

ALINE LAURIA PIRES ABRÃO

**ANÁLISE DO PERFIL PROTEICO SALIVAR DE PACIENTES COM
LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO JUVENIL**

Brasília- DF

2017

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ALINE LAURIA PIRES ABRÃO

**ANÁLISE DO PERFIL PROTEICO SALIVAR DE PACIENTES COM
LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO JUVENIL**

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Cristina Barreto Bezerra

Co-orientadora: Profa. Dra. Denise Pinheiro Falcão

Brasília- DF

2017

ALINE LAURIA PIRES ABRÃO

**ANÁLISE DO PERFIL PROTEICO SALIVAR DE PACIENTES COM
LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO JUVENIL**

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em 30 de junho de 2017

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria do Carmo Machado Guimarães- UnB

Prof. Dr. Rivadávio Fernandes Batista de Amorim- UnB

Profa. Dra. Gisele Lago Martinez- UNIEURO

Prof. Dr. Orlando Ayrton de Toledo (suplente)- UnB

Dedico este trabalho à minha família que sempre foi fonte de momentos de alegria, em especial aos meus pais José Augusto, Liana e minha irmã Fátima. Ao meu marido Carlos Renato companheiro, amigo em todos os momentos e às nossas filhas Alice e Laís.

À Profa. Dra. Denise Falcão, pela amizade, parceria e pela contribuição inestimável à minha formação profissional, científica e pessoal.

AGRADECIMENTOS

À orientadora, Profa. Dra. **Ana Cristina Barreto Bezerra**, pelos preciosos ensinamentos durante toda a minha vida acadêmica, pela confiança e por propiciar este grande aprendizado.

Ao Prof. Dr. **Rivadávio Amorim**, que participou de maneira expressiva na minha formação científica, pelo empenho na concretização desta linha de pesquisa.

À Profa. Dra. **Lícia Maria Henrique Mota**, por ter permitido a entrada do nosso grupo de pesquisa no Ambulatório de Reumatologia do Hospital Universitário de Brasília. Exemplo de profissionalismo e dedicação aos estudos.

Aos reumatologistas pediátricos **Aline Islabão** e **Luciano Junqueira** por participarem ativamente na coleta de dados clínicos e pela preciosa orientação na área médica. Exemplos de dedicação no atendimento dos pequenos pacientes.

Ao Prof. Dr. **Luciano Paulino**, pesquisador no sentido mais essencial da palavra, pela solicitude e paciência de nos ensinar.

Ao Prof. Dr. **Orlando Ayrton de Toledo**, profissional exemplar. Minha gratidão e admiração.

À Profa. Dra. **Maria do Carmo Guimarães** e à Profa. Dra. **Gisele Lago Martinez** por terem aceitado o convite para compor a banca examinadora do presente trabalho e, certamente, contribuírem com seus conhecimentos.

Ao Prof. Dr. **Marcelo Ramada** e doutorando **Osmel Fleitas**, pelo acesso e apoio na análise das amostras.

À **Helora Freitas Moura** e **Rita Lopes** pelo auxílio na coleta das amostras.

A todos os integrantes que passaram e que ainda fazem parte do Núcleo de Ensino Integrado e Pesquisa em Saúde- NEIPS- por termos compartilhado experiências e crescido cientificamente.

Às mães das crianças que participaram deste estudo, pela generosidade em permitir o nosso estudo.

Aos pacientes do Serviço de Reumatologia do Hospital Universitário de Brasília e do Hospital da Criança de Brasília José de Alencar que participaram desta pesquisa e por tudo o que me ensinaram.

Meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram e me auxiliaram durante a execução deste trabalho.

*“Conheça todas as teorias, domine
todas as técnicas, mas ao tocar uma alma
humana, seja apenas outra alma humana.”*

Carl Jung

RESUMO

Introdução: O lúpus eritematoso sistêmico juvenil (LESJ) é uma doença crônica multisistêmica, de natureza autoimune inflamatória, pleomórfica, com múltiplas manifestações, potencialmente progressiva e incapacitante. É rara antes dos 5 anos de idade e costuma apresentar um pico na puberdade. Apesar das manifestações clínicas, alterações imunológicas e tratamento serem similares aos doentes adultos, crianças e adolescentes geralmente apresentam um curso clínico mais grave. É a doença reumática autoimune com maior morbidade e mortalidade na classe pediátrica, sendo o soro sanguíneo de particular importância no diagnóstico e monitoramento de autoanticorpos da doença. Por ser a coleta de sangue um exame desconfortável, principalmente para crianças, torna-se importante encontrar novos recursos não invasivos que possam substituir essa técnica. A avaliação do perfil proteico salivar está se tornando cada vez mais importante para o diagnóstico precoce de diversas doenças. A saliva destaca-se como um fluido biológico de coleta fácil, indolor e sem implicações de risco ao paciente. No entanto, não foram encontrados no banco de dados do PubMed publicações a respeito do perfil molecular da saliva de pacientes com LESJ. **Objetivo:** Avaliar se o perfil proteico da saliva de pacientes com LESJ, na faixa etária de 9- 18 anos, difere entre os pacientes com artrite idiopática juvenil (AIJ) e indivíduos sem doença autoimune (SDA). **Métodos:** Trata-se de um estudo transversal. Foi coletada saliva total não-estimulada. As proteínas do *pool* de saliva dos três grupos foram caracterizadas de acordo com o peso molecular através de eletroforese unidimensional (SDS- PAGE). Além disso, realizou-se espectrometria de massa por dessorção de matriz assistida por laser combinada com o sistema de tempo de vôo (MALDI-TOF) das amostras individuais e do pool dos grupos. Os dados estatísticos foram avaliados com testes para grupos dependentes através do ANOVA e teste t de Student, a depender da distribuição das frequências e teste *post-hoc* testes, quando necessários. As variáveis categóricas foram testadas com o teste qui-quadrado ou com o teste exato de Fisher. **Resultados:** Foram avaliados 27 pacientes com LESJ, 23 com AIJ e 44 (SDA). Diferenças consistentes não foram observadas nos perfis proteicos da saliva entre os grupos avaliados pelo método SDS-PAGE. Através da técnica

MALDI-TOF a média da relação/intensidade (95% intervalo de confiança) da faixa de massa/carga de 1315.6027 a 1315.7536 apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = ,037$), onde o grupo SDA apresentou maior média de relação/intensidade 41,3 (31,8 – 50,7) quando comparada à do grupo LESJ 20,5 (15,1 – 25,9) ($p = ,026$). Análise de subgrupo relativa à atividade do LESJ evidenciou que a faixa de 1471.5897 a 1471.8495 apresentou diferença estatisticamente significativa ($p = ,010$). A espectrometria do *pool* de saliva revelou picos mais elevados dos espectros 1224.5036, 1315.5853, 1731.6880 e 1866.7644 m/z, quando comparados aos dos grupos com LESJ e AIJ. **Conclusão:** O perfil proteico da saliva individual de pacientes com LESJ foi diferente em um dos espectros avaliados quando comparado ao do grupo SDA.

Palavras-Chave: lúpus eritematoso sistêmico juvenil; saliva; artrite idiopática juvenil; proteína salivar; crianças.

