I nessas amostras biológicas.

### 3. PACIENTES E MÉTODOS

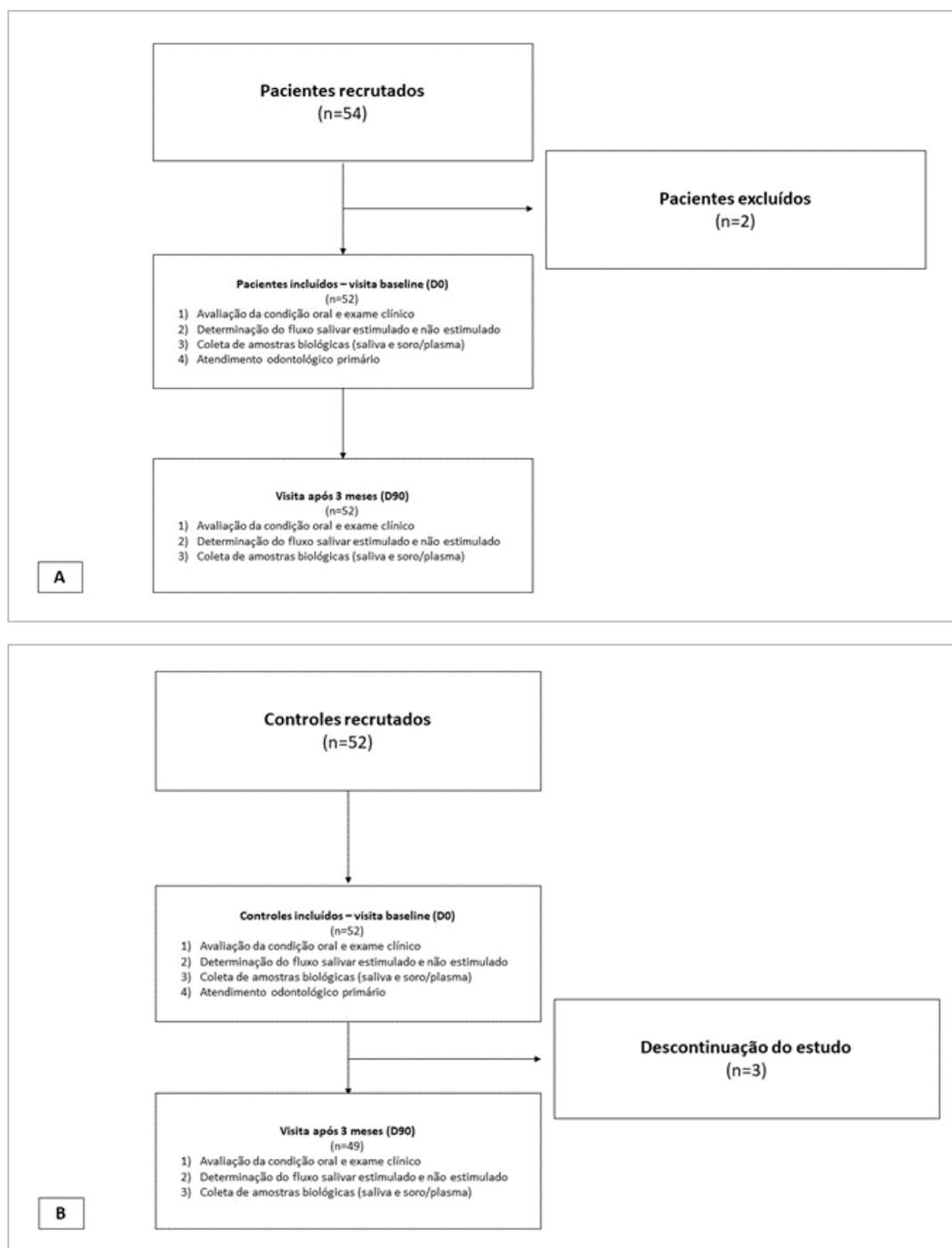
#### 3.1. Desenho do estudo, pacientes e controles e critérios de exclusão

Foram avaliados em um estudo prospectivo 52 pacientes com SSp de acordo com os critérios de classificação do *American-European Consensus Group* (2002) (Vitali *et al.*, 2002) e/ou do ACR (*American College of Rheumatology*) / EULAR (*European League Against Rheumatism*) *Classification Criteria* (2016) (Shiboski *et al.*, 2017), de ambos os sexos e seguidos regularmente no Ambulatório de Síndrome de Sjögren do Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo.

Foram também incluídos como grupo controle 52 indivíduos sem doenças autoimunes sistêmicas pareados para sexo, idade e raça e com classificação socioeconômica comparável a dos pacientes (Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa, ABEP, 2016). Os indivíduos do grupo controle foram recrutados da equipe hospitalar e seus familiares. Todos os participantes foram recrutados do dia 29 de junho de 2018 a 13 de novembro de 2020.

Os critérios de exclusão foram: outras doenças reumáticas autoimunes sistêmicas, sarcoidose, amiloidose, doença do enxerto *versus* hospedeiro, hepatites B e C, HIV, história de radioterapia de cabeça ou pescoço (Vitali *et al.*, 2002; Shiboski *et al.*, 2017), gravidez, amamentação e tratamento periodontal até 6 meses antes da entrada no estudo. Todos os participantes foram avaliados antes (*baseline*, D0) e 3 meses após o TOP (D90), utilizando um protocolo clínico padronizado (**Figura 1**). Cinquenta e quatro pacientes foram recrutados, porém dois deles foram excluídos por preencherem os critérios de classificação para outras doenças reumáticas autoimunes sistêmicas (um paciente com LES e outro com a síndrome do anticorpo antissintetase).

Todos os procedimentos realizados no presente estudo estão de acordo com as diretrizes do Comitê de Ética institucional e com a declaração de Helsinque. Foram incluídos somente pacientes que concordaram em participar do estudo conforme assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e o projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do HCFMUSP (39705014.6.0000.0068, parecer nº: 2.676.161). O estudo também foi registrado no *Clinical Trials* (*ClinicalTrials.gov Identifier*: NCT03711214).



**Figura 1.** Fluxo de pacientes com SSs (A) e indivíduos controle (B).

- SSs = síndrome de Sjögren primária.

- Dois pacientes foram excluídos por preencherem critérios de classificação para outras doenças reumáticas autoimunes sistêmicas (um paciente com lúpus eritematoso sistêmico e outro com síndrome do anticorpo antissintetase).

- Três indivíduos controle descontinuaram o estudo devido à impossibilidade de comparecer na visita após 3 meses (D90).

### 3.2. Tratamento odontológico de atenção primária

No D0, todos os participantes foram submetidos aos seguintes procedimentos: 1) avaliação clínica e avaliação da condição bucal; 2) determinação das taxas de fluxo salivar não-estimulado e estimulado; 3) coleta de amostras de sangue periférico e saliva; e 4) tratamento odontológico de atenção primária (TOP) (*primary dental care – PDC – treatment*). Após 3 meses do TOP (D90), as avaliações clínicas e laboratoriais foram repetidas (**Figura 1**).

Todos os pacientes e indivíduos controle foram submetidos ao TOP no D0, tendo este sido realizado pelo mesmo investigador. O TOP visa localizar e eliminar focos de infecção oral para prevenir complicações locais, regionais ou sistêmicas, principalmente em pacientes imunossuprimidos (Schuurhuis *et al.*, 2015; Spijkervet *et al.*, 2021). Os principais focos de infecção oral considerados foram: cáries, periodontite, doenças periapicais, dentes impactados ou parcialmente irrupcionados, não totalmente cobertos por osso ou mostrando radioluscências, cistos, polpas não vitais, ulcerações e infecções das mucosas (Schuurhuis *et al.*, 2015; Spijkervet *et al.*, 2021). O procedimento odontológico incluiu: o tratamento restaurador e preventivo da doença cárie, remoção cirúrgica de raízes residuais e dos dentes impactados ou parcialmente irrupcionados, não totalmente cobertos por osso ou mostrando radioluscências, cistos, raspagem periodontal supra e subgengival, orientação de higiene oral, tratamento das afecções de tecidos moles (remoção de lesões e infecções oportunistas) e tratamento das lesões dentais não-cariosas (López-Pintor *et al.*, 2015; Spijkervet *et al.*, 2021). Para a coleta dos dados odontológicos (lesões cariosas e não-cariosas), o exame clínico foi realizado com sonda exploratória odontológica. Foi realizado o cálculo do Índice de Cariados, Perdidos e Obturados para Dentição Permanente (Índice CPO-D) (Lopes *et al.*, 2021) para os pacientes com SSp e os indivíduos controle. Foram também mensuradas as taxas de fluxo salivar não-estimulado e estimulado, conforme descrito mais adiante. Os participantes com indicações clínicas foram submetidos ao tratamento dentário restaurador (López-Pintor *et al.*, 2015; Spijkervet *et al.*, 2021).

Os pacientes e os controles também foram avaliados quanto à periodontite (de acordo com a Classificação da Academia Americana de Periodontia) (Wiebe & Putnins, 2000). Para avaliar o estado periodontal, foi utilizada uma sonda periodontal convencional da Carolina do Norte, com exclusão dos terceiros molares. Seis sítios periodontais de todos os dentes foram avaliados (mésio-vestibular, vestibular, disto-

vestibular, méso-lingual, lingual e disto-lingual) quanto à profundidade de sondagem, nível clínico de inserção e sangramento à sondagem. Cálculo dentário, quando identificado, foi removido com curetas periodontais manuais (supra e subgengival). O tratamento consistiu em raspagem periodontal, além de alisamento radicular quando indicado (Ambrósio *et al.*, 2017).

Os pacientes com pericoronarite tiveram seus terceiros molares extraídos. Aqueles com candidíase oral foram tratados com antifúngicos tópicos (López-Pintor *et al.*, 2015; Vivino *et al.*, 2019). Os participantes que apresentaram hiperplasia fibrosa inflamatória tiveram o tecido hiperplásico removido e o fator irritativo corrigido. No caso de leucoplasia, foi realizada uma biópsia excisional.

### 3.3. Avaliação clínica

A avaliação da xerostomia para pacientes e controles foi realizada através de questionário específico (*Xerostomia Inventory*, XI) (Thomson *et al.*, 1999; da Mata *et al.*, 2012). Esse questionário é composto por 11 itens que avaliam secura oral, variando de 11 – sem xerostomia a 55 – xerostomia extrema. Melhora clinicamente significativa da xerostomia foi definida como uma redução de pelo menos 6 pontos no score XI (Thomson, 2007). A qualidade de vida foi avaliada por meio do *Short-Form 36* (SF-36) (Ware & Sherbourne, 1992; Ciconelli *et al.*, 1999). Todas as aplicações de questionários foram realizadas por pesquisadores não envolvidos com o tratamento clínico ou odontológico do paciente.

A atividade de doença sistêmica nos pacientes com SSp foi determinada pelo *EULAR Sjögren's Syndrome Disease Activity Index* (ESSDAI) (Seror *et al.*, 2010; Serrano *et al.*, 2013). O índice de sintomas (secura ocular e oral, fadiga e dores articulares ou musculares) nos pacientes com SSp foi analisado pelo *EULAR Sjögren's Syndrome Reported Index* (ESSPRI) (Seror *et al.*, 2011; Paganotti *et al.*, 2015). Em relação ao ESSDAI, uma diminuição de pelos três pontos foi considerada uma melhora relevante (Seror *et al.*, 2016). Em relação ao ESSPRI, uma redução de pelo menos um ponto foi considerado uma melhora clínica relevante (Seror *et al.*, 2016).

O desfecho primário do estudo foi a redução da xerostomia avaliada pelos valores médios do IX após o TOP (ou seja, na visita D90 em comparação com a visita D0).

### 3.4. Fluxo salivar não-estimulado e estimulado e coleta das amostras de saliva

Foi adotado o método padronizado para coleta de saliva não-estimulada conforme Kalk e cols., com adaptações (Kalk *et al.*, 2001). Obedecendo-se sempre um mesmo horário para a coleta das amostras (até às 12 horas, respeitando-se o ritmo circadiano da produção de saliva), os participantes foram orientados a não escovar os dentes, comer ou beber pelo menos 1 hora e meia antes da coleta. Fora solicitada a remoção prévia de batom ou protetor labial por meio de guardanapos. Cada paciente sentou-se confortavelmente com a cabeça levemente inclinada para frente numa cadeira odontológica convencional. As amostras foram centrifugadas conforme descrito mais adiante, fracionadas e então armazenadas a -80°C até o uso.

Para o cálculo do fluxo salivar estimulado, o protocolo descrito foi semelhante, contudo, após os 30 minutos da coleta inicial, a salivação foi mecanicamente estimulada por meio de um sialogogo confeccionado com 2 cm de parafina (odontológica) (Kalk *et al.*, 2001). O sialogogo ficava posicionado na boca durante a coleta. As amostras foram então centrifugadas, fracionadas e armazenadas em freezer a -80°C até o uso.

### 3.5. Detecção dos anticorpos anti-DNase I

Os anticorpos IgG com especificidade à DNase I foram pesquisados pelas técnicas de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) e *Western blotting*, padronizadas em nosso laboratório (Griffo *et al.*, 2020).

#### 3.5.1. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)

O anticorpo IgG sérico para DNase I foi determinado por um método de ELISA padronizado. Microplacas de poliestireno com ligação elevada foram incubadas com DNase I purificada de pâncreas bovino (Sigma-Aldrich, Mo, St. Louis, EUA, código D4527) diluída em tampão fosfato (PBS) (5 µg/mL, 100 µL). As placas foram incubadas sob agitação à temperatura ambiente (1 hora) e depois durante a noite a 4°C. Essa etapa foi seguida por 3 ciclos de lavagem com tampão fosfato e o bloqueio dos sítios livres foi realizado pela adição de albumina sérica bovina (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo) (5%, 200 µL) durante 1:30 horas a 37°C. Após a lavagem, os

poços das placas foram incubados com amostras de soro (diluídas 1:100, 100 µL) durante 1:30 horas a 37°C. A IgG ligada foi detectada pela adição de anticorpo de cabra conjugado com fosfatase alcalina dirigido à IgG humana (Sigma-Aldrich, Mo, St. Louis, EUA, código A3312), na diluição de 1:3000, 100 µL. Após no ciclo de lavagens, a reação foi desenvolvida adicionando o cromógeno (sal dissódico de 4-nitrofenil fosfato) (Sigma-Aldrich, Mo, St. Louis, EUA, código N9389). Os valores de densidade óptica (DO) foram determinados em um leitor de microplacas (SpectraMax 190, Molecular Devices, Silicon Valley, CA, EUA). Os resultados foram expressos em DO. O valor de corte foi determinado como média OD  $\pm$  3 desvios padrão (DP) de 52 amostras de soro dos indivíduos controle incluídos no estudo. Dois controles positivos selecionados entre uma série de pacientes com SSp testados aleatoriamente para a reatividade anti-DNase I e com valor de OD de 1,0 a 405 nm nos primeiros 15 a 30 minutos de reação foram incluídos em cada ensaio.

Para detecção do anticorpo IgG para DNase I nas amostras de saliva, um protocolo semelhante foi utilizado, sendo essas amostras diluídas 1:4, 100 µL e utilizou-se o mesmo conjugado diluído 1:1500, 100 µL.