ABSTRACT

Background: Juvenile systemic lupus erythematosus (JSLE) is a chronic multisystemic disease, with an autoimmune inflammatory nature, pleomorphic, with multiple manifestations, potentially progressive and incapacitating. It is rare before 5 years of age and usually has a peak at puberty. Although clinical manifestations, immunological changes and treatment are similar to adult patients, children and adolescents usually present a more serious clinical course. It is autoimmune rheumatic disease with higher morbidity and mortality in the pediatric class and the blood serum is of particular importance in the diagnosis and monitoring of autoantibodies of the disease. Because blood collection is an uncomfortable test, especially for children, it becomes important to find new non-invasive features that can replace this technique. The evaluation of the salivary protein profile is becoming increasingly important for the early diagnosis of several diseases. Saliva stands out as a biological fluid with easy collection, painless and without risk implications to the patient. However, no publications were found in the PubMed database regarding the molecular profile of saliva in patients with JSLE. **Objective:** To evaluate whether the protein profile of the saliva of patients with JSLE, in the age group of 9-18 years, differs between patients with juvenile idiopathic arthritis (JIA) and without autoimmune disease. **Methods:** This was a cross-sectional study. The salivary pool proteins of the three groups were characterized according to molecular weight by one-dimensional electrophoresis (SDS-PAGE). In addition, laser assisted matrix desorption mass spectrometry combined with the time-of-flight (MALDI-TOF) of the individual samples and pool of the groups was performed. The statistical data were evaluated with tests for dependent groups through ANOVA and Student's t-test, depending on frequency distribution and post-hoc tests, when necessary. Categorical variables were tested using the chi-square test or the Fisher's exact test. **Results:** Twenty-seven patients with JSLE, 23 with JIA and 44 without autoimmune disease were evaluated. Consistent differences were not observed in the protein profiles of saliva among the groups evaluated by the SDS-PAGE method. Through the MALDI-TOF technique, the mean of the relation/ intensity (95% confidence interval) of the

mass/load range from 1315.6027 to 1315.7536 presented a statistically significant difference between the groups ($p = .037$), where the group without autoimmune diseases had a higher average Of relation / intensity 41.3 (31.8 - 50.7) when compared to the LESJ group 20.5 (15.1 - 25.9) ($p = .026$). Subgroup analysis of the activity of the JSLE showed that the range from 1471.5897 to 1471.8495 presented a statistically significant difference ($p = .010$). Saliva pool spectrometry revealed higher peaks of the 1224.5036, 1315.5853, 1731.6880 and 1866.7644 m/z spectra as compared to the LESJ and JIA groups.

Conclusion: The protein profile of the individual saliva of patients with JSLE was different in one of the evaluated spectra when compared to the group without autoimmune disease.

Key-words: systemic lupus erythematosus; saliva; juvenile idiopathic arthritis; salivary protein; children.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Análise comparativa do índice CPO-D.....	32
Figura 2- Gel representativo do fracionamento de proteínas por SDS-PAGE, correspondente ao <i>pool</i> da saliva de pacientes com LESJ, AIJ, SDA e o padrão de massa molecular, respectivamente.	34
Figura 3- Faixa de espectro de 1224.5036 a 1224.7376 m/z do <i>pool</i> de saliva de pacientes com LESJ, AIJ e SDA (CTRL).....	35
Figura 4- Faixa de espectro 1315.5853 a 1315.8628 m/z do <i>pool</i> de saliva de pacientes com LESJ, AIJ e SDA (CTRL).....	36
Figura 5- Faixa de espectro 1731.6880 a 1732.0380 m/z. do <i>pool</i> de saliva de pacientes com LESJ, AIJ e SDA (CTRL).....	37
Figura 6- Faixas de espectro 1866.7644 a 1866.9594 m/z do <i>pool</i> de saliva de pacientes com LESJ, AIJ e SDA (CTRL).....	38
Figura 7- Distribuição da frequência do LESJ	40
Figura 8- Distribuição das frequências da atividade do LESJ	41
Figura 9- Análise comparativa da faixa de espectros em relação às fases do LESJ.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Características demográficas.....	31
Tabela 2- Análise descritiva dos medicamentos utilizados nos pacientes com LESJ e AIJ.....	33
Tabela 3- Análise de correlação das faixas de espectros entre os grupos	39
Tabela 4- Índice de dano acumulado nos pacientes com LESJ, medido através do SLICC/ACR-DI.....	41
Tabela 5- Análise descritiva e comparativa dos medicamentos utilizados pelos pacientes com LESJ nas fases ativa e inativa.....	42
Tabela 6- Análise descritiva e comparativa dos medicamentos utilizados pelos pacientes com AIJ e seus subtipos.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1- DE	Eletroforese unidimensional
2-DE	Eletroforese bidimensional
ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
Anti-CCP	Anticorpo contra peptídeos cíclicos citrulinados
Anti-DNA	Anticorpos contra o ácido desoxirribonucleico
AR	Artrite Reumatoide
BILAG	<i>British Isles Lupus Assessment Group</i>
CPO-D	Dentes Cariados, Perdidos e Restaurados
Da	Dalton
ECALM	<i>European Consensus Lupus Activity Measurement</i>
FAN	Fator Antinuclear
FR	Fator Reumatoide
HCB	Hospital da Criança de Brasília José de Alencar
HUB	Hospital Universitário de Brasília
ILAR	<i>International League of Associations for Rheumatology</i>
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
LC/ LC-MS/ MS	Cromatografia Líquida Bidimensional Acoplada Espectrometria de Massa
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico

LESJ	Lúpus Eritematoso Sistêmico Juvenil
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization</i>
NL	Nefrite Lúpica
SDA	Sem Doença Autoimune
SDS- PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SELDI	<i>Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization</i>
SELENA-SLEDAI	<i>Safety of Estrogens in Lupus Erythematosus National Assessment</i>
SLAM	<i>Systemic Lupus Activity Measure</i>
SLEDAI	<i>Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index</i>
SLEDAI- 2K	<i>Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000</i>
SLICC- ACR- DI	<i>Systemic Lupus International Colaborating Clinics/ American College of Rheumatology- Damage Index</i>
SSs	Síndrome de Sjögren secundária
TOF	<i>Time of Flight</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO.....	1
1.1.1	Diagnóstico.....	2
1.1.2	Manifestações Clínicas.....	3
1.1.3	Achados Laboratoriais.....	4
1.1.4	Critérios do Colégio Americano de Reumatologia.....	5
1.1.5	Critérios do <i>Systemic Lupus International Collaborating Clinics</i>	6
1.1.6	Instrumentos de avaliação da doença.....	7
1.2	ARTRITE IDIOPÁTICA JUVENIL.....	8
1.2.1	Critérios para diagnóstico e classificação.....	8
1.2.2	Exames laboratoriais.....	9
1.3	SALIVA.....	10
1.3.1	Origem, composição e função.....	10
1.3.2	Fluxo salivar.....	12
1.3.3	Diagnóstico através da saliva.....	13
1.3.4	Soro <i>versus</i> saliva como meio diagnóstico.....	14
1.4	SEPARAÇÃO DE PROTEÍNAS POR ELETROFORESE.....	15
1.5	ESPECTROMETRIA DE MASSA.....	17
1.5.1	Definição.....	17
1.5.2	Análise de peptídeos e proteínas por espectrometria de massa.....	17
1.6	PROTEÔMICA.....	18
1.6.1	Definição.....	18
1.6.2	Proteômica salivar.....	19
1.6.3	Proteômica e doenças reumáticas.....	20
2	OBJETIVOS.....	23

2.1	OBETIVO GERAL	23
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3	MÉTODOS	24
3.1	DELINEAMENTO E POPULAÇÃO.....	24
3.2	SEQUÊNCIA DE ATENDIMENTO	25
3.3	OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE SALIVA	26
3.3.1	Obtenção das amostras de saliva	26
3.3.2	Fluxo salivar	26
3.3.3	Estocagem e conservação da saliva	27
3.3.4	Análise das proteínas salivares.....	27
3.4	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	30
4	RESULTADOS	31
4.1	CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS.....	31
4.2	CARACTERÍSTICAS ODONTOLÓGICAS	32
4.3	USO DE MEDICAMENTOS.....	33
4.4	SDS- PAGE.....	34
4.5	FAIXAS DE ESPECTROS IDENTIFICADOS	34
4.5.1	Avaliação do <i>Pool</i> de Saliva	34
4.5.2	Avaliação Individual das Amostras por Grupo.....	38
4.6	CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES COM LESJ	40
4.7	CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES COM AIJ	43
5	DISCUSSÃO.....	45
6	CONCLUSÃO.....	56
	REFERÊNCIAS.....	57
	APÊNDICE A- ARTIGO 1.....	76
	APÊNDICE B- ARTIGO 2.....	87
	APÊNDICE C- ARTIGO 3.....	95