### **3.5.2. Western blotting**

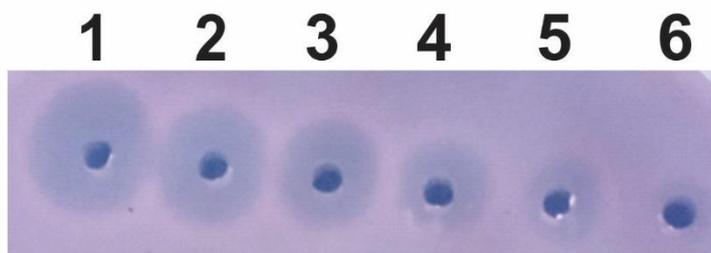
A DNase I isolada de pâncreas bovino (Sigma-Aldrich, Mo, St. Louis, EUA, código D4527) foi submetida à eletroforese na presença de sódio dodecil sulfato (SDS) em gel de poliacrilamida 14% (2 mg/mL, 1,5 µg/poço) e transferida para membranas de nitrocelulose. A incubação das amostras de soro diluídas 1:50 em 1% de leite em solução salina tamponada [Tris (TBS) Tween 0,1%] com as tiras de nitrocelulose foi feita *overnight* a 4°C e sob agitação constante. Em seguida, após três ciclos de lavagem de 10 min com TBS Tween 0,1%, foi realizada a incubação das tiras de nitrocelulose com o conjugado imunoenzimático (fração IgG de soro de cabra conjugada à fosfatase alcalina) (Sigma-Aldrich, Mo, St. Louis, EUA, código A3312) (1:4000 em 1% de leite em TBS Tween 0,1%) por 1 hora. Finalmente, após três ciclos de lavagem com TBS Tween 0,1%, a ligação dos anticorpos anti-DNase I do isotipo IgG foi revelada pela adição de BCIP/ NBT (*5-bromo-4-cloro-3'-indolil fosfato* e *nitroblue tetrazolium*, respectivamente) (Sigma-Aldrich, Mo, St. Louis, EUA, códigos B8503 e N6876).

### 3.6. Determinação das concentrações séricas e salivares de DNase I

As concentrações séricas e salivares de DNase I nos tempos 0 e 3 meses (D0 e D90) foram determinadas para os pacientes com SSp e os indivíduos controles pelo método de ELISA, utilizando-se kit comercialmente disponível (Uscn Life Science, By, China) (Dhondup *et al.*, 2016).

### 3.7. Determinação da atividade da DNase I

Para determinar a atividade da DNase I no plasma e na saliva, foi seguido o método previamente descrito (Golonka *et al.*, 2018) de *Single Radial Enzyme Diffusion* (SRED). Brevemente, o gel de agarose a 1,0% era fervido e, durante a sua fase de resfriamento (à temperatura de 55 °C), eram adicionados ao gel 20 mM de cloreto de magnésio (MgCl), 2 mM de cloreto de cálcio (CaCl), 0,01 mg/mL de brometo de etídio e 0,2 mg/mL de DNA de salmão. Em seguida, 30 mL do gel assim preparado eram aplicados a uma placa de Petri com diâmetro de 14 cm, deixando-se resfriar em temperatura ambiente. Após a gelificação da agarose, eram feitos furos de 0,35 cm de diâmetro. As amostras (4 µL) foram diluídas com 2 µL de PBS e, então, aplicadas nos furos do gel. A atividade da DNase I foi calculada utilizando-se calibradores com concentrações conhecidas de DNase I de pâncreas bovino (Sigma-Aldrich, Mo, St. Louis, EUA, código D4527) (**Figura 2**), a partir dos quais foi construída uma curva padrão. As amostras e os calibradores da curva padrão foram incubados por 24 horas a 37°C no gel de agarose e, finalmente, a leitura do diâmetro equivalente à magnitude da reação foi feita em um transiluminador UV (TFX-35M, VILBER LOUMART, MARNE LA VALLÉE, França).



**Figura 2.** Atividade da DNase I utilizando-se calibradores com concentrações conhecidas de DNase I de pâncreas bovino.

(Halo 1 : 8U, Halo 2 : 4U, Halo 3 : 2U, Halo 4 : 1U, Halo 5 : 0,5U, Halo 6 : 0,25U)

### 3.8. Perfil de citocinas inflamatórias na saliva

As amostras de saliva foram centrifugadas sob refrigeração a 3000 rpm por 15 min e os níveis de citocinas foram determinados para os pacientes e controles nos tempos 0 e 3 meses pelo método Luminex® (Belstrøm *et al.*, 2017; Könönen *et al.*, 2017; Marques Filho *et al.*, 2018; Braz-Silva *et al.*, 2019). Foram avaliadas as concentrações de citocinas salivares envolvidas na patogenia da periodontite (Ebersole *et al.*, 2015) e da SSp (Lavie *et al.*, 2004; Lavie *et al.*, 2008; Boström *et al.*, 2008; Augusto *et al.*, 2016), TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, BAFF e resistina, e também de metaloproteinase (MMP-9) (Ebersole *et al.*, 2015). As concentrações salivares de TNF- $\alpha$ , IL-1b, IL-6 e resistina foram determinadas usando o sistema MAGPIX - Millipore/Luminex (CA, EUA) com kits disponíveis comercialmente (MILLIPLEX MAP KIT, HUMAN ADIPOCYTE MAGNETIC BEAD PANEL, MILLIPORE CORPORATION, Billerica, MA, EUA), conforme orientações do fabricante. Os níveis salivares de BAFF e MMP-9 foram medidos pela técnica de ELISA, utilizando kits comercialmente disponíveis (R&D SYSTEMS - Minneapolis, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Os coeficientes de variação intra e interensaio (CV%) para cada analito foram: TNF- $\alpha$  (<10, <20), IL-1b (<15, <20), IL-6 (<10, <20), resistina (<10, <15), BAFF (7,2, 11,6) e MMP-9 (2,9 e 7,9), respectivamente.

### 3.9. Análise estatística

Os dados foram coletados na plataforma web REDCap (Vanderbilt University, Nashville, TN, EUA). As análises estatísticas foram feitas por meio do *software* SigmaStat, versão 3.1, 2004. A distribuição normal de cada parâmetro contínuo foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os grupos SSp e controle foram comparados quanto às variáveis contínuas e categóricas por meio do teste t de Student ou teste U de Mann-Whitney e teste do qui-quadrado ou exato de Fisher, quando recomendados. Os pacientes com SSp no *baseline* (D0) e 3 meses após o TOP (D90) foram avaliados para as variáveis contínuas por meio do teste t pareado ou teste de Wilcoxon e usando o teste de McNemar para parâmetros categóricos, quando aplicáveis. Os dados foram apresentados como média ( $\pm$ ) desvio padrão (DP), mediana (intervalo interquartil 25%-75%) ou n (%). Apenas testes bicaudais foram usados. Foi considerado significativo  $P < 0,05$ . O grupo com SSp consistiu de uma amostra de conveniência. O poder *post-hoc* foi de 90,9% com alfa 0,05,

considerando-se o índice CPO-D médio de  $13,3 \pm 8,2$  nos pacientes com SSp e  $8,6 \pm 6,2$  nos indivíduos controle.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Avaliação do estado de saúde oral e resultados do tratamento odontológico de atenção primária

#### 4.1.1. Características demográficas e clínicas dos pacientes com SSp

Cinquenta e dois pacientes com SSp foram incluídos. Houve predomínio do sexo feminino (98,1%) e a média da idade foi de  $51,2 \pm 11,5$  anos. O tempo médio de diagnóstico foi de  $9,5 \pm 7,9$  anos e de início dos sintomas foi de  $11,8 \pm 8,6$  anos. À inclusão no estudo, esses pacientes apresentavam as seguintes manifestações clínicas prévias da SSp: olho seco (94,2%), boca seca (94,2%), história de parotidite (76,9%), fadiga (75%), artralgia (73,1%), artrite (67,3%), vasculite cutânea (28,8%), fenômeno de Raynaud (17,3%), envolvimento pulmonar (23,1%), acidose tubular renal (5,8%), envolvimento do sistema nervoso periférico (9,6%) e linfoma (2%). Os anticorpos anti-Ro/SS-A e anti-La/SS-B foram positivos em 78,9% e 53,9%, respectivamente. Cinquenta pacientes (96,2%) preencheram os critérios de classificação do Consenso Americano-europeu (2002) e 46 (88,5%) preencheram os critérios do ACR/EULAR (2016).

#### 4.1.2. Análise comparativa dos pacientes com SSp vs. participantes controle no baseline (D0)

Os grupos com SSp e controle foram semelhantes em idade ( $P = 0,800$ ), sexo ( $P = 1,000$ ) e raça ( $P = 1,000$ ). Além disso, ambos os grupos foram comparáveis quanto ao nível socioeconômico ( $P = 0,821$ ) (**Tabela I**). O perfil de comorbidades, incluindo tabagismo atual, também foi semelhante nos dois grupos (**Tabela I**).

**Tabela I.** Análise comparativa dos pacientes com SSp e indivíduos controle em relação às características demográficas e comorbidades

	SSp n=52	Controles n=52	P
<b><u>Características demográficas</u></b>			
Idade, anos	51,2 ± 11,5	51,9 ± 13,0	0,800
Sexo feminino	51 (98,1)	51 (98,1)	1,000
<b><u>Raça</u></b>			
Branços	34 (65,4)	34 (65,4)	1,000
Afrodescendentes	16 (30,8)	16 (30,8)	
Asiáticos	2 (3,8)	2 (3,8)	
<b><u>Classificação socioeconômica</u></b>			
A/B/C1*	38 (73,1)	40 (76,9)	0,821
C2/D/E*	14 (26,9)	12 (23,1)	
<b><u>Comorbidades</u></b>			
Hipertensão	15 (28,9)	16 (30,8)	0,999
Diabetes	4 (7,7)	5 (9,6)	1,000
Dislipidemia	7 (13,5)	9 (17,3)	0,787
Tabagismo atual	2 (3,9)	2 (3,9)	1,000

Dados expressos em n (%) ou média ± desvio padrão (DP).

SSp = síndrome de Sjögren's primária.

\*A/B/C1/C2/D/E = classes socioeconômicas de acordo com a Classificação Socioeconômica da Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa (ABEP).

Em contraste, as taxas de fluxo salivar não-estimulado e estimulado no D0, bem como os valores de IX, como esperado, foram bastante diferentes entre os pacientes com SSp e os controles ( $P < 0,05$ ) (**Tabela II**). O número por indivíduo e a porcentagem de dentes cariados por indivíduo por dente presente, o número de dentes perdidos antes do exame clínico e a porcentagem de dentes obturados por indivíduo por dente presente foram maiores nos pacientes com SSp do que no grupo controle ( $P < 0,05$ ) (**Tabela II**). De acordo com esses dados, o índice CPO-D foi maior no primeiro grupo:  $13,3 \pm 8,2$  vs.  $8,6 \pm 6,2$  ( $P = 0,002$ ). As lesões cervicais não-cariosas (LCNCs) também foram mais frequentes por indivíduo por dente presente ( $P = 0,008$ ) e numerosas por indivíduo ( $P = 0,012$ ) em pacientes com SSp do que nos indivíduos controle. Em contraste, os parâmetros periodontais foram comparáveis entre os grupos com SSp e controle ( $P > 0,05$ ) (**Tabela II**). Por outro lado, as concentrações salivares de TNF- $\alpha$ , IL-6 e resistina, bem como de MMP-9 foram maiores nos pacientes com SSp do que nos controles ( $P < 0,05$ ) (**Tabela III**).

**Tabela II.** Análise comparativa dos pacientes com SSp e indivíduos controle em relação às taxas de fluxo salivar, Inventário de Xerostomia e aos parâmetros odontológicos no *baseline* (D0)

	SSp n=52	Controles n=52	P
<b><u>FLUXO SALIVAR (mL/min)</u></b>			
Não-estimulado	0,1 (0,04-0,2)	0,6 (0,3-0,8)	<0,001
Estimulado	0,5 (0,3-1,1)	2,0 (1,0-3,0)	<0,001
<b><u>INVENTÁRIO DE XEROSTOMIA</u></b>	42,0 (33,0-46,5)	17,0 (13,0-21,5)	<0,001
<b><u>PARÂMETROS DENTÁRIOS</u></b>			
<b>Dentes cariados</b>			
n por indivíduo	1,0 (0-4,0)	0 (0-1,0)	0,020
% por indivíduo por dente presente	6,1 (0-23,4)	0 (0-4,5)	0,009
<b>Dentes ausentes prévios ao exame clínico</b>			
n por indivíduo	6,5 (2,0-16,0)	3,0 (0-11,5)	0,038
<b>Dentes condenados por cáries</b>			
n por indivíduo	0 (0-0)	0 (0-0)	0,761
% por indivíduo por dentes presentes	0 (0-0)	0 (0-0)	0,860
<b>Dentes obturados</b>			
n por indivíduo	9,0 (4,5-14,0)	8,0 (1,5-12,0)	0,209
% por indivíduo por dente presente	48,0 (19,9-64,7)	29,1 (1,8-51,0)	0,045
<b>Índice CPO-D*</b>	13,3 ± 8,2	8,6 ± 6,2	0,002
<b>Lesões cervicais não-cariosas</b>			
n por indivíduo	0 (0-3,5)	0 (0-0,5)	0,012
% por indivíduo por dente presente	0 (0-18,1)	0 (0-1,8)	0,008
<b><u>PARÂMETROS PERIODONTAIS</u></b>			
Profundidade média de sondagem clínica (mm)	1,8 (1,5-1,9)	2,0 (1,0-2,3)	0,809
Média do nível clínico de inserção (mm)	1,8 (1,7-2,0)	2,0 (1,0-2,8)	0,809
Sangramento à sondagem (%)	0 (0-1,0)	0 (0-1,8)	0,619
Número de bolsas periodontais (≥4)	0 (0-4,0)	0 (0-0)	0,385
Periodontite crônica	12 (23,1)	8 (15,4)	0,456
<b><u>PERICORONARITE</u></b>	2 (3,9)	2 (3,9)	1,000
<b><u>HIPERPLASIA FIBROSA INFLAMATÓRIA</u></b>	2 (3,9)	0 (0)	0,495
<b><u>CANDIDÍASE ORAL</u></b>	7 (13,5)	1 (1,9)	0,060
<b><u>LEUCOPLASIA ORAL</u></b>	0 (0)	1 (1,9)	1,000

Dados expressos em n (%), média ± desvio padrão (DP), ou mediana (percentil 25 – percentil 75).

SSp = síndrome de Sjögren's primária. \*Índice CPO-D = Índice de Cariados, Perdidos e Obturados para Dentição Permanente.

**Tabela III.** Análise comparativa dos pacientes com SSp e indivíduos controle em relação aos níveis de citocinas no *baseline* (D0)

	SSp n=52	Controles n=52	P
TNF- $\alpha$ (pg/mL)	11,5 (6,1-27,3)	4,2 (1,8-8,4)	<0,001
IL-1 $\beta$ (pg/mL)	51,0 (15,1-131,9)	36,2 (10,5-74,6)	0,103
IL-6 (pg/mL)	41,2 (21,8-82,9)	22,4 (6,2-38,7)	0,007
Resistina (pg/mL)	51421,0 (24750,0-67358,5)	25970,0 (6670,5-56078,0)	0,004
MMP-9 (pg/mL)	4,8 (2,6-7,4)	2,4 (1,2-4,7)	<0,001
BAFF (pg/mL)	23,0 (9,5-53,0)	14,5 (8,0-29,0)	0,144

Dados expressos em n (%) ou mediana (percentil 25 – percentil 75).