APÊNDICE D- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLERECIDO.....	100
APÊNDICE E- TERMO DE ASSENTIMENTO	103
APÊNDICE F- FICHA CLÍNICA.....	106
ANEXO A- EXAMES LABORATORIAIS PARA DIAGNÓSTICO INICIAL DE LES	111
ANEXO B- CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO DO LES- ACR 1997	112
ANEXO C- CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO DO LES- SLICC 2012.....	113
ANEXO D- CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO DA AIJ	114
ANEXO E- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA- PLATAFORMA BRASIL	115

1 INTRODUÇÃO

1.1 LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença crônica multisistêmica, de natureza autoimune inflamatória, pleomórfica, com múltiplas manifestações clínicas e laboratoriais, potencialmente progressiva e incapacitante (1). Caracteriza-se pela formação de autoanticorpos e deposição de imunocomplexos, ocasionando inflamação em diversos órgãos e dano tecidual (2). A teoria atualmente mais aceita acerca do desenvolvimento de LES considera sua etiologia multifatorial, complexa, com susceptibilidade genética, envolvimento de fatores hormonais e com gatilhos ambientais variados (3).

Sua prevalência na população global é de 40-50 casos por 100 000 pessoas e observa-se clara preponderância do gênero feminino em idade fértil, sendo que de cada dez ocorrências, somente uma acomete o gênero masculino (4). Estudo recente, que englobou ampla área geográfica dos Estados Unidos da América, aponta incidência de 6,63 casos para cada 100.000 norte-americanos (5). No Brasil, estima-se uma incidência anual de LES seja de 8,7 casos na população da região nordeste (6). A mortalidade dos pacientes com LES é cerca de 3 a 5 vezes maior do que na população geral e está relacionada com atividade inflamatória da doença, especialmente quando há acometimento renal e do sistema nervoso central (7). Além disso, há maior risco de infecções graves decorrentes da imunossupressão e, tardiamente, podem ocorrer outras complicações da própria doença e do tratamento (2).

Embora indivíduos de todas as idades possam ser acometidos pelo LES, verifica-se que sua manifestação se dá comumente na faixa etária dos 15 aos 44 anos (8). Portanto, atinge pessoas durante os primeiros anos de atividade laboral o que

resulta em grande perda de qualidade de vida e também uma alta carga econômica para a sociedade, em âmbito individual e do serviço público e privado de saúde (9).

O lúpus eritematoso sistêmico juvenil (LESJ), embora seja mais raro, apresenta basicamente as mesmas características do lúpus do adulto. Do total de pacientes com LES, 10- 20% se encontram nas duas primeiras décadas de vida (10). A incidência de LESJ em todo o mundo varia entre 0,3-0,9 por 100.000 habitantes por ano, com prevalência estimada entre 5- 10 casos por 100.000 (11-13). Incide sobre ambos os sexos, no entanto é em média 4,5 vezes mais frequente no feminino, com variações nas diversas faixas etárias 4:3 (F:M) dos 0 aos 9 anos, 4:1 (F:M) dos 10 aos 14 anos e 5:1 (F:M) dos 15 aos 19 anos. Sua distribuição é universal, mas especula-se a possibilidade de maior incidência em negros, polinésios, asiáticos e índios americanos (14). A idade média de apresentação é de 12 anos e raramente ocorre antes dos 5 anos de idade (15-17).

No Brasil, o projeto de Lei 7797/10, do Senado, incluiu o lúpus entre as doenças cujos portadores são dispensados de cumprir prazo de carência para usufruir dos benefícios de auxílio-doença e aposentadoria por invalidez (18). Tal iniciativa do senado demonstra o grau de comprometimento sistêmico que a doença pode causar no portador e a consequente perda de qualidade de vida. Ademais, verifica-se que o diagnóstico precoce de LES está associado a taxas mais baixas de surtos da atividade da doença, menor utilização dos serviços de saúde (19). Isto pode representar grande economia nos custos relativos ao serviço público e privado de saúde uma vez que estudos evidenciam que os custos médios anuais de saúde por paciente com LES estão estimados entre US \$ 12.000 a US \$ 24.000 (20-24).

1.1.1 Diagnóstico

O diagnóstico do LES baseia-se na presença de manifestações clínicas características e de exames laboratoriais (14).

1.1.2 Manifestações Clínicas

O LES manifesta-se com períodos de exacerbação e remissão. As crianças apresentam, geralmente, maior atividade da doença e evolução mais agressiva comparativamente aos adultos (25). Por esse motivo é de extrema importância o diagnóstico precoce da doença (26).

Além disso, o LES pode afetar qualquer órgão ou sistema e apresenta diversas formas de evolução e prognóstico. O diagnóstico do LESJ é evolutivo e qualquer sinal ou sintoma pode ser a primeira e única manifestação da doença. As manifestações podem persistir ou recorrer por meses ou anos até que o diagnóstico definitivo de lúpus seja confirmado pela presença de outros acometimentos (14).

Sintomas gerais como fadiga, anorexia, emagrecimento e febre ocorrem em 60 a 80% dos casos. A febre é a ocorrência mais frequente, podendo ser elevada ou baixa, diária ou esporádica (14).

As manifestações sistêmicas mais frequentes do LESJ incluem: artrite ou artralgia (64-91%), comprometimento cutâneo (70- 90%), sintomas gastrointestinais (20%), manifestações pulmonares (40- 50%), envolvimento cardíaco (25- 50%), linfadenopatia (10-30%), (1, 14). Envolvimento renal está presente em 29% a 80% dos casos e é a principal causa de morbidade e mortalidade no LESJ e ocorre em metade das crianças lúpicas (14, 27). As alterações do sistema nervoso central têm incidência variável entre 9 a 45% dos casos, sendo a segunda causa de morbidade e mortalidade no LESJ (14).

No contexto odontológico, a prevalência de manifestações bucais como ulcerações agudas ou crônicas, lesões discoides, queilite angular, glossites e hipossalivação variam de 9% a 54% (28, 29). Atraso na erupção dentária decídua e permanente, defeitos na formação de raízes dentárias também estão presentes. Porém, afirma-se que estas alterações não são propriamente decorrentes do LES, mas do tratamento com corticosteróides (28). Quanto à condição periodontal, verificou-se que

60% a 70% dos portadores de LES apresentam algum tipo de doença periodontal (30, 31) (APÊNDICE A).

O diagnóstico precoce, a menor duração da doença ativa e uma terapêutica mais eficaz contribuem para a melhoria da taxa de sobrevivência dos pacientes com LESJ (32). Contudo, continua a ser a doença reumática autoimune com maior morbidade e mortalidade na classe pediátrica (32, 33).

1.1.3 Achados Laboratoriais

No soro, a produção de uma variedade de autoanticorpos é a base imunopatológica da doença e podem ser detectados, em média, 2,7 a 9,3 anos antes do diagnóstico (34). O fator antinuclear (FAN) positivo é bastante sensível e, talvez, seja o achado mais importante para estabelecer, inicialmente, uma implicação autoimune. No entanto, o FAN positivo não é específico e pode ser encontrado em 5-20% da população normal (35). Além disso, existem pacientes lúpicos que apresentam FAN negativo, apesar de ser uma condição extremamente rara (35).