SSp = síndrome de Sjögren's primária.

BAFF = fator de ativação de células B, TNF- $\alpha$  = fator de necrose tumoral-alfa, IL = interleucina, MMP-9 = metaloproteinase de matriz-9.

No D0, os pacientes com SSp tiveram resultados piores do que os controles no componente de saúde física do SF-36 [40,3 (33,9 - 51,1) vs. 54,4 (45,8 - 57,3),  $P < 0,001$ ], e no componente de saúde mental [29,1 (13,7 - 52,4) vs. 47,8 (29,2 - 52,4),  $P < 0,024$ ], respectivamente.

#### 4.1.3. Análise comparativa dos pacientes com SSp antes (D0) e após o TOP (D90)

Todos os 52 pacientes com SSp completaram o estudo (D0 e D90). No grupo com SSp, os valores médios do IX foram comparáveis nesses dois momentos ( $P = 0,285$ ) (**Tabela IV**). No entanto, é interessante que 14/52 (26,9%) deles tiveram uma melhora clinicamente significativa (redução de pelo menos 6 pontos no escore IX). Neste aspecto, os pacientes com SSp tiveram aumento nas taxas de fluxo salivar não-estimulado ( $P < 0,001$ ) e estimulado ( $P = 0,001$ ) no D90 comparativamente ao D0. Os valores medianos do ESSPRI ( $P = 0,072$ ) e do ESSDAI ( $P = 0,111$ ) foram comparáveis no D0 e D90 (**Tabela IV**). Os níveis de citocinas salivares também permaneceram inalterados em D0 e D90 ( $P \geq 0,05$ ) (**Tabela IV**). Vale ressaltar que os tratamentos tópicos e orais para a xerostomia, assim como o uso de hidroxiquina, prednisona, imunossuppressores e agentes biológicos foram semelhantes em D0 e D90 ( $P > 0,05$ ) (**Tabela IV**). Não houve melhora nos componentes do SF-36 após o TOP ( $P > 0,05$ ).

**Tabela IV.** Análise comparativa dos pacientes com SSp que completaram a avaliação clínica no *baseline* (D0) e 3 meses após o tratamento odontológico de atenção primária (D90)

	SSp – D0 n=52	SSp – D90 n=52	P
<b><u>FLUXO SALIVAR (mL/min)</u></b>			
Não-estimulado	0,1 (0,04-0,2)	0,3 (0,2-0,4)	<0,001
Estimulado	0,5 (0,3-1,1)	0,7 (0,4-1,4)	0,001
<b><u>INVENTÁRIO DE XEROSTOMIA</u></b>			
Melhora clínica <sup>†</sup>	39,7 ± 9,5	38,5 ± 8,6	0,285
	-	14 (26,9)	-
<b><u>ESSPRI</u></b>			
	5,8 (4,2-7,2)	6,2 (4,8-7,8)	0,072
Secura oral e ocular	7,0 (5,0-8,0)	7,5 (5,0-8,0)	0,975
Fadiga	5,0 (4,5-7,5)	6,5 (4,5-8,0)	0,092
Dor	6,0 (2,0-8,0)	6,0 (2,5-8,0)	0,806
Melhora clínica <sup>**</sup>	-	6 (11,5)	-
<b><u>ESSDAI</u></b>			
	3,0 (1,0-7,0)	2,0 (0-6,5)	0,111
Melhora clínica <sup>***</sup>	-	6 (11,5)	-
<b><u>NÍVEIS SALIVARES</u></b>			
TNF-α (pg/mL)	11,5 (6,1-27,3)	11,8 (5,2-24,7)	0,362
IL-1β (pg/mL)	51,0 (15,1-131,9)	43,0 (16,9-123,9)	0,649
IL-6 (pg/mL)	41,2 (21,8-82,9)	34,5 (14,6-80,3)	0,469
Resistina (pg/mL)	51421,0 (24750,0-67358,5)	35727,5 (17668,5-70290,0)	0,052
MMP-9 (pg/mL)	4,8 (2,6-7,4)	4,5 (2,7-7,7)	0,964
BAFF (pg/mL)	23,0 (9,5-53,0)	28,0 (7,5-79,0)	0,297
<b><u>TRATAMENTOS ATUAIS</u></b>			
<b>Síndrome sicca</b>			
<b><u>Tópicos</u></b>			
Saliva artificial	28 (53,9)	25 (48,1)	0,371
Lágrimas artificiais	47 (90,4)	41 (78,9)	0,041
<b><u>Via oral</u></b>			
Pilocarpina	4 (7,7)	4 (7,7)	1,000
N-acetilcisteína	26 (50)	22 (42,3)	0,221
Óleo de linhaça	22 (42,3)	19 (36,5)	0,371
<b><u>Manifestações sistêmicas</u></b>			
Prednisona	21 (40,4)	20 (38,5)	1,000
Dose (mg/dia)	5 (5-10)	5 (5-17,5)	0,240
Hidroxicloroquina	26 (50)	22 (42,3)	0,221
<b><u>Imunossupressores</u></b>			
Metotrexato	6 (11,5)	4 (7,7)	0,617
Leflunomida	3 (5,8)	4 (7,7)	1,000

Azatioprina	8 (15,4)	9 (17,3)	1,000
Micofenolato mofetil	9 (17,3)	5 (9,6)	0,134
Ciclofosfamida	0 (0)	1 (1,9)	1,000
<u>Agentes biológicos</u>			
Rituximabe	3 (5,8)	3 (5,8)	1,000

Dados expressos em n (%), média ± desvio padrão (DP), ou mediana (percentil 25 – percentil 75).

SSp = síndrome de Sjögren's primária, TOP = tratamento odontológico de atenção primária.

ESSPRI = *EULAR Sjögren's Syndrome Reported Index*.

ESSDAI = *EULAR Sjögren's Syndrome Disease Activity Index*.

\* Redução de pelo menos 6 pontos.

\*\* Redução de pelo menos 1 ponto.

\*\*\* Redução de pelo menos 3 pontos.

BAFF = fator de ativação de células B, TNF-α = fator de necrose tumoral alfa, IL = interleucina, MMP-9 = metaloproteinase de matriz-9.

#### 4.1.4. Análise comparativa dos indivíduos controle antes (D0) e após o TOP (D90)

Durante o estudo (D0 vs. D90), os valores do IX ( $P = 0,124$ ), das taxas de fluxo salivar não-estimulado ( $P = 0,680$ ) e estimulado ( $P = 0,089$ ) permaneceram estáveis no grupo controle (**Tabela V**). Da mesma forma, os indivíduos controle não tiveram melhora nos componentes do SF-36 após o TOP ( $P > 0,05$ ).

**Tabela V.** Análise comparativa dos indivíduos controle que completaram as avaliações clínicas no *baseline* (D0) e 3 meses após o TOP (D90)

	Controles – D0 n=49	Controles – D90 n=49	P
<b>FLUXO DE SALIVAR (mL/min)</b>			
Não-estimulado	0,6 (0,3-0,8)	0,6 (0,3-1,1)	0,680
Estimulado	2,2 ± 1,3	2,5 ± 1,4	0,089
<b>INVENTÁRIO DE XEROSTOMIA</b>			
Melhora clínica*	-	6 (12,3)	-
<b>NÍVEIS SALIVARES</b>			
TNF-α (pg/mL)	4,3 (1,9-8,3)	4,7 (2,5-9,5)	0,861
IL-1β (pg/mL)	38,2 (10,9-74,5)	29,3 (13,6-56,0)	0,296
IL-6 (pg/mL)	23,0 (6,2-37,4)	14,9 (7,6-32,3)	0,249
Resistina (pg/mL)	32965,8 ± 27504,6	30872,9 ± 27116,9	0,480
MMP-9 (pg/mL)	2,3 (1,2-4,7)	2,5 (1,6-3,7)	0,846

Dados expressos em média ± desvio padrão (SD) ou mediana (25 percentil – 75 percentil).

TOP = tratamento odontológico de atenção primária.

\*Redução de pelo menos 6 pontos.

IL = interleucina, MMP-9 = metaloproteinase de matriz-9, TNF-α = fator de necrose tumoral-alfa.

#### 4.2. Estudo do anticorpo anti-DNase I e da atividade enzimática

Demonstramos ainda por um método bastante específico, *Western blotting* com DNase I isolada de pâncreas bovino, a presença de anticorpos séricos da classe IgG dirigidos a duas frações proteicas dessa enzima, de 35 e de 25 kDa, que foram significativamente mais frequentes nos pacientes com SSp do que no grupo controle (**Tabela VI e Figura 3**). Essas reatividades foram frequentes nos pacientes com SSp, anticorpos anti-fração de 25 kDa (25,0%), anti-35 kDa (57,7%), anti-25 e/ou 35 kDa (63,5%) (**Tabela VI**).

Identificamos ainda pelo método de ELISA (**Tabela VI**) com confirmação por *Western blotting* (**Figuras 2 e 3**) a presença do anticorpo anti-DNase I IgG na saliva dos pacientes com SSp. Como observado nessas figuras, alguns pacientes com SSp apresentam essa reatividade apenas no soro [**Figura 3 (linhas 1 e 2)**] ou apenas na saliva [**Figura 4 (linhas 5 e 6)**] e, em alguns casos, em ambas as amostras biológicas [**Figura 3 (linhas 5 e 6; 7 e 8)**].

Também demonstramos a diminuição da atividade da DNase I na saliva dos pacientes com SSp comparativamente aos controles (**Tabela VI**).

**Tabela VI.** Análise comparativa dos pacientes com SSp e indivíduos controle quanto aos níveis séricos de BAFF, DNase 1 e anticorpos anti-DNase 1 no soro e na saliva no *baseline* (D0)

	SSp n=52	Controles n=52	P
<b><u>NÍVEIS SÉRICOS</u></b>			
BAFF (pg/mL)	1200,0 (995,0 - 1595,0)	980,0 (839,0 - 1101,5)	<0,001
DNase 1 (pg/mL)	76,0 (57,5-111,3)	68,0 (42,0-89,3)	0,074
Anti-DNase 1 ( <i>W. blot</i> ) <sup>a</sup>			
- banda de 25 kDa	13 (25,0)	3 (5,8)	0,007
- banda de 35 kDa	30 (57,7)	6 (11,5)	<0,001
- banda de 25 e/ou 35 kDa	33 (63,5)	6 (11,5)	<0,001
- banda de 25 + 35 kDa	10 (19,2)	3 (5,8)	0,072
Anti-DNase 1 (ELISA) <sup>b</sup>			
- concentrações (DO)	0,125 (0,085-0,17)	0,085 (0,05-0,125)	0,002
- frequência	4 (7,7)	1 (1,9)	0,363
<b><u>NÍVEIS SALIVARES</u></b>			
DNase 1 (pg/mL)	293,0 (208,3-385,0)	255,0 (197,0-330,0)	0,188

ANTI-DNase 1 (ELISA) <sup>b</sup>			
- concentrações (DO)	0,12 (0,05-0,24)	0,03 (0,015-0,07)	<0,001
- frequência	14 (26,9)	1 (1,9)	<0,001

**ATIVIDADE DA DNase I, U**

Plasma	0,5 (0,3-0,8)	0,4 (0,1-0,9)	0,561
Saliva	0,4 (0-0,5)	0,5 (0,4-0,5)	0.023

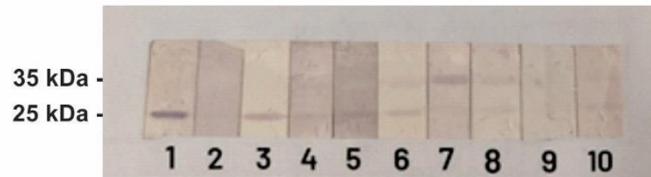
Dados expressos em n (%) ou mediana (percentil 25 – percentil 75).

SSp = síndrome de Sjögren primária.

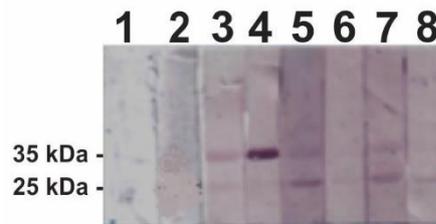
<sup>a</sup>Anticorpos da classe IgG detectados pelo método de *Western blotting*.

<sup>b</sup>Anticorpos da classe IgG detectados pelo método de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA).

BAFF = Fator de ativação de células B, DO = densidade óptica.



**Figura 3.** Imagem de um ensaio de *Western blotting* com DNase I bovina como substrato. As linhas de 1 a 8 foram incubadas com amostras de pacientes com síndrome de Sjögren primária (1- soro, 2- saliva de um mesmo paciente e assim respectivamente, 3 e 4, 5 e 6, 7 e 8). As linhas 9 e 10 foram incubadas respectivamente com as amostras de soro e saliva de um mesmo indivíduo normal.



**Figura 4.** Imagem ilustrativa de um ensaio de *Western blotting* com DNase I bovina como substrato.

A linha 1 foi incubada com saliva e a linha 2 com soro de um indivíduo controle. As linhas 3 (saliva) e 4 (soro), 5 (saliva) e 6 (soro) e 7 (saliva) e 8 (soro) foram incubadas respectivamente com as amostras de três pacientes com síndrome de Sjögren primária.

## 5. DISCUSSÃO

Esse estudo demonstrou que o tratamento odontológico de atenção primária promoveu melhora nas taxas de fluxo salivar não-estimulado e estimulado em pacientes com SSp, porém sem redução dos valores absolutos do Inventário de Xerostomia. Além disso, confirmou uma alta frequência de cáries dentárias e perdas dentárias em pacientes com SSp em comparação com indivíduos controle pareados por sexo, idade e raça, sem doenças sistêmicas autoimunes e com classificação socioeconômica e perfil de comorbidades comparáveis aos dos pacientes.

O presente trabalho teve algumas vantagens, incluindo seu desenho prospectivo com uma avaliação completa, incluindo a mensuração das taxas de fluxo salivar não-estimulado e estimulado, bem como um instrumento específico para xerostomia. Além disso, incluiu uma população homogênea de pacientes com SSp, os quais foram classificados de acordo com critérios amplamente aceitos (Vitali *et al.*, 2002; Shiboski *et al.*, 2017) e que não tinham outras doenças autoimunes inflamatórias sistêmicas associadas, como o LES e a artrite reumatoide (AR). De fato, o LES e a AR podem estar associados à SS (SS secundária) (Pasoto *et al.*, 2019) e podem afetar a saúde bucal (Irwandi *et al.*, 2022). Outro aspecto importante é que foi incluído um grupo controle comparativo sem doenças sistêmicas autoimunes sistêmicas e pareado por sexo, idade e raça, além de ter perfis socioeconômicos e de comorbidades comparáveis com os pacientes, compreendendo o tabagismo atual, hipertensão, diabetes e dislipidemia. De fato, as características demográficas e as comorbidades são relevantes para os parâmetros odontológicos, uma vez que idade, raça e nível socioeconômico influenciam diretamente as frequências de cáries (Meneghim *et al.*, 2007), dentes perdidos (Borges *et al.*, 2014) e de maior valores do índice CPO-D (Baldani *et al.*, 2004). Além disso, a idade (Clark *et al.*, 2021) e o fator socioeconômico também podem influenciar alguns parâmetros periodontais (Gesser *et al.*, 2001; Boing *et al.*, 2005). Da mesma forma, o tabagismo atual (Kassirer, 1994; Jiang *et al.*, 2019; Watt *et al.*, 2019; Kapila, 2021) e o diabetes (Coelho *et al.*, 2020; Luong *et al.*, 2021; Barutta *et al.*, 2022) podem influenciar o estado de saúde dental e gengival.

O número por indivíduo e a porcentagem de dentes cariados por indivíduo por dente presente, o número de dentes perdidos antes do exame clínico e a porcentagem de dentes obturados por indivíduo por dente presente foram maiores

nos pacientes com SSp do que no grupo controle, mostrando a relevância das cárie dentárias nesses pacientes, como observado em estudos anteriores (Christensen *et al.*, 2001; Fox *et al.*, 2008; Berman *et al.*, 2019). Também calculamos o índice CPO-D, o qual foi maior nos pacientes com SSp do que no grupo controle, confirmando um estudo anterior pareado apenas por idade (Christensen *et al.*, 2001), sem considerar a classificação socioeconômica, que é um fator importante para a cárie dentária (Baldani *et al.*, 2004; Meneghim *et al.*, 2007; Borges *et al.*, 2014; Baniasadi *et al.*, 2021).

Uma observação interessante do presente estudo é que os LCNCs, as quais são definidas clinicamente como perda de tecido dentário ao redor do cemento-esmalte não associados à cárie dentária (Penoni *et al.*, 2021), também foram mais frequentes e numerosas nos pacientes com SSp do que nos indivíduos controle. Até onde sabemos, tal achado não havia sido relatado anteriormente na SSp. As LCNCs são consideradas de etiologia multifatorial, sendo alguns fatores importantes a idade, dieta acidificada, estado de saúde bucal e hábitos de higiene (Tomasik, 2006; Penoni *et al.*, 2021). De fato, a etiologia dessas lesões ainda não foi totalmente esclarecida e sua possível associação com a diminuição das taxas de fluxo salivar não-estimulado e estimulado é controversa (Kolak *et al.*, 2018).

Por outro lado, observamos que os parâmetros periodontais foram comparáveis nos grupos de pacientes com SSp e controles. No entanto, a amostra de conveniência é uma limitação do presente estudo que impede uma conclusão definitiva sobre o risco relativo de periodontite na SSp. A esse respeito, existem dados conflitantes sobre a doença periodontal na SSp. Enquanto estudos retrospectivos e observacionais encontraram uma correlação positiva entre essas duas condições (Antoniazzi *et al.*, 2009; Chuang *et al.*, 2020), outros pesquisadores não confirmaram esse achado (Tseng *et al.*, 1990; Tseng 1991; Lugonja *et al.*, 2016), incluindo estudos recentes de revisão sistemática e metanálise que não indicaram evidências de tal associação (de Goés *et al.*, 2018; Maarse *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2021).

Em relação ao TOP, não há dados na literatura sobre seu impacto no IX e na atividade sistêmica na SSp. O presente estudo não atingiu seu desfecho primário, ou seja, não houve alívio dos sintomas de boca seca avaliados pelos valores médios do IX. Nesse aspecto, o baixo valor mediano da taxa de fluxo salivar estimulado no

grupo com SSp (0,5 mL/min) está associado a pior resultado do tratamento da boca seca nessa doença (Ramos-Casals *et al.*, 2020).

Apesar disso, o aumento das taxas de fluxo salivar não-estimulado e estimulado nos pacientes com SSp após o TOP é bastante relevante, uma vez que a diminuição do fluxo salivar pode estar associada as complicações bucais dessa doença, como múltiplas cáries dentárias (Wu, 2008). De fato, a saliva contém glicoproteínas, IgA, lipídios e eletrólitos que têm função protetora da mucosa oral e dos dentes (Pedersen *et al.*, 2018). Corroborando com essa hipótese, há evidências de que, na população adulta geral, o fluxo salivar reduzido é um fator de risco para a presença de cáries dentárias (Shimazaki *et al.*, 2017; Pedersen *et al.*, 2018) e também pode influenciar a doença periodontal (Shimazaki *et al.*, 2017).

O mecanismo subjacente para o aumento da taxa de fluxo salivar após o TOP aqui observado pode estar relacionado à melhora do estado inflamatório da mucosa oral após a resolução de focos infecciosos orais, o que poderia diminuir o dano das glândulas salivares, semelhante ao descrito na periodontite experimental (Nakamura-Kiyama *et al.*, 2014).

Não observamos diminuição nas concentrações de citocinas pró-inflamatórias salivares após o TOP nos pacientes com SSp. Esse achado está de acordo com um estudo anterior de tratamento de periodontite em uma pequena amostra de pacientes com SSp (n = 7) (Ambrósio *et al.*, 2017) e, provavelmente, reflete o processo inflamatório crônico localizado no interior das glândulas salivares desses pacientes. Da mesma forma, não observamos alteração no ESSPRI (índice composto por secura ocular e oral, fadiga e dor) e ESSDAI (índice de atividade sistêmica) após o TOP. Nesse sentido, o tratamento das manifestações glandulares e sistêmicas da SSp pode ser dissociado e não há fortes evidências de resultados satisfatórios (Ramos-Casals *et al.*, 2020).

Os pacientes com SSp também apresentam qualidade de vida prejudicada (Cornec *et al.*, 2017), o que foi confirmado nesse estudo. Não observamos melhora na qualidade de vida após o TOP e a falta de alívio dos sintomas de boca seca, apesar do aumento do fluxo salivar, pode ser responsável por esse achado. Além disso, a redução da qualidade de vida na SSp é atribuída a vários fatores, incluindo secura ocular e oral, fadiga e dor (Cornec *et al.*, 2017; Koh *et al.*, 2017; McCoy *et al.*, 2021).

Quanto aos resultados do estudo dos anticorpos anti-DNase I no soro dos pacientes com SSp, pelo método de *Western blotting*, demonstramos a ocorrência de reatividade dirigida a duas frações, de 25 e 35 kDa, o que não havia sido identificado no estudo prévio (Griffo *et al.*, 2020). Além disso, descrevemos a presença desse anticorpo na saliva dos pacientes com SSp, o que pode ser um passo inicial para a compreensão do seu possível papel na fisiopatologia dessa doença. Nesse aspecto, é interessante que, em alguns pacientes, o anti-DNase I IgG foi detectado somente na saliva e não no soro, sugerindo a possibilidade de produção desse anticorpo por linfócitos localizados nos infiltrados das glândulas salivares.

Nossos achados não confirmaram a diminuição da atividade enzimática da DNase I no plasma dos pacientes com SSp (Fragoulis *et al.*, 2015). Todavia, demonstramos pela primeira vez a redução da atividade dessa enzima na saliva de tais pacientes, comparativamente a indivíduos controle sem doenças autoimunes e pareados por sexo, idade e raça. É possível que o anticorpo anti-DNase I possa ter um papel na diminuição da atividade da enzima alvo. Entretanto, outros fatores presentes na saliva dos pacientes com SSp, como a diminuição do pH, bem como a presença de maiores concentrações de sódio e cloreto (Pedersen *et al.*, 2005) podem também estar implicados na redução da atividade da DNase I.

De fato, a composição da saliva dos pacientes com SSp tem sido amplamente estudada, uma vez que a mesma pode conter uma diversidade de subprodutos genômicos, proteômicos e transcriptômicos, além de alterações microbiológicas e imunológicas, as quais podem ser um reflexo de alterações locais ou sistêmicas (Katsiogiannis & Wong, 2016). Em relação aos estudos de análise proteômica, um trabalho utilizando cromatografia líquida e espectrometria de massas demonstrou um aumento nas concentrações de proteínas envolvidas na regulação da imunidade inata e reparo tecidual na saliva dos pacientes com SSp, comparativamente a controles saudáveis (Aqrawi *et al.*, 2017). Em outro estudo sobre a composição salivar de pacientes com SSp e indivíduos saudáveis através da análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, os resultados mostraram significativas alterações nos biomarcadores proteômicos e genômicos no primeiro grupo, com destaque para a redução de algumas enzimas, incluindo anidrase carbônica VI e lisozima C (Hu *et al.*, 2007). Embora o objetivo principal de tal estudo tenha sido identificar biomarcadores para auxiliar o diagnóstico de SSp,

tais diferenças podem também justificar em parte as mudanças funcionais na saliva dos pacientes com essa doença (Hu *et al.*, 2007).

Em um estudo que analisou a saliva de roedores num modelo experimental de SSp, 1722 proteínas tiveram sua expressão modificada quando comparada com a saliva dos animais controle (Li *et al.*, 2021). Além disso, foi observada redução das concentrações de componentes importantes do sistema immune, como a fração C3 do complemento (Li *et al.*, 2021).

Todas essas alterações da composição salivar na SSp são importantes e podem estar ligadas à redução da atividade da DNase I. Por sua vez, a diminuição da atividade dessa enzima, teoricamente, poderia comprometer o *clearance* de debris celulares resultantes do processo de apoptose, com a consequente persistência de DNA extracelular e estimulação crônica do sistema imunológico (Wallport, 2000; Fragoulis *et al.*, 2015), contribuindo assim para a fisiopatologia do dano glandular na SSp.

## 6. CONCLUSÃO

- Os valores do índice CPO-D foram maiores nos pacientes com SSp do que nos controles sem doenças autoimunes sistêmicas, pareados por sexo, idade e raça e com perfis socioeconômico e de comorbidades comparáveis aos pacientes, confirmando a relevância das lesões cariosas na SSp.

- Além disso, demonstramos uma maior frequência de lesões cervicais não-cariosas nos pacientes com SSp.

- O tratamento odontológico de atenção primária promoveu melhora significativa das taxas de fluxo salivar não-estimulado e estimulado nos pacientes com SSp. No entanto, essa melhora não impactou nos valores do Inventário de Xerostomia. Esse achado, embora sem melhora da xerostomia, tem o potencial de contribuir para a redução das complicações orais da SSp e reforça a sua recomendação para esses pacientes.

- Demonstramos a presença do anticorpo anti-DNase I no soro e na saliva dos pacientes com SSp, bem como a diminuição da atividade dessa enzima na saliva, o que, em hipótese, pode contribuir para a fisiopatologia do dano das glândulas salivares.

## REFERÊNCIAS

- Ambrósio LM, Rovai ES, França BN, Balzarini DA, Abreu IS, Lopes SB, et al. Effects of periodontal treatment on primary Sjögren's syndrome symptoms. *Braz Oral Res.* 2017; 31: e8.
- Antoniuzzi RP, Miranda LA, Zanatta FB, Islabão AG, Gustafsson A, Chiapinotto GA, et al. Periodontal conditions of individuals with Sjögren's syndrome. *J Periodontol.* 2009; 80 (3): 429-35.
- Aqrawi LA, Galtung HK, Vestad B, Øvstebø R, Thiede B, Rusthen S, et al. Identification of potential saliva and tear biomarkers in primary Sjögren's syndrome, utilising the extraction of extracellular vesicles and proteomics analysis. *Arthritis Res Ther.* 2017; 19 (1): 14.
- Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa, ABEP, 2016. <http://www.abep.org/>.
- Augusto KL, Bonfa E, Pereira RM, Bueno C, Leon EP, Viana VS, et al. Metabolic syndrome in Sjögren's syndrome patients: a relevant concern for clinical monitoring. *Clin Rheumatol.* 2016; 35 (3): 639-47.
- Baldani MH, Vasconcelos AG, Antunes JL. Associação do índice CPO-D com indicadores sócio-econômicos e de provisão de serviços odontológicos no Estado do Paraná, Brasil [Association of the DMFT index with socioeconomic and dental services indicators in the state of Paraná, Brazil]. *Cad Saude Publica.* 2004; 20 (1): 143-52.
- Baniasadi K, Armoon B, Higgs P, Bayat AH, Mohammadi Gharehghani MA, Hemmat M, et al. The association of oral health status and socio-economic determinants with oral health-related quality of life among the elderly: a systematic review and meta-analysis. *Int J Dent Hyg.* 2021; 19 (2): 153-65.

Barutta F, Bellini S, Durazzo M, Gruden G. Novel insight into the mechanisms of the bidirectional relationship between diabetes and periodontitis. *Biomedicines*. 2022; 10 (1): 178.

Belstrøm D, Damgaard C, Könönen E, Gürsoy M, Holmstrup P, Gürsoy UK. Salivary cytokine levels in early gingival inflammation. *J Oral Microbiol*. 2017; 9 (1): 1364101.

Berman N, Vivino F, Baker J, Dunham J, Pinto A. Risk factors for caries development in primary Sjogren syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2019; 128 (2): 117-22.

Boing AF, Peres MA, Kovaeski DF, Zange SE, Antunes JL. Estratificação sócio-econômica em estudos epidemiológicos de cárie dentária e doenças periodontais: características da produção na década de 90 [Social stratification in epidemiological studies of dental caries and periodontal diseases: a profile of the scientific literature in the 1990s]. *Cad Saude Publica*. 2005; 21 (3): 673-8.

Borges CM, Campos AC, Vargas AM, Ferreira EF. Perfil das perdas dentárias em adultos segundo o capital social, características demográficas e socioeconômicas [Adult tooth loss profile in accordance with social capital and demographic and socioeconomic characteristics]. *Cien Saude Colet*. 2014; 19 (6): 1849-58.

Boström EA, d'Elia HF, Dahlgren U, Simark-Mattsson C, Hasséus B, Carlsten H, et al. Salivary resistin reflects local inflammation in Sjögren's syndrome. *J Rheumatol*. 2008; 35 (10): 2005-11.

Bowman SJ, Ibrahim GH, Holmes G, Hamburger J, Ainsworth JR. Estimating the prevalence among Caucasian women of primary Sjögren's syndrome in two general practices in Birmingham, UK. *Scand J Rheumatol*. 2004; 33 (1): 39-43.

Braz-Silva PH, Bergamini ML, Mardegan AP, De Rosa CS, Haseus B, Jonasson P. Inflammatory profile of chronic apical periodontitis: a literature review. *Acta Odontol Scand*. 2019; 77 (3): 173-80.

Brito-Zerón P, Acar-Denizli N, Ng WF, Horváth IF, Rasmussen A, Seror R, et al. Epidemiological profile and north-south gradient driving baseline systemic involvement of primary Sjögren's syndrome. *Rheumatology (Oxford)*. 2020; 59 (9): 2350-9.

Brito-Zerón P, Acar-Denizli N, Ng WF, Zeher M, Rasmussen A, Mandl T, et al. How immunological profile drives clinical phenotype of primary Sjögren's syndrome at diagnosis: analysis of 10,500 patients (Sjögren Big Data Project). *Clin Exp Rheumatol*. 2018; 36 Suppl 112 (3): 102-12.

Celenligil H, Eratalay K, Kansu E, Ebersole JL. Periodontal status and serum antibody responses to oral microorganisms in Sjögren's syndrome. *J Periodontol*. 1998; 69 (5): 571-7.