Os anticorpos antinucleossomo são mais específicos, mas pouco sensíveis e não fazem parte da rotina diagnóstica (14). Os anticorpos contra o ácido desoxirribonucleico (Anti-DNA) nativo ou de dupla-hélice são altamente sensíveis para o lúpus e podem estar presentes em até 97% dos casos de LESJ (14). Eles estão associados com envolvimento renal, mas não se correlacionam bem com a atividade da doença (1). Os anticorpos anti-Sm estão presentes no soro de 1/3 dos pacientes e apresentam alta especificidade e baixa sensibilidade (14).

Anticorpos antifosfolípidos também podem ser encontrados no lúpus (50%) e podem causar trombozes venosas e arteriais, bem como a perda fetal recorrente. A avaliação é feita pela detecção de anticorpos contra a cardiolipina ou beta-2 glicoproteína 1, ou pela presença de um anticoagulante lúpico. Anti-SSA/Ro e anti

SSB/La estão associados à síndrome de Sjögren secundária, lúpus eritematoso cutâneo subagudo, lúpus neonatal e fotossensibilidade (1).

Os autoanticorpos conduzem à formação de complexos imunes, e que ativam e consomem complemento. Assim, a análise dos níveis de C3, C4 ou complemento total CH50 pode ser útil no diagnóstico de lúpus, bem como no monitoramento de rotina de pacientes com LES (36). No entanto, hipocomplementemia não é específico para LES e pode ser encontrado em qualquer doença em que há uma grande carga de antígeno-anticorpo (36).

Anormalidades hematológicas são achados comuns no LES. A anemia pode refletir inflamação crônica, doença renal ou deficiência de ferro. Além disso, anemia hemolítica autoimune causada por auto-anticorpos contra antígenos de glóbulos vermelhos (Coombs positivo) pode ocorrer. Leucopenia e trombocitopenia são comuns em pacientes com LES. A linfopenia é bastante prevalente e se relaciona com a Nefrite Lúpica (NL). Acredita-se que sejam secundários a anticorpos dirigidos contra antígenos de superfície celular (37).

Os exames laboratoriais mais comuns obtidos em avaliação inicial do LES estão listados no ANEXO A- Quadro 1.

1.1.4 Critérios do Colégio Americano de Reumatologia

Devido às vastas manifestações clínicas e laboratoriais, na prática, para o diagnóstico de LES utilizam-se os critérios de classificação propostos pelo *American College of Rheumatology* (ACR) , em 1982, e revisados em 1997 (38). O diagnóstico se fundamenta na presença de, pelo menos, quatro dos 11 critérios descritos no ANEXO B- Quadro 2.

No entanto, esses critérios foram formulados e validados para classificação de pacientes com doença estabelecida e poderia excluir indivíduos com sinais precoces ou

doença limitada. Evidências de estudos sugerem que apenas 60% dos pacientes com LES encaixam-se nos critérios da ACR (39).

Os critérios diagnósticos utilizados para o LESJ são os mesmos utilizados para adultos. Contudo, até 1/3 dos pacientes, especialmente crianças e adolescentes, não preenchem, no início da doença, os critérios requeridos para a definição do LES, o que contribui, sobremaneira, para o retardo no diagnóstico (40, 41).

Por isso, é importante e necessário que a avaliação do LESJ seja realizada de maneira criteriosa em todo o curso da doença: 1) diagnóstico preciso; 2) acompanhamento da atividade da doença; 3) avaliação da morbidade e dos danos acumulados; e 4) determinação do estado de saúde do paciente ao longo da doença (1).

1.1.5 Critérios do *Systemic Lupus International Collaborating Clinics*

Recentemente um grupo de profissionais especializados em atendimento de pacientes com LES, *Systemic Lupus International Collaborating Clinic* (SLICC), publicou nova proposição para critérios de classificação de pacientes com lúpus (42). Foram incluídas manifestações do lúpus não contempladas no critério do ACR e enfatizada a necessidade de preenchimento de, pelo menos, um critério imunológico. Para um indivíduo ser classificado com LES é necessário o preenchimento de pelo menos 4 critérios, incluindo pelo menos 1 clínico (dentre 11) e 1 imunológico (dentre 6), ou deve ter nefrite confirmada por biópsia na presença de fator antinuclear positivo ou anticorpo anti-DNA nativo positivo- ANEXO C- Quadro 3.

Nos adultos, comparando-se os critérios do ACR de 1997 ao SLICC de 2012, ele apresenta maior sensibilidade (97% *versus* 83%), apesar de menor especificidade (84% *versus* 96%). Atualmente, existe uma proposta em andamento para a validação internacional desses novos critérios para o LESJ, e estes critérios têm sido recentemente utilizado na prática clínica (13).

1.1.6 Instrumentos de avaliação da doença

O acompanhamento do tratamento dos pacientes com LES deve ser fundamentado em instrumentos que sejam capazes de medir, de maneira objetiva, a atividade inflamatória da doença. As medidas objetivas de atividade de doença e de dano são utilizadas primariamente em ensaios clínicos e estudos observacionais, mas podem ser utilizados, também, na prática clínica (43). Alguns índices utilizados são: *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index* (SLEDAI) (44); *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000* (SLEDAI-2K) (45); *Systemic Lupus International Collaborating Clinics/ American College of Rheumatology- Damage Index* (SLICC-ACR-DI) (46); *British Isles Lupus Assessment Group* (BILAG) (47); *Safety of Estrogens in Lupus Erythematosus National Assessment* (SELENA-SLEDAI); *Systemic Lupus Activity Measure* (SLAM) (48) e *European Consensus Lupus Activity Measurement* (ECALM) (49).

O principal índice de atividade atualmente utilizado no LES é o SLEDAI (44). Ele é composto por 24 itens que incluem sinais, sintomas e testes laboratoriais, cada qual recebe um peso (que varia de 1 a 8), de acordo com sua importância ou gravidade. A soma dos itens resulta no escore final que quanto mais alto, maior é o grau de atividade (máximo 105). Uma modificação deste índice sem a inclusão de alguns testes laboratoriais é o SLEDAI-2K (45). Em estudos com pacientes brasileiros com LESJ, mostrou boa aplicabilidade (50).

A constatação de lesão irreversível ou sequela decorrente da doença pode ser medida por meio do SLICC/ ACR- DI (51). O SLICC / ACR- DI tem se mostrado um instrumento válido (46). Doze órgãos e sistemas são avaliados: ocular, neuropsiquiátrico, renal, pulmonar, cardiovascular, vascular periférico, gastrointestinal, musculoesquelético, cutâneo, endócrino, gonadal e malignidades (13). Além disso, o índice de dano pode ficar estável ou aumentar no decorrer do tempo e possui pontuação máxima de 47 pontos (43).

1.2 ARTRITE IDIOPÁTICA JUVENIL

A artrite idiopática juvenil (AIJ) é uma alteração inflamatória crônica de etiologia desconhecida, que envolve primariamente as articulações. É a doença crônica articular mais frequente na infância e importante causa de incapacidade a curto e longo prazos (52, 53). Embora a AIJ muitas vezes seja definida como uma doença única, ela engloba uma série de entidades semelhantes, caracterizadas principalmente por comprometimento articular persistente por mais de seis semanas, tendo início antes dos 16 anos de idade (54). Os desfechos adversos incluem dor crônica, rigidez matinal e dano articular e deficiência física como resultado da inflamação crônica das articulações. Apesar de prognóstico ter melhorado nos últimos anos, cerca de metade dos pacientes continuarão a ter doença na idade adulta (55).

A etiologia da AIJ permanece desconhecida, fatores ambientais, autoimunes e genéticos têm papel na sua patogênese e na heterogeneidade da doença (56).