Chiorini JA, Cihakova D, Ouellette CE, Caturegli P. Sjögren syndrome: advances in the pathogenesis from animal models. *J Autoimmun*. 2009; 33 (3-4): 190-6.

Christensen LB, Petersen PE, Thorn JJ, Schiødt M. Dental caries and dental health behavior of patients with primary Sjögren syndrome. *Acta Odontol Scand*. 2001; 59 (3): 116-20.

Chuang CJ, Hsu CW, Lu MC, Koo M. Increased risk of developing dental diseases in patients with primary Sjögren's syndrome- a secondary cohort analysis of population-based claims data. *PLoS One*. 2020; 15 (9): e0239442.

Ciconelli RM, Ferraz MB, Santos W, Meinão I, Quaresma MR. Tradução para a língua portuguesa e validação do questionário genérico de avaliação de qualidade de vida SF-36 (Brasil SF-36)/ Brazilian-Portuguese version of the SF-36. A reliable and valid quality of life outcome measure. *Rev Bras Reumatol*. 1999; 39 (3): 143-50.

Clark D, Kotronia E, Ramsay SE. Frailty, aging, and periodontal disease: basic biologic considerations. *Periodontol 2000*. 2021; 87 (1): 143-56.

Coelho AS, Amaro IF, Caramelo F, Paula A, Marto CM, Ferreira MM, et al. Dental caries, diabetes mellitus, metabolic control and diabetes duration: a systematic review and meta-analysis. *J Esthet Restor Dent*. 2020; 32 (3): 291-309.

Cornec D, Devauchelle-Pensec V, Mariette X, Jousse-Joulin S, Berthelot JM, Perdriger A, et al. Severe health-related quality of life impairment in active primary Sjögren's syndrome and patient-reported outcomes: data from a large therapeutic trial. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2017; 69 (4): 528-35.

da Mata AD, da Silva Marques DN, Freitas FM, de Almeida Rato Amaral JP, Trindade RT, Barcelos FA, et al. Translation, validation, and construct reliability of a Portuguese version of the Xerostomia Inventory. *Oral Dis*. 2012; 18 (3): 293-8.

de Goés Soares L, Rocha RL, Bagordakis E, Galvão EL, Douglas-de-Oliveira DW, Falci SGM. Relationship between Sjögren syndrome and periodontal status: a systematic review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2018; 125 (3): 223-31.

Dhondup Y, Ueland T, Dahl CP, Askevold ET, Sandanger Ø, Fiane A, et al. Low circulating levels of mitochondrial and high levels of nuclear DNA predict mortality in chronic heart failure. *J Card Fail*. 2016 (10): 22: 823-8.

Ebersole JL, Nagarajan R, Akers D, Miller CS. Targeted salivary biomarkers for discrimination of periodontal health and disease(s). *Front Cell Infect Microbiol*. 2015; 5: 62.

Fayyaz A, Kurien BT, Scofield RH. Autoantibodies in Sjögren's syndrome. *Rheum Dis Clin North Am*. 2016; 42 (3): 419-34.

Fox PC, Bowman SJ, Segal B, Vivino FB, Murukutla N, Choueiri K, et al. Oral involvement in primary Sjögren syndrome. *J Am Dent Assoc*. 2008; 139 (12): 1592-601.

Fragoulis GE, Vakrakou AG, Papadopoulou A, Germenis A, Kanavakis E, Moutsopoulos HM, et al. Impaired degradation and aberrant phagocytosis of necrotic cell debris in the peripheral blood of patients with primary Sjögren's syndrome. *J Autoimmun.* 2015; 56: 12-22.

García-Carrasco M, Ramos-Casals M, Rosas J, Pallarés L, Calvo-Alen J, Cervera R, et al. Primary Sjögren syndrome: clinical and immunologic disease patterns in a cohort of 400 patients. *Medicine.* 2002; 81 (4): 270-80.

Gesser HC, Peres MA, Marcenes W. Condições gengivais e periodontais associadas a fatores socioeconômicos [Gingival and periodontal conditions associated with socioeconomic factors]. *Rev Saude Publica.* 2001; 35 (3): 289-93.

Golonka RM, Yeoh BS, Petrick JL, Weinstein SJ, Albanes D, Gewirtz AT, et al. Deoxyribonuclease I activity, cell-free DNA, and risk of liver cancer in a prospective cohort. *JNCI Cancer Spectr.* 2018; 2 (4): pky083.

Griffo P, Viana VVST, Pasoto SG, Leon EP, Bonfa E. Anti-DNase I antibody: a new serological reactivity in primary Sjögren syndrome. *J Clin Rheumatol.* 2020; 26 (1): 19-23.

Harley JB, Alexander EL, Bias WB, Fox OF, Provost TT, Reichlin M, et al. Anti-Ro (SS-A) and anti-La (SS-B) in patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 1986; 29 (2): 196-206.

Hu S, Wang J, Meijer J, leong S, Xie Y, Yu T, et al. Salivary proteomic and genomic biomarkers for primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 2007; 56 (11): 3588-600.

Irwandi RA, Kuswandani SO, Harden S, Marletta D, D'Aiuto F. Circulating inflammatory cell profiling and periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Leukoc Biol.* 2022 Feb 24. Epub ahead of print.

Jiang X, Jiang X, Wang Y, Huang R. Correlation between tobacco smoking and dental caries: a systematic review and meta-analysis. *Tob Induc Dis*. 2019; 17: 34.

Jonsson R, Brokstad KA, Jonsson MV, Delaleu N, Skarstein K. Current concepts on Sjögren's syndrome - classification criteria and biomarkers. *Eur J Oral Sci*. 2018; 126 Suppl 1 (Suppl 1): 37-48.

Kalk WW, Vissink A, Spijkervet FK, Bootsma H, Kallenberg CG, Nieuw Amerongen AV. Sialometry and sialochemistry: diagnostic tools for Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis*. 2001; 60 (12): 1110-6.

Kapila YL. Oral health's inextricable connection to systemic health: special populations bring to bear multimodal relationships and factors connecting periodontal disease to systemic diseases and conditions. *Periodontol 2000*. 2021; 87 (1): 11-6.

Kassirer B. Smoking as a risk factor for gingival problems, periodontal problems and caries. *Univ Tor Dent J*. 1994; 7 (1): 6-10.

Katsiogiannis S, Wong DT. The proteomics of saliva in Sjögren's syndrome. *Rheum Dis Clin North Am*. 2016; 42 (3): 449-56.

Kishi K, Yasuda T, Ikehara Y, Sawazaki K, Sato W, Iida R. Human serum deoxyribonuclease I (DNase I) polymorphism: pattern similarities among isozymes from serum, urine, kidney, liver, and pancreas. *Am J Hum Genet*. 1990. 47 (1): 121-6.

Koh JH, Kwok SK, Lee J, Son CN, Kim JM, Kim HO, et al. Pain, xerostomia, and younger age are major determinants of fatigue in Korean patients with primary Sjögren's syndrome: a cohort study. *Scand J Rheumatol*. 2017; 46 (1): 49-55.

Kolak V, Pešić D, Melih I, Lalović M, Nikitović A, Jakovljević A. Epidemiological investigation of non-carious cervical lesions and possible etiological factors. *J Clin Exp Dent*. 2018; 10 (7): e648-56.

Könönen E, Gürsoy M, Holmstrup P, Gürsoy UK. Salivary cytokine levels in early gingival inflammation. *J Oral Microbiol.* 2017; 9 (1): 1364101.

Lavie F, Miceli-Richard C, Ittah M, Sellam J, Gottenberg JE, Mariette X. B-cell activating factor of the tumor necrosis factor family expression in blood monocytes and T cells from patients with primary Sjögren's syndrome. *Scand J Immunol.* 2008; 67 (2): 185-92.

Lavie F, Miceli-Richard C, Quillard J, Roux S, Leclerc P, Mariette X. Expression of BAFF (BLyS) in T cells infiltrating labial salivary glands from patients with Sjögren's syndrome. *J Pathol.* 2004; 202 (4): 496-502.

Li M, Qi Y, Wang G, Bu S, Chen M, Yu J, et al. Proteomic profiling of saliva reveals association of complement system with primary Sjögren's syndrome. *Immun Inflamm Dis.* 2021; 9 (4): 1724-39.

Liao TH. Deoxyribonuclease I and its clinical applications. *J Formos Med Assoc.* 1997; 96 (7): 481-7.

Loo JA, Yan W, Ramachandran P, Wong DT. Comparative human salivary and plasma proteomes. *J Dent Res.* 2010; 89 (10): 1016-23.

Lopes AG, Ju X, Jamieson L, Mialhe FL. Oral health-related quality of life among Brazilian adults with mental disorders. *Eur J Oral Sci.* 2021; 129 (3): e12774.

López-Pintor RM, Fernández Castro M, Hernández G. Oral involvement in patients with primary Sjögren's syndrome. Multidisciplinary care by dentists and rheumatologists. *Reumatol Clin.* 2015; 11 (6): 387-94.

Lugonja B, Yeo L, Milward MR, Smith D, Dietrich T, Chapple IL, et al. Periodontitis prevalence and serum antibody reactivity to periodontal bacteria in primary Sjögren's syndrome: a pilot study. *J Clin Periodontol.* 2016; 43 (1): 26-33.

Luong A, Tawfik AN, Islamoglu H, Gobriel HS, Ali N, Ansari P, et al. Periodontitis and diabetes mellitus co-morbidity: a molecular dialogue. *J Oral Biosci.* 2021; 63 (4): 360-9.

Maarse F, Jager DHJ, Alterch S, Korfage A, Forouzanfar T, Vissink A, et al. Sjögren's syndrome is not a risk factor for periodontal disease: a systematic review. *Clin Exp Rheumatol.* 2019; 37 Suppl 118 (3): 225-33.

Mariette X, Criswell LA. Primary Sjögren's syndrome. *N Engl J Med.* 2018; 378 (10): 931-39.

Mariette X, Gozlan J, Clerc D, Bisson M, Morinet F. Detection of Epstein-Barr virus DNA by in situ hybridization and polymerase chain reaction in salivary gland biopsy specimens from patients with Sjögren`s syndrome. *Am J Med.* 1991; 90 (3): 286-94.

Marques Filho JS, Gobara J Jr, da Silva Salomao GV, Sumita LM, Shibli JA, Viana RG, et al. Cytokine levels and human Herpesviruses in saliva from clinical periodontal healthy subjects with peri-implantitis: a case-control study. *Mediators Inflamm.* 2018; 2018: 6020625.

Mavragani CP. Mechanisms and new strategies for primary Sjögren's syndrome. *Annu Rev Med.* 2017; 68: 331-43.

McCoy SS, Bartels CM, Saldanha IJ, Bunya VY, Akpek EK, Makara MA, et al. National Sjögren's Foundation Survey: burden of oral and systemic involvement on quality of life. *J Rheumatol.* 2021; 48 (7): 1029-36.

Meneghim Mde C, Kozlowski FC, Pereira AC, Ambrosano GM, Meneghim ZM. Classificação socioeconômica e sua discussão em relação à prevalência de cárie e fluorose dentária [A socioeconomic classification and the discussion related to prevalence of dental caries and dental fluorosis]. *Cien Saude Colet.* 2007; 12 (2): 523-9.

Nadano D, Yasuda T, Kishi K. Measurement of deoxyribonuclease I activity in human tissues and body fluids by a single radial enzyme-diffusion method. *Clin Chem*. 1993; 39 (3): 448-52.

Nair JJ, Singh TP. Sjogren's syndrome: review of the aetiology, pathophysiology & potential therapeutic interventions. *J Clin Exp Dent*. 2017; 9 (4): e584-9.

Nakamura-Kiyama M, Ono K, Masuda W, Hitomi S, Matsuo K, Usui M, et al. Changes of salivary functions in experimental periodontitis model rats. *Arch Oral Biol*. 2014; 59 (2): 125-32.

Napirei M, Wulf S, Mannherz HG. Chromatin breakdown during necrosis by serum Dnase1 and the plasminogen system. *Arthritis Rheum*. 2004; 50 (6): 1873-83.

Nikolov NP, Illei GG. Pathogenesis of Sjögren's syndrome. *Curr Opin Rheumatol*. 2009 21 (5): 465-70.

Paganotti MA, Valim V, Serrano ÉV, Miyamoto ST, Giovelli RA, Santos MC. Validation and psychometric properties of the EULAR Sjögren's Syndrome Patient Reported Index (ESSPRI) into Brazilian Portuguese. *Rev Bras Reumatol*. 2015; 55 (5): 439-45.

Pasoto SG, Adriano de Oliveira Martins V, Bonfa E. Sjögren's syndrome and systemic lupus erythematosus: links and risks. *Open Access Rheumatol*. 2019; 11: 33-45.

Pasoto SG, Natalino RR, Chakkour HP, Viana V dos S, Bueno C, Leon EP, et al. EBV reactivation serological profile in primary Sjögren's syndrome: an underlying trigger of active articular involvement? *Rheumatol Int*. 2013; 33 (5): 1149-57.

Patel R, Shahane A. The epidemiology of Sjögren's syndrome. *Clin Epidemiol*. 2014; 6: 247-55.

Pedersen AM, Bardow A, Nauntofte B. Salivary changes and dental caries as potential oral markers of autoimmune salivary gland dysfunction in primary Sjogren's syndrome. *BMC Clin Pathol.* 2005; 5 (1): 4.

Pedersen AML, Sørensen CE, Proctor GB, Carpenter GH, Ekström J. Salivary secretion in health and disease. *J Oral Rehabil.* 2018; 45 (9): 730-46.

Penoni DC, Gomes Miranda MEDSN, Sader F, Vettore MV, Leão ATT. Factors associated with noncarious cervical lesions in different age ranges: a cross-sectional study. *Eur J Dent.* 2021; 15 (2): 325-31.

Perrot S, Calvez V, Escande JP, Dupin N, Marcelin AG. Prevalences of herpesviruses DNA sequences in salivary gland biopsies from primary and secondary Sjögren's syndrome using degenerated consensus PCR primers. *J Clin Virol.* 2003; 28 (2): 165-8.

Qin B, Wang J, Yang Z, Yang M, Ma N, Huang F, et al. Epidemiology of primary Sjögren's syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Ann Rheum Dis.* 2015; 74 (11): 1983-9.

Ramos-Casals M, Brito-Zerón P, Bombardieri S, Bootsma H, De Vita S, Dörner T, et al. EULAR recommendations for the management of Sjögren's syndrome with topical and systemic therapies. *Ann Rheum Dis.* 2020 ;79 (1): 3-18.

Rosas J, Sánchez-Piedra C, Fernández-Castro M, Andreu JL, Martínez-Taboada V, Olivé A, et al. ESSDAI activity index of the SJÖGRENSER cohort: analysis and comparison with other European cohorts. *Rheumatol Int.* 2019; 39 (6): 991-9.

Routsias JG, Tzioufas AG. Sjögren's syndrome - study of autoantigens and autoantibodies. *Clinic Rev Allerg Immunol.* 2007; 32 (3): 238-51.