Nos países desenvolvidos, a incidência da AIJ varia entre 2 a 20 casos por 100 mil (57, 58) e a prevalência se situa entre 16 e 150 por 100 mil (58). Porém, sua incidência e prevalência variam consideravelmente de acordo com a região. Tais variações decorrem das diferenças étnicas, suscetibilidades imunogenéticas, possíveis fatores ambientais envolvidos na patogênese da doença, além do uso de diferentes definições/ classificações clínicas dos casos (59). Em geral, a AIJ acomete duas vezes mais meninas que meninos, entretanto, são observadas diferenças expressivas nos diversos subtipos (52).

1.2.1 Critérios para diagnóstico e classificação

O diagnóstico é de exclusão, pois ele é confirmado apenas depois de excluir outras causas de artrite (52).

Atualmente, a AIJ é classificada em sete subtipos, segundo a *International League of Associations for Rheumatology* (ILAR)), de acordo com os primeiros 6 meses

de doença: sistêmica, poliartrite fator reumatoide (FR) negativo, poliartrite FR positivo, oligoartrite (persistente ou estendida), artrite relacionada com entesite, artrite psoriásica e indiferenciada, cada qual tem critérios de exclusão e inclusão específicos (ANEXO D-Quadro 4) (52, 60, 61).

Na literatura ainda não há consenso em relação à terminologia a ser utilizada, o que muitas vezes dificulta a interpretação de estudos científicos (52).

1.2.2 Exames laboratoriais

Em AIJ os exames laboratoriais são usados para auxiliar o diagnóstico clínico, principalmente na exclusão de outras causas da artrite. Além disso, para mostrar a intensidade do processo inflamatório e reações adversas à terapia e como ferramenta na compreensão da patogênese da doença. Não há exame específico que possibilite o diagnóstico de AIJ (52, 62).

Na maioria das vezes, as alterações hematológicas refletem a intensidade do processo inflamatório. Embora em pacientes com doenças articulares leve raramente sejam observadas alterações no hemograma, pode ser observado anemia leve em alguns casos. Os pacientes com doença mais grave e ativa geralmente apresentam leucocitose e trombocitose, que podem atingir níveis bastante elevados nas formas sistêmicas (52).

O FR IgM apresenta positividade variável em crianças com AIJ, dependendo do subtipo da doença. O valor diagnóstico do FR+ é baixo, não atinge 10% dos pacientes com AIJ. Portanto, não tem valor diagnóstico e sim para classificar os subtipos (63). Além disso, o FR pode estar presente em outras doenças do tecido conectivo, como o LESJ (52).

A pesquisa do HLA-B27, antígeno de superfície celular, que é produto dos genes do complexo maior de histocompatibilidade, encontra-se presente em 85% dos

pacientes com artrite relacionada à entesite. Assim, sua positividade é considerada um dos critérios de exclusão dos outros subtipos de AIJ (64).

A positividade do FAN apoia o diagnóstico de AIJ. Porém, não tem valor diagnóstico, mas é utilizado para classificar o subtipo de artrite (65). Sua presença indica maior risco de desenvolvimento de uveíte anterior crônica. Essa complicação ocular é frequente nos subtipos de AIJ oligoarticular, poliarticular FR negativo e artrite psoriásica, todas com predomínio no sexo feminino (62).

O anti-CCP (anticorpo contra peptídeos cíclicos citrulinados) é um importante marcador sorológico para o diagnóstico de artrite reumatoide e um possível marcador prognóstico para a progressão desfavorável da doença. Apesar de razoavelmente bem explorado em pacientes adultos, a frequência do anti-CCP e sua importância no diagnóstico de AIJ permanece controverso. A maioria dos estudos descreve positividade menor que 10% nos pacientes com AIJ, principalmente no subtipo poliarticular FR positivo, que cursa com manifestações articulares mais graves, com mais erosões e deformidades (62, 66).

A inexistência de marcadores laboratoriais e a grande variabilidade do quadro clínico da doença contribuem para a dificuldade na identificação precoce das crianças e adolescentes acometidos pela AIJ. Portanto, trata-se de um diagnóstico de exclusão, uma vez que não existem sinais, sintomas ou exames laboratoriais exclusivos da doença (67).

1.3 SALIVA

1.3.1 Origem, composição e função

A saliva é um fluido biológico com claras implicações na saúde oral. Possui várias funções importantes dentre elas, destacam-se: (a) lubrificação da mucosa oral, (b) solubilização de substâncias que dão sabor aos alimentos, (c) formação do bolo

alimentar, (d) função digestiva, (e) diluição de detritos, (f) proteção dos dentes e tecidos moles bucais, e (g) facilitação na mastigação, deglutição e fonação (68, 69).

As glândulas salivares são classificadas pelo tamanho, localização anatômica e histologia. Existem três pares de glândulas salivares maiores: parótidas, submandibulares e sublinguais, responsáveis por cerca de 90% de toda a saliva produzida na boca. O restante deriva-se de glândulas menores situadas na mucosa labial, lingual, palatina, glossopalatina e retromolar (70). Embora participem com a produção de pequeno volume da secreção, são responsáveis por grande parte do total das substâncias provenientes do sangue (69).

A saliva forma-se nos ácinos e é decorrente do líquido intersticial originado dos capilares sanguíneos (saliva primária). Em seguida é modificada, ao cruzar o sistema de ductos- intercalado, estriado e excretor. As trocas iônicas acontecem principalmente nos ductos estriados, tornando a saliva uma solução hipotônica (70).

O fluido oral é constituído 99% por água e inclui, também, uma mistura de eletrólitos (sódio, potássio, cálcio, cloro, magnésio, bicarbonato e fosfato), proteínas (incluindo enzimas, imunoglobulinas e outros fatores antimicrobianos, glicoproteínas da mucosa, vestígios de albumina e vários polipeptídios e oligopeptídios) e, em menores quantidades, glucose e produtos nitrogenados (uréia e amônia). Estes componentes funcionam de forma integrada e são responsáveis pelas várias funções atribuídas à saliva (70).

A passagem de compostos do plasma para as glândulas salivares ocorre através de:

1. Ultra filtração através das junções (gaps) entre as células acinares em que apenas moléculas com peso molecular menor do que 1900 dalton (Da) fazem esse tipo de transporte. Como exemplo: água, alguns íons, catecolaminas e hormônios esteroides. A concentração salivar desses compostos é de 300 a 3000 vezes menor na saliva do que no plasma (71).

2. Transporte seletivo através da membrana celular por difusão passiva
Exemplo: moléculas lipolíticas (hormônios esteroides);

3. Transporte ativo através dos canais de proteína. Exemplo: íons- Na^+ , K^+ , Cl^- e HCO_3^- ;

4. Sintetizados e secretados em células acinares ou ductais: componentes orgânicos, tais como: lisozima, lactoferrina, peroxidases, histatinas, imunoglobulina A, alfa-amilase salivar (72).

A saliva é estéril, mas perde esta característica ao entrar na cavidade bucal e misturar-se com o fluido crevicular gengival, células sanguíneas, microrganismos e produtos microbianos, células epiteliais descamadas, restos alimentares e secreções originadas nas vias aéreas superiores. Todos esses componentes formam a chamada saliva total ou integral (73).

Cada glândula secreta um tipo de saliva com características específicas (71). A parótida é a mais volumosa das glândulas salivares, sendo puramente serosa. Quando estimulada produz saliva fina, aquosa e rica em alfa-amilase. As glândulas submandibulares são mistas, pois são constituídas por ácinos serosos, mucosos e em semiluas serosas, porém predominantemente secretam uma saliva rica em mucina. As sublinguais, as de menor volume entre as glândulas principais, constituem-se especialmente de células acinares mucosas, portanto produzem secreção viscosa. As glândulas salivares menores apresentam secreção mucosa, em sua maioria (70). Assim, a composição da saliva varia de acordo com os ácinos presentes.

1.3.2 Fluxo salivar

Um adulto saudável produz cerca de 1,0 a 1,5 L de saliva total por dia (65, 67) 20% provém das glândulas parótidas, 60% das submandibulares e de 7-8% das sublinguais. As glândulas menores contribuem com os 10% restantes da produção de

saliva. Quando estimulada, as glândulas parótidas aumentam drasticamente a sua contribuição para 50% do total de secreção salivar (70).

A redução do fluxo salivar (hipossalivação) é um distúrbio comum e estima-se que cerca de 20% da população geral tenham esta alteração (74). O fluxo salivar é considerado baixo quando apresentar valor menor do que 0,25 mL / min sem estímulo e menor do que 1,0 mL / min com estímulo (70). A saliva estimulada é geralmente obtida por mastigação de parafina ou goma ou por estímulos gustatórios. Por outro lado, a saliva sem estímulo representa uma condição de equilíbrio do organismo, com menor influência das glândulas salivares. A coleta de saliva não estimulada pode ser obtida pela drenagem passiva ou ativa, sucção ou absorção (75).

É natural que o indivíduo passe por períodos curtos de hipossalivação, sendo frequente sua ocorrência quando sob estresse psicológico (76, 77). Entretanto, a hipossalivação pode ser decorrente de múltiplas causas, que podem incluir comprometimento do parênquima glandular por processos infecciosos e inflamatórios, associados ou não a doenças granulomatosas, condições autoimunes (como a síndrome de Sjögren e AR), radioterapia da região cefálica e/ou cervical como também pode estar associada aos distúrbios do humor, efeitos adversos ocasionados pelo uso de algumas medicações ou, ainda, ser de causa idiopática (75) (APÊNDICE B).

1.3.3 Diagnóstico através da saliva

A grande variedade de moléculas presentes na secreção salivar faz com que esse fluido seja uma fonte atraente de possíveis biomarcadores (78). Ao longo dos últimos anos, pesquisadores têm desenvolvido ferramentas de diagnóstico salivar para monitorar tanto doenças bucais como sistêmicas através de marcadores presentes na saliva (79-81) e acompanhar a progressão de doenças, nas respostas a tratamentos específicos (79).

O termo biomarcador é definido como um composto bioquímico bastante específico: gene, molécula pequena, peptídeo ou proteína que se altera como resultado

de um distúrbio biológico (82) e que pode ser mensurável em meios biológicos, tais como tecidos, células ou fluidos humanos (83).

A proposta recente é classificar biomarcadores em duas categorias principais: a) biomarcadores de exposição e b) biomarcadores da doença (83). Os biomarcadores de exposição são utilizados para prever riscos, ao passo que os biomarcadores da doença são para fins de rastreio, diagnóstico, prognóstico, determinação de resultado, ou qualquer destas combinações (83). Embora muitos estudos tenham identificado biomarcadores salivares em doenças locais e sistêmicas, sua validação em grupos amostrais maiores não está disponível e resultados de diferentes autores sobre a mesma doença mostram resultados conflitantes (80, 84).

1.3.4 Soro versus saliva como meio diagnóstico

O soro é considerado “padrão-ouro” como fluidos corporais para investigação clínica envolvendo proteômica. Avanços clínicos envolvendo o estudo do proteoma proporcionaram a oportunidade de identificar biomarcadores de doenças nos fluidos biológicos a custos reduzidos para o diagnóstico precoce da doença. Entretanto, o foco principal dos estudos permanece sobre a proteômica de soro ou plasma (83). Nas últimas duas décadas, houve um rápido avanço na área do diagnóstico salivar e vem fomentando novos debates sobre esse tema. A questão fundamental é se, além de curiosidade intelectual, existe uma necessidade real para um segundo (ou terceiro) fluido corporal de diagnóstico ou se há necessidade de substituir o soro/plasma (83).

A utilização da saliva como meio diagnóstico tem vantagens em relação ao soro. A coleta da saliva pode ser realizada de forma simples e pode ser armazenada e transportada com baixo custo, embora haja necessidade de mantê-la em estado congelado, o que impõe um custo adicional. Ao contrário do plasma do sangue, a saliva não coagula, por isso torna-se mais fácil de manusear. Além disso, requer uma técnica de coleta não invasiva, reduzindo, assim, o desconforto do paciente e ansiedade quando há necessidade de coletar várias amostras ao longo de um curto período de tempo (79, 81, 84). No entanto, a saliva total geralmente requer a

centrifugação ou filtração para remover precipitados de mucinas e contaminantes celulares; tal centrifugação também pode remover outras proteínas (80).

Estima-se que os americanos consultem dentistas com frequência maior de 20% quando comparada a consultas médicas (85). Não existem estudos brasileiros semelhantes. Porém, isso demonstra que o dentista pode ser o primeiro profissional a detectar precocemente doenças sistêmicas, incluindo as condições de risco de vida (85). Além disso, o diagnóstico através da saliva seria uma boa alternativa para ser utilizado em regiões e comunidades remotas, pois ofereceria preços mais acessíveis em comparação ao soro, além de apresentar menos risco de contaminação (86).

O grande interesse na saliva como fluido diagnóstico tem levado à padronização de processos de coleta (81) e armazenamento (79, 87, 88) principalmente porque vários fatores podem afetar o fluxo e a composição tanto intra como interindividual (89, 90). Dentre esses fatores estão *status* fisiológico, medicação, alimentação, ritmo circadiano, gênero, idade, a própria constituição do sangue e o grau de atividade das glândulas salivares (91).

1.4 SEPARAÇÃO DE PROTEÍNAS POR ELETROFORESE

Para separação de proteínas por eletroforese unidimensional (1- DE) -*Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) e bidimensional (2- DE), as moléculas devem ser inicialmente isoladas de materiais biológicos, tais como tecidos e fluidos corporais. A extração adequada de proteínas é fundamental para obtenção de bons resultados eletroforéticos (91).

A eletroforese em gel 1- DE em condições de desnaturação tem várias vantagens: praticamente todas as proteínas são solúveis em SDS, permitindo a sua separação e abrange um valor relativamente elevado de massas moleculares (de 10000 a 300000 dalton- Da). No entanto, ao separar proteínas apenas em relação às massas moleculares, obtém-se informação limitada, uma vez que cada uma das bandas presente nos géis é frequentemente constituída por proteínas diferentes (92).

Na 2-DE usual, as proteínas são separadas em duas etapas consecutivas. Na primeira, denominada focalização isoeétrica (IEF), as moléculas migram em gel de poliacrilamida com gradiente de pH imobilizado ou gerado por tampões anfotéricos até atingirem um ponto (pH) no qual sua carga é igual a zero (ponto isoeétrico ou pI). Na segunda etapa, as proteínas são submetidas a uma eletroforese com direção perpendicular a IEF em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), e então separadas de acordo com sua massa molecular. Essa segunda etapa é similar à SDS-PAGE, na qual as moléculas são diretamente aplicadas no gel SDS-PAGE e separadas de acordo com seu tamanho (91).

A 2-DE é hoje a principal técnica de separação de proteínas utilizada antes da aplicação da amostra no espectrômetro de massas. Sua vantagem em relação a outras tecnologias é a capacidade de separar com alta resolução um grande número de proteínas de uma amostra complexa e a possibilidade de se fazer análise de expressão gênica por meio de comparação dos padrões proteicos (93). Em comparação com a SDS-PAGE, a 2-DE apresenta uma maior capacidade para separar misturas complexas. Enquanto que na SDS-PAGE as bandas proteicas tendem a se sobrepôr, os métodos unidimensionais de separação podem separar um número relativamente pequeno de proteínas (geralmente menos de 50). A 2-DE, ao combinar dois processos distintos de separação, pode ser usada para separar mais de 1000 proteínas num único gel (93).