Sánchez-Guerrero J, Pérez-Dosal MR, Cárdenas-Velázquez F, Pérez-Reguera A, Celis-Aguilar E, Soto-Rojas AE, et al. Prevalence of Sjögren's syndrome in

ambulatory patients according to the American-European Consensus Group Criteria. *Rheumatology*. 2005; 44 (2): 235-40.

Scardina GA, Ruggieri A, Messina P. Periodontal disease and Sjogren syndrome: a possible correlation? *Angiology*. 2010; 61 (3): 289-93.

Schuurhuis JM, Stokman MA, Witjes MJ, Dijkstra PU, Vissink A, Spijkervet FK. Evidence supporting pre-radiation elimination of oral foci of infection in head and neck cancer patients to prevent oral sequelae. A systematic review. *Oral Oncol*. 2015; 51 (3): 212-20.

Seror R, Bootsma H, Saraux A, Bowman SJ, Theander E, Brun JG, et al. Defining disease activity states and clinically meaningful improvement in primary Sjögren's syndrome with EULAR primary Sjögren's syndrome disease activity (ESSDAI) and patient-reported indexes (ESSPRI). *Ann Rheum Dis*. 2016; 75 (2): 382-9.

Seror R, Ravaud P, Bowman SJ, Baron G, Tzioufas A, Theander E, et al. EULAR Sjogren's syndrome disease activity index: development of a consensus systemic disease activity index for primary Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis*. 2010; 69 (6): 1103-9.

Seror R, Ravaud P, Mariette X, Bootsma H, Theander E, Hansen A, et al. EULAR Sjogren's Syndrome Patient Reported Index (ESSPRI): development of a consensus patient index for primary Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis*. 2011; 70 (6): 968-72.

Serrano EV, Valim V, Miyamoto ST, Giovelli RA, Paganotti MA, Cadê NV. Transcultural adaptation of the "EULAR Sjögren's Syndrome Disease Activity Index (ESSDAI)" into Brazilian Portuguese. *Rev Bras Reumatol*. 2013; 53 (6): 483-93.

Shen L, Suresh L. Autoantibodies, detection methods and panels for diagnosis of Sjögren's syndrome. *Clin Immunol*. 2017; 182: 24-9.

Shiboski CH, Shiboski SC, Seror R, Criswell LA, Labetoulle M, Lietman TM, 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. *Ann Rheum Dis.* 2017; 76 (1): 9-16.

Shimazaki Y, Fu B, Yonemoto K, Akifusa S, Shibata Y, Takeshita T, et al. Stimulated salivary flow rate and oral health status. *J Oral Sci.* 2017; 59 (1): 55-62.

Shin HD, Park BL, Kim LH, Lee HS, Kim TY, Bae SC. Common DNase I polymorphism associated with autoantibody production among systemic lupus erythematosus patients. *Hum Mol Genet.* 2004; 13 (20): 2343-50.

Sonawane S, Khanolkar V, Namavari A, Chaudhary S, Gandhi S, Tibrewal S, et al. Ocular surface extracellular DNA and nuclease activity imbalance: a new paradigm for inflammation in dry eye disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2017; 58 (13): 8253-63.

Spijkervet FKL, Schuurhuis JM, Stokman MA, Witjes MJH, Vissink A. Should oral foci of infection be removed before the onset of radiotherapy or chemotherapy? *Oral Dis.* 2021; 27 (1): 7-13.

Thomson WM, Chalmers JM, Spencer AJ, Williams SM. The Xerostomia Inventory: a multi-item approach to measuring dry mouth. *Community Dent Health.* 1999; 16 (1): 12-7.

Thomson WM. Measuring change in dry-mouth symptoms over time using the Xerostomia Inventory. *Gerodontology.* 2007; 24 (1): 30-5.

Tibrewal S, Sarkar J, Jassim SH, Gandhi S, Sonawane S, Chaudhary S, et al. Tear fluid extracellular DNA: diagnostic and therapeutic implications in dry eye disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013; 54 (13): 8051-61.

Tomasik M. Analiza czynników etiologicznych ubytków przyszyjkowych niepróchnicowego pochodzenia [Analysis of etiological factors involved in noncarious cervical lesions]. *Ann Acad Med Stetin.* 2006; 52 (3): 125-36.

Tseng CC, Wolff LF, Rhodus N, Aeppli DM. The periodontal status of patients with Sjögren's syndrome. *J Clin Periodontol*. 1990; 17 (5): 329-30.

Tseng CC. Periodontal status of patients with Sjögren's syndrome: a cross-sectional study. *J Formos Med Assoc*. 1991; 90 (1): 109-11.

Vallabhan CG, Sivarajan S, Shivkumar AD, Narayanan V, Vijayakumar S, Indhuja RS. Assessment of salivary flow rate in patients with chronic periodontitis. *J Pharm Bioallied Sci*. 2020; 12 (Suppl 1): S308-12.

Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, 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*. 2002; 61 (6): 554-8.

Vivino FB, Bunya VY, Massaro-Giordano G, Johr CR, Giattino SL, Schorpion A, et al. Sjogren's syndrome: an update on disease pathogenesis, clinical manifestations and treatment. *Clin Immunol*. 2019; 203: 81-121.

Wallport M.J. DNase and defective disposal of cellular debris. *Nat Gene*. 2000; 25 (2): 135-6.

Ware JE, Sherbourne CD. The MOS 36-item Short-Form Health Survey (SF-36) I. Conceptual framework and item selection. *Med Care*. 1992; 30 (6): 473-83.

Watt RG, Daly B, Allison P, Macpherson LMD, Venturelli R, Listl S, et al. Ending the neglect of global oral health: time for radical action. *Lancet*. 2019; 394 (10194): 261-72.

Wiebe CB, Putnins EE. The periodontal disease classification system of the American Academy of Periodontology - an update. *J Can Dent Assoc*. 2000; 66 (11): 594-9.

Wu AJ. Optimizing dry mouth treatment for individuals with Sjögren's syndrome. *Rheum Dis Clin North Am*. 2008; 34 (4): 1001-10, x.

Wu SY, Wu CY, Chen MH, Huang HY, Chen YH, Tsao YP, et al. Periodontal conditions in patients with Sjögren's syndrome: a meta-analysis. *J Dent Sci.* 2021; 16 (4): 1222-32.

Yasutomo K, Horiuchi T, Kagami S, Tsukamoto H, Hashimura C, Urushihara M, et al. Mutation of DNASE1 in people with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet.* 2001; 28 (4): 313-4.

## ANEXOS

## ANEXO A - PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

## DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO DA RELEVÂNCIA DOS NÍVEIS SANGUÍNEOS DE DROGAS UTILIZADAS EM DOENÇAS AUTOIMUNES REUMATOLÓGICAS NO ACOMPANHAMENTO DA SEGURANÇA/EFICÁCIA DA TERAPIA, ATIVIDADE DE DOENÇA E ADERÊNCIA À TERAPÊUTICA

**Pesquisador:** ELOISA SILVA DUTRA DE OLIVEIRA BONFA

**Área Temática:**

**Versão:** 6

**CAAE:** 39705014.6.0000.0068

**Instituição Proponente:** Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

**Patrocinador Principal:** FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO  
Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

## DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.676.161

## Apresentação do Projeto:

Trata-se de emenda onde os pesquisadores solicitam a inclusão do subprojeto "ANÁLISE DO PERFIL IMUNE DA SALIVA E SORO DOS PACIENTES COM SÍNDROME DE SJÖGREN PRIMÁRIA", o projeto será tese de doutorado do aluno Victor Adriano Oliveira Martins e não modifica o desenho do estudo nem o TCLE previamente aprovado e é pertinente ao projeto inicial.

## Objetivo da Pesquisa:

Os pesquisadores vão avaliar o papel das dosagens dos níveis séricos de fármacos no seguimento de pacientes com doenças reumáticas autoimunes. No subprojeto solicitado será avaliada a presença de anticorpos dirigidos à DNase I na saliva e no soro de pacientes com SSp e sua possível capacidade de inibição da enzima. O objetivo deste estudo está desenhado de forma clara e é pertinente a sua inserção no projeto aprovado "AVALIAÇÃO DA RELEVÂNCIA DOS NÍVEIS SANGUÍNEOS DE DROGAS UTILIZADAS EM DOENÇAS AUTOIMUNES REUMATOLÓGICAS NO ACOMPANHAMENTO DA SEGURANÇA/EFICÁCIA DA TERAPIA, ATIVIDADE DE DOENÇA E ADERÊNCIA À TERAPÊUTICA" como subprojeto.

## Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O protocolo não apresenta riscos para o sujeito da pesquisa.

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar  
**Bairro:** Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



USP - HOSPITAL DAS  
CLÍNICAS DA FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE



Continuação do Parecer: 2.675.161

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Inclusão de subprojeto adequada.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O TCLE não sofreu alterações com a emenda.

**Recomendações:**

Sugerimos sua aprovação.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Aprovado

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_113055_9_E5.pdf	07/05/2018 16:40:24		Aceito
Outros	Carta_Justificativa_02_05_18.pdf	07/05/2018 16:37:30	ELOISA SILVA DUTRA DE OLIVEIRA BONFA	Aceito
Outros	Formulario_Emenda_02_05_18.pdf	07/05/2018 16:36:45	ELOISA SILVA DUTRA DE OLIVEIRA BONFA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_anti_DNAseI_na_SSp_saliva_02_05_18.docx	07/05/2018 16:35:43	ELOISA SILVA DUTRA DE OLIVEIRA BONFA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Saliva_02_05_18.docx	07/05/2018 16:34:43	ELOISA SILVA DUTRA DE OLIVEIRA BONFA	Aceito
Folha de Rosto	FolhaRostoAssinada_2a_emenda.pdf	27/01/2017 17:30:13	ELOISA SILVA DUTRA DE OLIVEIRA BONFA	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar  
 Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010  
 UF: SP Município: SAO PAULO  
 Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br



USP - HOSPITAL DAS  
CLÍNICAS DA FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE



Continuação do Parecer: 2.676.161

SAO PAULO, 25 de Maio de 2018

---

**Assinado por:**  
**Joel Faintuch**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Rua Ovidio Pires de Campos, 225 5º andar  
**Bairro:** Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

## ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

### HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

#### MODELO DE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

---

#### DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: .....
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: ..... SEXO: M  F
- DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
- ENDEREÇO: ..... Nº: ..... APTO: .....
- BAIRRO: ..... CIDADE: .....
- CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....) .....
2. RESPONSÁVEL LEGAL: .....
- NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.): .....
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: ..... SEXO: M  F
- DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
- ENDEREÇO: ..... Nº: ..... APTO: .....
- BAIRRO: ..... CIDADE: .....
- CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....) .....
- 

#### DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:
- PROJETO TEMÁTICO: AVALIAÇÃO DA RELEVÂNCIA DOS NÍVEIS SANGUÍNEOS DE DROGAS UTILIZADAS EM DOENÇAS AUTOIMUNES REUMATOLÓGICAS NO ACOMPANHAMENTO DA SEGURANÇA/EFICÁCIA DA TERAPIA, ATIVIDADE DE DOENÇA E ADERÊNCIA À TERAPÊUTICA.
- SUBPROJETO: ANÁLISE DO PERFIL IMUNE DA SALIVA E SORO DOS PACIENTES COM SÍNDROME DE SJÖGREN PRIMÁRIA.
2. PESQUISADOR PRINCIPAL:
- ELOISA BONFÁ  
Cargo/ Função: Profa. Titular da Disciplina de Reumatologia da Faculdade de Medicina do HC-FMUSP.  
Inscrição no Conselho Regional Nº: 42.708  
Unidade do HC-FMUSP: Disciplina de Reumatologia do HCFMUSP
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
- RISCO MÍNIMO  RISCO MÉDIO
- RISCO BAIXO  RISCO MAIOR
4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 36 meses

**INTRODUÇÃO:** A Sra./Sr. está sendo convidada(o) a participar de uma pesquisa sobre a Síndrome de Sjögren Primária (SSp). Em seguida, explicamos os objetivos desta pesquisa, como a mesma será realizada e o papel que a Sra./Sr. terá, se desejar participar da mesma. A Sra. não é obrigada a participar deste estudo e, se não desejar participar, o seu seguimento médico no HCFMUSP continuará a ocorrer da mesma forma, sem qualquer prejuízo aos seus direitos. Os pesquisadores responderão qualquer pergunta sobre a pesquisa e sobre esta declaração de consentimento. Por favor, sinta-se à vontade para ler esta declaração e se sinta livre para fazer qualquer pergunta.

**PROPÓSITO DO ESTUDO:** A SSp é uma doença crônica que afeta principalmente as glândulas produtoras de lágrimas e saliva, causando os sintomas de olho e boca secos. Mas, outros órgãos podem ser acometidos, como a pele, juntas, pulmões, rins e sistema nervoso. As causas desta doença ainda são desconhecidas. O organismo do paciente produz autoanticorpos, que são substâncias que circulam no sangue e "atacam" as células do próprio doente, afetando seus órgãos. Em nossa pesquisa, desejamos estudar a presença dos autoanticorpos no sangue e na saliva dos pacientes com SSp. Além disso, desejamos avaliar a presença de periodontite (gengiva inflamada) nos portadores de SSp e tratar (se presente) sem cirurgia.

**CRITÉRIOS DE INCLUSÃO:** Participarão deste estudo pacientes do sexo feminino e masculino com SSp que desejem participar do mesmo. Participarão também voluntários saudáveis e voluntários portadores de Artrite Reumatoide (sem olho seco ou boca seca) que serão os "controles" (ou seja, iremos comparar os resultados dos exames dos pacientes com os resultados dos pacientes saudáveis e com Artrite). Para que a Sra./Sr. possa participar desta pesquisa, deverá assinar o presente consentimento informado.

**CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO:** A Sra./Sr. não poderá participar deste estudo, se não puder entender os procedimentos relacionados ao mesmo, ou se estiver em uso de medicamentos que secam a boca (principalmente antidepressivos e anti-histamínicos), bem como pacientes com história de radioterapia de cabeça e pescoço, tabagismo atual, gravidez, lactação e história de tratamento periodontal há pelo menos 6 meses antes da inclusão no estudo.

**PROCEDIMENTOS:** Sua participação consistirá em permitir: a leitura do seu prontuário médico, realização de uma entrevista, exame físico e coleta (duas vezes durante o estudo) de 30 mililitros de sangue da veia do braço. Este material será utilizado, para analisar vários autoanticorpos que podem estar presentes no sangue dos pacientes com SSp e que podem "atacar" vários órgãos. Também será feito um exame para determinar a inflamação da sua gengiva, além de uma coleta de sua saliva (aonde estes autoanticorpos podem estar presentes). Caso sua gengiva esteja inflamada ela será tratada, além disso, será disponibilizado tratamento para cáries e extrações dentárias se o dente estiver muito "estragado". Não será realizado qualquer tipo de tratamento com próteses, implantes, tratamento de canal e nenhum outro tipo de tratamento estético (como clareamento, etc.). Durante a pesquisa, a Sra./Sr. Fará três visitas ao dentista no Instituto Central do HCFMUSP.

**RISCOS E DESCONFORTOS:** Podem ocorrer desconfortos produzidos pela extração de sangue, como formação de um hematoma ("coágulo no local da extração"). O tratamento da doença periodontal não é dolorido e, se necessário, será feita anestesia local. Serão tomadas precauções, para evitar estes desconfortos.

**PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA/ SAÍDA DO ESTUDO:** A Sra./Sr. pode decidir se deseja participar ou não da pesquisa, ou seja, sua participação é voluntária. Você é livre para participar, ou para deixar o estudo a qualquer momento, sem que exista qualquer prejuízo ao seu seguimento médico, nem perda de seus direitos. Se você decidir participar, deve assinar este consentimento informado e guardar uma via. A outra via será guardada pelo médico pesquisador.

**BENEFÍCIOS:** A Sra./ Sr. não obterá nenhum benefício pessoal além das três consultas com dentista e do tratamento da gengiva inflamada. Se a Sra./Sr. desejar, os resultados dos exames lhe serão comunicados e explicados. Mas, estes resultados poderão servir mais à sociedade, uma vez que sejam analisados em conjunto os resultados de todos pacientes incluídos na pesquisa, contribuindo, assim, para um maior conhecimento sobre a SSp.

**CONFIDENCIALIDADE:** A confidencialidade é garantida, com exceção de que um Comitê de Ética, representantes do Ministério da Saúde, ou outras pessoas autorizadas pela lei julguem a necessidade de rever a lista de dados elaborada para este estudo, que lhe identifica por seu nome, como a declaração de consentimento assinada pela Sra./Sr., que serão guardados pelo médico

pesquisador. Os resultados deste estudo poderão ser apresentados em congressos ou em publicações científicas, mas sua identidade não será revelada nestas apresentações.

**INTERESSES COMERCIAIS:** O estudo será gratuito. Devido ao fato de que não existem interesses econômicos nem financeiros da instituição, não se espera que a Sra./Sr., nem os pesquisadores recebam pagamento algum por permitir participar da pesquisa.

**MAIS INFORMAÇÕES:** Esse consentimento foi aprovado pelo Comitê de Ética, Ensino e Pesquisa dessa instituição. Se você tiver perguntas adicionais referentes à pesquisa ou quaisquer outras dúvidas ou sintomas, por favor, entre em contato com:

Profa. Dra. Eloisa Bonfá ou Dra. Sandra Gofinet Pasoto, ou Dr. Victor Adriano de Oliveira Martins nos endereços e telefones abaixo:

- Endereço: Faculdade de Medicina da USP  
Av. Dr. Amaldo, N° 455 – 3º andar, sala 3150. Cerqueira César, São Paulo/SP. CEP: 01246-903
- Telefones: (11) 3061-7492 / (11) 3061-7490 (Secretaria da Disciplina de Reumatologia, Faculdade de Medicina da USP)  
(11) 2661-6105 (Ambulatório do Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP)
- Email: [reumato@usp.br](mailto:reumato@usp.br)
- Dr Victor : [victor.adriano.martins@usp.br](mailto:victor.adriano.martins@usp.br)

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética dessa pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (C.E.P.) no seguinte endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar. Tel: (11) 2661-7585, 2661-1548, 2661-1549. E-mail: [cappesq.adm@hc.fm.usp.br](mailto:cappesq.adm@hc.fm.usp.br).

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "ANÁLISE DO PERFIL IMUNE DA SALIVA E SORO DOS PACIENTES COM SÍNDROME DE SJÖGREN PRIMÁRIA". Eu discuti com a Profa. Dra. Eloisa Bonfá sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar desse estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento nesse Serviço.

-----  
Assinatura do paciente/ representante legal                      Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

-----  
Assinatura da testemunha    Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

*(Somente para o responsável do projeto)*

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido desse paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

-----  
Assinatura do responsável pelo estudo                              Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

## ANEXO C - EULAR SJÖGREN'S SYNDROME DISEASE ACTIVITY INDEX (ESSDAI)

<b>Domínio Constitucional [não avaliar sintomas não relacionados à doença, como febre de origem infecciosa, perda voluntária de peso.]</b>		
Nenhuma Atividade	Ausência dos seguintes sintomas	0
Baixa Atividade	Febre moderada ou intermitente (37,5 - 38,5°C) / suores noturnos	1
Moderada Atividade	Perda de peso involuntária de 5 a 10% do peso corporal	2

<b>Domínio de Linfadenopatia</b>		
Nenhuma Atividade	Ausência das seguintes características	0
Baixa Atividade	Linfadenomegalia $\geq$ 1 cm em qualquer região ou $\geq$ 2 cm na região inguinal	1
Moderada Atividade	Linfadenomegalia $\geq$ 2 cm em qualquer região ou $\geq$ 3 cm em região inguinal ou esplenomegalia (cl clinicamente palpável ou avaliada por exame de imagem)	2
Alta Atividade	Doença proliferativa maligna das células B recente	3

<b>Domínio Glandular [não avaliar aumento do volume glandular não relacionado à doença, tais como litíase ou infecção.]</b>		
Nenhuma Atividade	Ausência de aumento glandular	0
Baixa Atividade	Pequeno aumento glandular com: parótida aumentada ( $\leq$ 3 cm) ou aumento discreto submandibular ou lacrimal <sup>1</sup>	1
Moderada Atividade	Aumento glandular maior com: parótida aumentada ( $>$ 3 cm) ou aumento importante submandibular ou lacrimal <sup>1</sup>	2

<sup>1</sup> A distinção entre aumento discreto ou importante do volume glandular submandibular ou lacrimal fica a critério médico.

<b>Domínio Articular [não avaliar envolvimento articular não relacionado à doença, como a osteoartrite.]</b>		
Nenhuma Atividade	Ausência de envolvimento articular ativo no momento	0
Baixa Atividade	Artralgias nas mãos, punhos, tornozelos e pés acompanhados por rigidez matinal (> 30 min)	1
Moderada Atividade	1 a 5 sinovites dentre as 28 <sup>2</sup>	2
Alta Atividade	≥ 6 sinovites dentre as 28 <sup>2</sup>	3

<sup>2</sup> As 28 articulações incluídas no cálculo do DAS28 (*Disease Activity Score 28*) são ombros, cotovelos, punhos, metacarpofalângianas, interfalângianas proximais e joelhos.

<b>Domínio Cutâneo [avaliar como “Nenhuma atividade” lesões antigas e estáveis mais relacionadas ao dano (sequela) do que à atividade da doença ou envolvimento cutâneo não relacionado à doença.]</b>		
Nenhuma Atividade	Ausência de envolvimento cutâneo ativo no momento	0
Baixa Atividade	Eritema multiforme	1
Moderada Atividade	Vasculite cutânea limitada, incluindo vasculite urticariforme <sup>3</sup> , ou púrpura limitada aos pés e tornozelos ou lúpus cutâneo subagudo	2
Alta Atividade	Vasculite cutânea difusa, incluindo vasculite urticariforme <sup>3</sup> , ou púrpura difusa ou úlceras relacionadas à vasculite	3

<sup>3</sup> Vasculite cutânea limitada envolve < 18% da área de superfície corporal; vasculite cutânea difusa envolve > 18% da área de superfície corporal. Área de superfície corporal (ASC) é definida utilizando a regra dos nove (usado para avaliar a extensão de queimaduras): palma (excluindo os dedos) = 1% ASC; cada membro inferior = 18% ASC; cada membro superior = 9% ACS; tronco (frontal) = 18% ASC; tronco (dorsal) = 18% ASC.

<b>Domínio Respiratório [Avaliar como “Nenhuma atividade” lesões antigas e estáveis mais relacionadas ao dano (sequela) do que à atividade da doença ou envolvimento respiratório não relacionado à doença (ex. cigarro).]</b>		
Nenhuma Atividade	Ausência de envolvimento pulmonar ativo no momento	0
Baixa Atividade	Tosse persistente ou envolvimento brônquico sem nenhuma alteração ao raio X Ou evidência de doença pulmonar intersticial ao RX simples ou TCAR, com: nenhuma dispneia prova de função pulmonar normal	1

Moderada Atividade	Envolvimento pulmonar moderadamente ativo, tal como doença pulmonar intersticial diagnosticada por TCAR com: dispneia aos grandes esforços (NHYA II) ou prova de função pulmonar alterada dentro dos seguintes parâmetros: 70% > DLCO ≥ 40% e/ou 80% > CVF ≥ 60%	2
Alta Atividade	Envolvimento pulmonar altamente ativo como doença pulmonar intersticial diagnosticada por TCAR com: dispneia aos pequenos esforços ou ao repouso (NHYA III, IV) ou prova de função pulmonar alterada: DLCO < 40% e/ou CVF < 60%	3

Para o diagnóstico da doença pulmonar intersticial, a TCAR (tomografia computadorizada de alta resolução) ou radiografia simples são necessárias e devem ter sido realizadas nos últimos dois anos.

NYHA (classificação funcional da *New York Heart Association*); DLCO (prova de difusão de dióxido de carbono); CVF (capacidade vital forçada).

<b>Domínio Renal [Avaliar como “Nenhuma atividade” lesões antigas e estáveis mais relacionadas ao dano (sequela) do que à atividade da doença e envolvimento renal não relacionado à doença. Se a biópsia for feita, classificar a atividade baseada primeiramente nas características histológicas.]</b>		
Nenhuma Atividade	Ausência de envolvimento renal ativo no momento: - proteinúria < 0,5 g/dL, nenhuma hematuria, nenhuma leucocitúria, nenhuma acidose, proteinúria estável de longa duração devido ao dano/ sequela	0
Baixa Atividade	Evidência de envolvimento específico da atividade renal limitada a: acidose tubular sem insuficiência renal envolvimento glomerular: - com proteinúria (entre 0,5 e 1 g/dL) - sem hematuria ou insuficiência renal (TGF ≥ 60 mL/min)	1
Moderada Atividade	Moderada atividade renal: acidose tubular com insuficiência renal (TGF < 60 mL/min) envolvimento glomerular - com proteinúria entre 1 e 1,5 g/dL - sem hematuria ou insuficiência renal (TGF ≥ 60 mL/min) ou evidência histológica - glomerulonefrite - infiltração intersticial linfóide importante	2

Alta Atividade	Alta atividade renal: envolvimento glomerular - com proteinúria > 1,5 g/dL - ou hematúria - ou insuficiência renal (TGF < 60 mL/min) - ou evidência histológica de glomerulonefrite proliferativa crioglobulinemia relacionada ao envolvimento renal	3
----------------	--	---

TGF- taxa de filtração glomerular calculada com a fórmula MDRD (*Modification of Diet in Renal Disease*).

<b>Domínio Muscular [Não avaliar envolvimento muscular não relacionado à doença, tal como fraqueza devido a corticosteroides.]</b>		
Nenhuma Atividade	Ausência de envolvimento muscular ativo no momento	0
Baixa Atividade	Miosite levemente ativa diagnosticada pela EMG ou biópsia com: ausência de fraqueza e creatinoquinase alterada ( $N^* < CK \leq 2N$ )	1
Moderada Atividade	Miosite moderadamente ativa diagnosticada pela EMG ou biópsia com: fraqueza (déficit máximo de 4/5); ou creatinoquinase elevada ( $2N < CK \leq 4N$ )	2
Alta atividade	Miosite altamente ativa diagnosticada pela EMG ou biópsia com: fraqueza (déficit $\leq 3/5$ ) ou creatinoquinase elevada ( $> 4N$ )	3

\*N = normal (valor de referência); EMG = eletromiografia.

<b>Domínio do Sistema Nervoso Periférico [Avaliar como “Nenhuma atividade” lesões antigas e estáveis mais relacionadas ao dano (sequela) do que à atividade ou envolvimento do sistema nervoso periférico não relacionado à doença.]</b>		
Nenhuma Atividade	Ausência de envolvimento ativo do sistema nervoso periférico no momento	0
Baixa Atividade	Evidência de envolvimento ativo do sistema nervoso periférico, como: - Polineuropatia periférica axonal diagnosticada pelo ECN/ ENMG - Neuralgia do trigêmeo (V nervo craniano)	1

Moderada Atividade	Evidência de envolvimento moderadamente ativo do sistema nervoso periférico, como: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Neuropatia axonal motora e sensorial diagnosticada pelo ECN/ENMG, sem déficit motor</li> <li>- Neuropatia sensorial pura com a presença de vasculite crioglobulinêmica</li> <li>- Gangliopatia<sup>4</sup> com sintomas restritos à ataxia moderada</li> <li>- Polineuropatia inflamatória desmielinizante crônica (CIDP)<sup>5</sup> com deficiência funcional moderada (sem déficit motor ou ataxia)</li> <li>- Envolvimento do nervo craniano de origem periférica (exceto trigêmeo- V)</li> </ul>	2
Alta Atividade	Evidência de envolvimento altamente ativo do sistema nervoso periférico, como: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Neuropatia axonal motora e sensorial diagnosticada pela ECN/ENMG com déficit motor <math>\leq 3/5</math></li> <li>- Envolvimento do nervo periférico atribuído à vasculite (mononeurite múltipla)</li> <li>- Ataxia severa atribuída à ganglionopatia<sup>4</sup></li> <li>- Polineuropatia inflamatória desmielinizante crônica (CIDP)<sup>5</sup> com deficiência funcional severa: déficit motor <math>\leq 3/5</math> ou ataxia severa</li> </ul>	3

<sup>4</sup> Deficiência sensorial pura com ataxia e deficiência difusa ou abolição do potencial sensitivo no ECN (estudo da condução nervosa).

<sup>5</sup> Polirradiculoneuropatia com sintomas clínicos sugestivos (déficit sensitivomotor dos 4 membros, déficit motor proximal, arreflexia generalizada, sintomas sensoriais iniciais afetando membros superiores e/ou associado a envolvimento do nervo craniano), nível de proteína aumentado e/ou ECN anormal (latência distal motora prolongada, velocidade da condução nervosa reduzida, latência prolongada da onda F, bloqueio da condução e/ou dispersão temporal).

<b>Domínio do Sistema Nervoso Central [Avaliar como “Nenhuma atividade” lesões antigas e estáveis mais relacionadas ao dano (sequela) do que à atividade da doença ou envolvimento do sistema nervoso central não relacionado à doença.]</b>		
Nenhuma Atividade	Ausência de envolvimento do SNC ativo no momento	0
Moderada Atividade	Manifestações clínicas moderadamente ativas do SNC, como: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Envolvimento de nervo craniano de origem central</li> <li>- Neurite óptica</li> <li>- Síndrome semelhante à esclerose múltipla com sintomas restritos à deficiência sensorial pura ou deficiência cognitiva comprovada</li> </ul>	1

Alta Atividade	Manifestações clínicas altamente ativas do SNC, como: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Vasculite cerebral com acidente vascular cerebral ou ataque isquêmico transitório</li> <li>- Convulsões</li> <li>- Mielite transversa</li> <li>- Meningite linfocítica</li> <li>- Síndrome semelhante à esclerose múltipla com déficit motor</li> </ul>	2
----------------	--	---

**Domínio Hematológico [somente as citopenias autoimunes devem ser consideradas. Não avaliar citopenia que não esteja relacionada à doença, tal como deficiência de vitamina ou ferro, citopenia induzida por droga.]**

Nenhuma Atividade	Ausência de citopenia autoimune	0
Baixa Atividade	Citopenia de origem autoimune com: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Neutropenia<sup>6</sup> (1000 &lt; neutrófilos &lt; 1500/mm<sup>3</sup>)</li> <li>- ou anemia<sup>7</sup> (10 &lt; Hb &lt; 12 g/dL)</li> <li>- Ou trombocitopenia<sup>8</sup> (100.000 &lt; plaquetas &lt; 150.000/mm<sup>3</sup>)</li> <li>- Ou linfopenia (500 &lt; linfócitos &lt; 1000/mm<sup>3</sup>)</li> </ul>	1
Moderada Atividade	Citopenia de origem autoimune com: <ul style="list-style-type: none"> <li>- neutropenia<sup>6</sup> (500 ≤ neutrófilos ≤ 1000/mm<sup>3</sup>)</li> <li>- ou anemia<sup>7</sup> (8 ≤ Hb ≤ 10 g/dL)</li> <li>- ou trombocitopenia<sup>8</sup> (50.000 ≤ plaquetas ≤ 100.000/mm<sup>3</sup>)</li> <li>- ou linfopenia (≤ 500/mm<sup>3</sup>)</li> </ul>	2
Alta Atividade	Citopenia de origem autoimune com: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Neutropenia<sup>6</sup> (neutrófilos &lt; 500/mm<sup>3</sup>)</li> <li>- Ou anemia<sup>7</sup> (Hb &lt; 8 g/dL)</li> <li>- Ou trombocitopenia<sup>8</sup> (plaquetas &lt; 50.000/mm<sup>3</sup>)</li> </ul>	3

<sup>6</sup> Neutropenia sem nenhuma etiologia conhecida.