Embora capaz de gerar muitas informações, as técnicas de SDS-PAGE e 2-DE possuem limitações. Uma das mais importantes é a presença de algumas proteínas em concentrações elevadas, especialmente em certos fluidos corporais, como é o caso da amilase e da mucina na saliva, que dificulta a migração eletroforética das menos abundantes (92). Outra limitação é a dificuldade na extração de proteínas intactas do gel para posterior análise, mas algumas tentativas têm sido feitas para contornar esse problema (91).

1.5 ESPECTROMETRIA DE MASSA

1.5.1 Definição

Espectrometria de massa (EM) é o termo utilizado para referir-se às técnicas envolvendo a ionização, separação e detecção de componentes moleculares em fase gasosa no intuito de determinar com acurácia a massa molecular, utilizando um espectrômetro de massa (94).

Basicamente, a EM consiste na ionização de átomos ou moléculas de uma amostra, na separação destes átomos ou moléculas em função da sua relação massa/carga (m/z) e em seguida sua identificação e quantificação. Essa técnica permite a resolução de diversas questões em química de proteínas, tais como: checagem da correção de uma sequência de aminoácidos, identificação de proteínas, determinação da fidelidade e homogeneidade de proteínas recombinantes, identificação de complexos proteicos não covalentes, detecção de doenças genéticas, identificação de modificações químicas em proteínas, sequenciamento de proteínas e peptídeos (95).

1.5.2 Análise de peptídeos e proteínas por espectrometria de massa

Diferentes abordagens da EM, baseadas em vários sistemas de ionização e detecção, têm sido desenvolvidas. Entre todas as técnicas de proteoma de uso atual, uma das mais utilizadas é a 2-DE e/ou a cromatografia líquida, acopladas à espectrometria de massas com base na dessorção e ionização das proteínas a laser, auxiliado por uma matriz do tipo MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*), que analisa a massa através do tempo de voo dos íons no tubo de análise TOF (*Time of Flight*) (93, 96).

MALDI-TOF tem sido utilizada com sucesso na investigação e identificação de proteínas e peptídeos, na identificação taxonômica de microrganismos, na genotipagem e análise de polimorfismos no DNA, na investigação de modificações pós-

transcricionais no RNA, dentre inúmeras outras aplicações (97, 98). Por se tratar de uma técnica de alta sensibilidade e de alto rendimento (uma amostra pode ser analisada em poucos minutos), novas abordagens vêm sendo desenvolvidas para atender a necessidade de diagnósticos rápidos e precisos para diversas doenças (79, 99).

O mesmo sistema pode ser utilizado, também, para identificar bactérias e fungos e substitui o sequenciamento de isolados não usuais no mesmo laboratório, proporcionando uma plataforma de trabalho consistente e racionalização eficaz em termos de custos. Além disso, MALDI-TOF permite eliminar ensaios bioquímicos complementares (100). Uma variante do MALDI, denominada SELDI (*Surface-enhanced laser desorption/ionization*) é geralmente empregada para análise de proteínas de baixo peso molecular (91).

Diante do vasto leque de oportunidades, pesquisas têm utilizado essa técnica para avaliar o perfil molecular da saliva, o nível de expressão proteica, bem como biomarcadores presentes na saliva e que podem estar alterados por doenças ou por intervenções terapêuticas (101, 102). Embora existam numerosos estudos de proteômica com base em EM em soro ou plasma, há um número limitado de estudos que envolvem a proteômica salivar (79).

1.6 PROTEÔMICA

1.6.1 Definição

O termo proteômica refere-se ao estudo do conjunto de moléculas, que são responsáveis direta ou indiretamente pelo de todos ou quase todos os processos biológicos (91). O estudo da proteômica não deve ser visto apenas como uma separação sistemática ou simples catalogação para estudar a expressão das proteínas no organismo, mas deve ser encarado como uma ferramenta para entender melhor como a estrutura das proteínas que se alteram e interagem com outras proteínas e,

também, como isso se reflete no processo de saúde e doença no organismo (81). O proteoma é dinâmico e seu perfil se altera de acordo com o status fisiológico e as fases da diferenciação celular (91).

1.6.2 Proteômica salivar

Durante décadas, proteínas e peptídeos salivares foram estudados com técnicas bioquímicas tradicionais, incluindo a cromatografia líquida, eletroforese em gel, eletroforese capilar, ressonância magnética nuclear e imunoenaios. A maioria dessas análises tem por objetivo investigar grupos salivares específicos. Nos últimos anos, tem-se intensificado os esforços a fim de obter análises completas das proteínas salivares e peptídeos com técnicas proteômicas (80).

Assim, a análise quantitativa e qualitativa do proteoma salivar é relevante para avaliação da saliva como um fluido corporal com valor potencial no diagnóstico, no monitoramento de resposta à terapia, na patogênese da doença, predição de desfecho clínico, classificação de subtipos de doenças, determinação de riscos, caracterização de vias metabólicas, quantificação de biomarcadores e geração de alvos terapêuticos (81, 91).

Como ocorre com qualquer fluido corporal, a saliva humana tem características específicas e algumas pesquisas recentes têm descrito o carácter distinto de seu proteoma (79, 83, 91). Até o momento, mais de 2.000 proteínas e peptídeos foram detectados na saliva humana (103). Mais de 90% deles derivam da secreção dos três pares de glândulas salivares maiores e pertencem às classes de proteínas ricas em prolina (PPR), α -amilases, mucinas, cistatinas, histatinas, estaterinas e P-B peptídeos (91). Os outros 10% dos componentes detectados na saliva são secretados por: glândulas salivares menores, células epiteliais descamativas, exsudados de tecido epitelial, fluido crevicular gengival e derivados dos microrganismos presentes na cavidade bucal (91).

Neste contexto, o proteoma salivar tem sido muito pesquisado na busca de potenciais biomarcadores para diferentes doenças bucais, como câncer de boca (104, 105), para detectar risco de cárie (106), doença periodontal (107), mas também para auxiliar no diagnóstico de doenças sistêmicas, tais como, câncer gástrico (108), diabetes tipos 1 e 2 (109, 110), câncer de mama (111), doenças pulmonares (112) e autismo (113).

1.6.3 Proteômica e doenças reumáticas

Convencionalmente, o estudo da resposta autoimune tem sido realizado através da análise da presença e/ou concentração de anticorpos individuais em fluidos biológicos. A proteômica possibilita medir um vasto número de analitos diretamente a partir do material biológico original, em pouca quantidade e sem preparação complexa da amostra. Isso torna o método viável sob o aspecto econômico por ser de simples execução, por reduzir o volume da amostra e dos reagentes necessários para análise. Além disso, permite a análise de várias amostras simultaneamente sob a supervisão de um único examinador em um curto espaço de tempo (100, 114).