<sup>7</sup> Anemia com o teste de Coombs positivo e aumento na contagem de reticulócitos.

<sup>8</sup> Trombocitopenia de origem periférica com nenhuma outra etiologia encontrada, ou em caso de dificuldades para realização de identificação de autoanticorpos anti-plaquetas e/ou a presença de megacariócitos de aspirado de medula óssea e/ou anemia autoimune associada.

<b>Domínio Biológico</b>		
Nenhuma Atividade	Ausência de qualquer uma das seguintes alterações	0
Baixa Atividade	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pico clonal</li> <li>- Ou hipocomplementemia- C4 ou C3 baixos ou CH50</li> <li>- Ou hipergamaglobulinemia ou nível de IgG entre 16 e 20 g/L</li> </ul>	1
Moderada Atividade	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Presença de crioglobulinemia</li> <li>- Ou hipergamaglobulinemia ou nível alto de IgG &gt; 20 g/L</li> <li>- Ou início recente<sup>9</sup> de hipogamaglobulinemia ou diminuição recente de nível de IgG (&lt; 5 g/L)</li> </ul>	2

<sup>9</sup> Nos últimos 6 meses.

## ANEXO D - EULAR SJÖGREN'S SYNDROME REPORTED INDEX (ESSPRI)

Data: .../.../... Nome: ..... RG: .....

1) Quanto severa tem sido a sua secura durante as duas últimas semanas?

Sem secura	<input type="checkbox"/>	Maxima secura imaginável										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	

2) Quanto severa tem sido a sua fadiga durante as duas últimas semanas?

Sem fadiga	<input type="checkbox"/>	Maxima fadiga imaginável										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	

3) Quanto severa tem sido a sua dor (dores articulares ou musculares em seus braços ou pernas) durante as duas últimas semanas?

Sem dor	<input type="checkbox"/>	Maxima dor imaginável										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	

EULAR Sjögren's Syndrome Patient Reported Index - ESSPRI

Média de 3 escalas numéricas 0 - 10:

- Secura
- Fadiga
- Dor em membros

De preferência de autopreenchimento se o paciente conseguir.

## ANEXO E - INVENTÁRIO DE XEROSTOMIA

PERGUNTA	NUNCA	QUASE NUNCA	OCASIONALMENTE	COM RELATIVA FREQUÊNCIA	COM FREQUÊNCIA
Bebo um pouco de líquido para me ajudar a engolir os alimentos					
Sinto a boca seca durante as refeições					
Levanto-me de noite para beber					
Sinto a boca seca					
Tenho dificuldade em comer alimentos secos					
Chupo rebuçados ou pastilhas para a tosse para aliviar a secura da boca					
Tenho dificuldade em engolir certos alimentos					
Sinto a pele da cara seca					
Sinto os olhos secos					
Sinto os lábios secos					
Sinto o interior do nariz seco					

O questionário vai de 11 pontos à 55 pontos, sendo que quanto mais próximo deste último valor, pior a xerostomia.

## ANEXO F - PROTOCOLO CLÍNICO

## Protocolo Clínico – Síndrome de Sjögren e Anti-DNase na Saliva

Data: ...../...../.....

Nome: .....

RGHC: .....

Raça: (declarada) ( )branco ( ) negro ( )mulato ( )amarelo

Sexo: ( )M( )F

Idade: ..... anos / Data Nascimento: ...../...../..... / Profissão: .....

Fone: ...../...../.....

## DOENÇA

Diagnóstico: ..... anos / Tempo dos sintomas de síndrome seca: ..... anos / Sorologia hepatite: B .../ C .../ HIV ....

## Critérios:

<input type="checkbox"/> Sintoma ocular	Outros: .....
<input type="checkbox"/> Sintoma oral	.....
<input type="checkbox"/> Critério objetivo ocular	.....
<input type="checkbox"/> Critério objetivo oral	.....
<input type="checkbox"/> Histológico	Notas: .....
<input type="checkbox"/> Anti-Ro e/ou La	.....

## CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Uso de drogas xerogênicas (principalmente antidepressivos e anti-histamínicos)	( )SIM	( )NÃO
História de radioterapia de cabeça e pescoço	( )SIM	( )NÃO
Tabagismo atual	( )SIM	( )NÃO
Gravidez	( )SIM	( )NÃO
Lactação	( )SIM	( )NÃO
História de tratamento periodontal há pelo menos 6 meses antes da inclusão	( )SIM	( )NÃO
Não pode compreender o estudo	( )SIM	( )NÃO
Síndrome de Sjögren secundária	( )SIM	( )NÃO
Hepatites B/C	( )SIM	( )NÃO
HIV	( )SIM	( )NÃO
Sarcoidose	( )SIM	( )NÃO

## ASSINATURA DO TERMO DE CONSENTIMENTO

( )SIM ( )NÃO

(\*) DADOS OBTIDOS A PARTIR DA REVISÃO DOS PRONTUÁRIOS MÉDICOS.

SINAIS E SINTOMAS	PRÉVIOS		ATUAIS (até 3 meses)		OBSERVAÇÕES
	SIM	NÃO	SIM	NÃO	
<b>Síndrome Sicca</b> Olho seco > 3 meses					Teste de Schirmer*: ..... Rosa bengala*: ..... Verde lisamina*: ..... Fluoresceína*: .....
Úlcera de córnea					
Sensação de corpo estranho					
Necessidade de lágrima artificial					
Boca seca > 3 meses					Fluxo salivar*: ..... Sialografia*: ..... Cintilografia*: .....
Aumento de glândulas salivares					Glândula: ..... Tamanho à palpação: ..... cm Biópsia*: .....
Necessidade de ingestão de líquido para alimentação					
<b>Sintomas Constitucionais</b>					
Febre					T= .....°C (sem causas infecciosas)
Perda ponderal					% perda= ..... / Δt= ..... meses
Fadiga					
<b>Linfonomegalias</b>					Tamanho à palpação: ..... cm Cadeias acometida: .....  Tamanho à palpação: ..... cm Cadeias acometida: .....  Tamanho à palpação: ..... cm Cadeias acometida: .....
<b>Músculo-Esquelético</b>					
Artrites (edema)					Vide esquema das articulações
Artralgias					Vide esquema das articulações
Rigidez matinal ≥ 30 min					
Deformidades					.....
Mialgias difusas					
Fraqueza muscular					Grau: ..... / CPK*: ..... / ..... / .....
<b>Cutâneo</b>					
Vasculite					.....
Fenômeno de Raynaud					
Livedo reticular					
Outros					.....
<b>Respiratório</b>					
Tosse (≥ 4 semanas)					(excluídas causas infecciosas)
Dispneia					Esforços: ( )Grandes ( )Médios ( )Pequenos ( )Repouso ( )Decúbito Tempo: .....

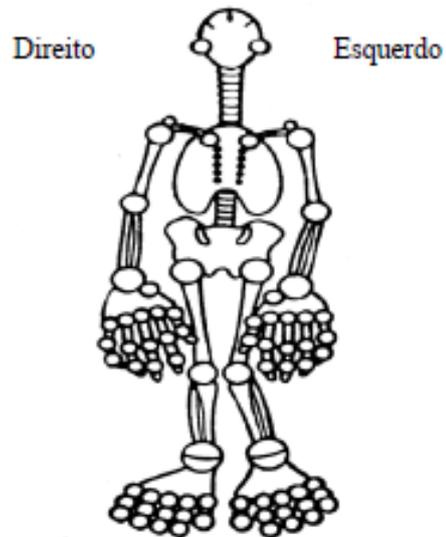
TC tórax cortes finos* ____/____/____					.....
Prova função pulmonar* ____/____/____					.....
Outros					.....
<b>Cardiovascular</b>					
Hipertensão arterial sistêmica					PA= ..... X .....
Antecedente de infarto					
Acidente vascular cerebral					
Outros					.....
<b>Renal</b>					
Litíase renal					
Proteinúria* ____/____/____					
Hematuria* ____/____/____					
Cilindrúria* ____/____/____					
Acidose tubular renal					pH*: ..... (____/____/____)
↓ da função renal*					U e Cr*: ..... mg/dL (____/____/____)
Outros					.....
<b>Sistema Nervoso</b>					
Parestesias					.....
Paresias					.....
ENMG* ____/____/____					.....
TC ou RNM de crânio* ____/____/____					.....
Acometimento de par craniano					.....
Neurite óptica					.....
Esclerose múltipla símile					.....
Mielite transversa					.....
Outros					.....
<b>Gastrointestinal</b>					
Cirrose biliar primária					
Hepatite autoimune					
Outros					.....
<b>Hematológico</b>					
<b>Nota:</b> citopenias sem drogas					
Anemia* ____/____/____					Hb*: ..... g/dL
Leucopenia* ____/____/____					Leucócitos*: ...../mm <sup>3</sup>
Linfopenia* ____/____/____					Linfócitos*: ...../mm <sup>3</sup>
Plaquetopenia* ____/____/____					Plaquetas*: ...../mm <sup>3</sup>
Linfoma					.....
Outros					.....
<b>Endocrinológico</b>					
Diabetes mellitus					Peso: ..... kg
Hipotireoidismo					Altura: ..... m
Hipertireoidismo					IMC: .....
Dislipidemia					.....
Menopausa					Idade: ..... anos
Outros					.....

<b>Tratamentos</b>					
Prednisona					Dose atual: ..... mg/dia Uso há: ..... anos ( / ) meses ( )
Pulso de corticoide					
Cloroquina (difosfato ou hidroxí)					
Methotrexate					Dose atual: ..... mg/semana Uso há: ..... anos ( / ) meses ( )
Lefunomide					Dose atual: ..... mg/dia Uso há: ..... anos ( / ) meses ( )
Azatioprina					Dose atual: ..... mg/dia Uso há: ..... anos ( / ) meses ( )
Micofenolato mofetil					Dose atual: ..... mg/dia Uso há: ..... anos ( / ) meses ( )
Ciclofosfamida					Dose atual: ..... mg/dia ..... g-EV/mês Uso há: ..... anos ( / ) meses ( )
Pilocarpina					..... Uso há: ..... anos ( / ) meses ( )
N-acetilcisteína					..... Uso há: ..... anos ( / ) meses ( )
Óleo de linhaça					..... Uso há: ..... anos ( / ) meses ( )
Antidepressivos					..... Uso há: ..... anos ( / ) meses ( )
Saliva artificial					
Colírio lubrificante					
Outros: .....					.....
.....					.....
.....					.....
.....					.....
Anticoncepcionais					.....
Usou anticoncepcionais nos últimos 6 meses?					Tipo: .....
Terapia de reposição hormonal					.....
Tabagismo					Cigarros/dia: ..... Parou há: ..... anos
Etilismo					

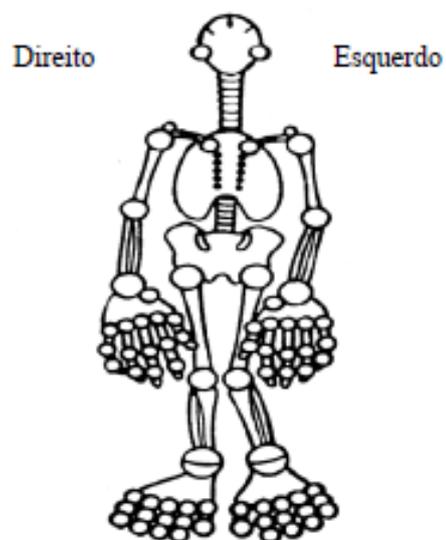
(\*) DADOS OBTIDOS A PARTIR DA REVISÃO DOS PRONTUÁRIOS MÉDICOS.

ESQUEMA DAS ARTICULAÇÕES

No. articulações dolorosas: .....



No. articulações edemaciadas: .....



## ANEXO G - LINK PARA O ARTIGO DE REVISÃO PUBLICADO

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6357904/>

Open Access Rheumatology: Research and Reviews

Dovepress

open access to scientific and medical research

 Open Access Full Text Article

REVIEW

## Sjögren's syndrome and systemic lupus erythematosus: links and risks

This article was published in the following Dove Medical Press journal:  
*Open Access Rheumatology: Research and Reviews*

Sandra Gofinet Pasoto<sup>1,2</sup>  
Victor Adriano de Oliveira  
Martins<sup>1</sup>  
Eloisa Bonfa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Rheumatology Division, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil; <sup>2</sup>Laboratory Division, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), São Paulo, São Paulo, Brazil

**Abstract:** Systemic lupus erythematosus (SLE) and Sjögren's syndrome (SS) may coexist, and they are chronic complex disorders, with an autoimmune background, multifactorial etiology, multiple circulating autoantibodies, and variable prognosis. The prominent feature of SS is the impairment of the lacrimal and salivary glands leading to sicca symptoms. This disease may be classified as primary Sjögren's syndrome (pSS), or secondary Sjögren's syndrome (sSS) since it is often associated to other autoimmune disorders, principally SLE, rheumatoid arthritis, and systemic sclerosis. Systematic reviews and meta-analyses show an sSS prevalence in SLE patients of about 14%–17.8%. Herein, we updated important aspects of the clinical association between SLE and sSS through a narrative review of the PubMed database in the last 5 years (from July 2013 to October 2018) with the terms "Sjogren syndrome and systemic lupus erythematosus". The following aspects are addressed: the classification criteria for sSS; differences and similarities between SLE and pSS regarding demographic, clinical, and serological characteristics (including new autoantibodies), as well as comorbidities; the etiopathogenic links between SLE and pSS (including genetic and environmental factors, B-cell activation, and autoantibodies); the predictive factors for sSS onset in SLE patients; the ocular and oral involvements due to sSS in SLE; and the main distinctive demographic, clinical, and serological features of SLE with and without associated SS.

**Keywords:** systemic lupus erythematosus, primary Sjögren's syndrome, secondary Sjögren's syndrome, polyautoimmunity, anti-Ro, anti-SSA, autoantibodies, pathogenesis