Recentemente, foi realizada uma revisão sistemática a fim de identificar biomarcadores do LES utilizando a técnica da EM (39). Vinte e cinco estudos foram incluídos na revisão e detectados 241 candidatos biomarcadores proteômicos para o LES relacionados a vários aspectos da doença, incluindo diagnóstico e atividade da doença ou apontando envolvimento de algum órgão específico no processo patológico. Além disso, 13 dos 25 estudos validaram seus resultados para um número selecionado de biomarcadores em coortes independentes, resultando na validação de 28 candidatos biomarcadores. Vale ressaltar que 11 candidatos biomarcadores foram identificados em mais de um estudo (115-127). Dos 25 artigos selecionados, uma variedade de tipos de espécimes foi obtida de pacientes com LES para a análise. Isso pode ser atribuído à heterogeneidade clínica da doença, afetando quase todos os órgãos e tecidos. O soro foi o fluido biológico mais utilizado (9 dos 25 estudos) (39, 116-119, 128-131), seguido pelas células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) (6 dos 25 estudos) (121,

124, 126, 132-134), e plasma (3 de 25 estudos) (120, 135, 136). Teoricamente, soro ou plasma sanguíneo parecem ser ideais para análise, pois contém biomarcadores específicos para quase todas as doenças humanas, mas potenciais biomarcadores podem estar presentes em concentrações muito baixas nessas amostras (137). Três estudos examinaram o proteoma da urina (122, 125, 127) e dois analisaram o extrato proteico de biópsias renais (115, 138). Potencialmente biomarcadores urinário podem ser mais significativos à medida que refletem mais precisamente distúrbios renais, como a NL, do que os seus homólogos séricos. Na verdade, considera-se que a urina é potencialmente uma “biópsia líquida” do rim (139). Outro estudo examinou o proteoma de biópsias de pele, uma vez que a pele é um dos órgãos mais comumente afetados no LES (140). Finalmente, um estudo analisou o líquido cefalorraquidiano, pois o sistema nervoso pode ser afetado em pacientes com LES causando síndromes neuropsiquiátricas (123).

Em relação à AIJ, além das várias manifestações clínicas observadas entre os subtipos, há evidências de produção de diferentes citocinas e mediadores da doença diferenciados entre os grupos (53, 141, 142). Alguns estudos avaliaram a AIJ no nível de proteína utilizando diferentes espécimes como: líquido sinovial, plasma, soro e urina, demonstraram expressões de proteínas ligadas à identificação dos subtipos da AIJ (53, 56), atividade da doença (143, 144), resposta terapêutica (144), e também revelaram proteínas que diferenciavam as crianças com curso mais persistente da doença (145, 146). Foram encontradas apenas duas publicações em que se pesquisou biomarcadores salivares em pacientes adultos com AR. Nesses trabalhos, foram identificadas proteínas que poderiam ser utilizadas no diagnóstico da doença e na resposta terapêutica (147, 148).

Portanto, ao consultar em abril de 2013, no banco de dados de pesquisa bibliográfica do PubMed, os termos (“lupus erythematosus, systemic”[MeSH Terms] OR “lupus erythematosus, systemic”[All Fields]) AND “mass spectrometry”[MeSH Terms] AND (“saliva”[MeSH Terms] OR “saliva”[All Fields]) verificou-se ausência de publicações nessa linha de pesquisa. Igualmente, não foram encontrados resultados

ao consultar os termos: (("Juvenile idiopathic arthritis" [MeSH Terms]) AND "mass spectrometry"[MeSH Terms]) AND ("saliva"[MeSH Terms] OR "saliva"[All Fields]). Em maio de 2017 foi realizada a mesma consulta e, também, não foram detectados artigos nessa linha de pesquisa.

Diante do exposto, a análise das proteínas presentes na saliva poderia auxiliar no diagnóstico precoce e no monitoramento do LESJ, uma vez que muitos compostos encontrados no sangue e na urina também estão presentes na saliva (71, 83, 149).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar se o perfil proteico da saliva de pacientes com LESJ, na faixa etária de 9- 18 anos, difere entre os pacientes com AIJ e SDA.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar o perfil proteico salivar de pacientes com LESJ nas fases ativa e inativa.
- Traçar o perfil de saúde dos pacientes com LESJ através dos índices SLEDAI-2K e SLICC/ACR-DI.
- Avaliar as condições bucais dos pacientes através da presença de lesões na mucosa bucal e do índice CPO-D (índice de dentes cariados, perdidos e restaurados).
- Comparar o fluxo salivar entre os grupos.

3 MÉTODOS

Foi realizado um estudo transversal no Serviço de Reumatologia do Hospital Universitário de Brasília (HUB) e no Hospital da Criança de Brasília José de Alencar (HCB), onde crianças e adolescentes com doenças reumáticas encontravam-se em tratamento e acompanhamento. O estudo foi conduzido em conformidade com os princípios estabelecidos na Declaração de Helsinki da Associação Médica Americana e da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde. Esta pesquisa integra um projeto “guarda-chuva” intitulado: “Análise do Proteoma Salivar de Pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico, com e sem Nefrite Lúpica”. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa - Plataforma Brasil, Certificado de Apresentação para Apreciação Ética nº 25085114.6.0000.5558 (ANEXO E). Foram coletadas assinaturas dos responsáveis pelos pacientes através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE D) e dos adolescentes com 12 anos completos e menores de 18 anos através do Termo de Assentimento (APÊNDICE E).

3.1 DELINEAMENTO E POPULAÇÃO

Foram selecionados 94 participantes, na faixa etária entre 9 e 18 anos, sendo que os grupos de estudo foram compostos da seguinte maneira:

- a) 27 pacientes diagnosticados com LESJ em conformidade com os critérios estabelecidos pelo *ACR 1997* (38) e *SLICC 2012* (42).

Os pacientes com LESJ foram classificados de acordo com a atividade da doença através do SLEDAI-2K (45). A atividade da doença foi definida como SLEDAI-2K ≥ 1 , tendo sido consideradas as seguintes categorias de atividade, de acordo com o escore SLEDAI-2K: ausência de atividade (SLEDAI-2K = 0), atividade leve (SLEDAI-2K

= 1–5), atividade moderada (SLEDAI-2K = 6–10), atividade alta (SLEDAI-2K = 11–19) e atividade muito alta (SLEDAI-2K \geq 20) (150).

O dano cumulativo irreversível causado pelo LESJ e/ou pelo tratamento utilizado para a doença foi determinado pelo SLICC / ACR- DI (51). Valores desse escore acima de um, avaliados após seis meses de duração da doença, foram considerados como algum dano cumulativo da doença.

Os critérios de exclusão foram: presença concomitante de outra doença autoimune e pacientes com lúpus induzido por medicamentos (hidralazina e procainamida).

- b) 23 crianças e adolescentes com AIJ diagnosticados segundo os critérios de diagnóstico do ILAR (60) e na mesma faixa etária do grupo de estudo. Foram excluídos desse grupo pacientes que apresentavam outra doença autoimune concomitante.
- c) 44 crianças e adolescentes sem doença autoimune (SDA). Critérios de exclusão: sinais ou sintomas clínicos de doenças reumáticas autoimunes ou de outras doenças sistêmicas e histórico familiar de doenças sistêmicas crônicas.

3.2 SEQUÊNCIA DE ATENDIMENTO

1. Acolhimento dos pacientes, convite para participarem da pesquisa, aplicação do TCLE e/ou Termo de Assentimento (APÊNDICES D e E).
2. Preenchimento da ficha de clínica (APÊNDICE F).

A primeira parte da anamnese foi realizada pelo reumatologista pediátrico, onde foram anotados: o ano de início dos sintomas, o tempo de diagnóstico, as condições atuais do LES, os medicamentos em uso, outras alterações sistêmicas

existentes, a frequência cardíaca, pressão arterial, peso e altura. Além disso, foram pontuados o SLEDAI-2K (45) e o SLICC/ACR-DI (51).

A segunda parte da ficha era preenchida pelo cirurgião-dentista. Posteriormente, foi realizada coleta de saliva total sem estímulo e exame clínico bucal. Realizado por dois examinadores. Os materiais necessários para esse exame foram: espelho bucal, sonda exploradora, pinça clínica, rolete de algodão e gaze. Foram registradas alterações na mucosa bucal e realizado o índice CPO-D (151). Seu valor corresponde, num indivíduo, à soma do número de dentes cariados, perdidos e obturados/restaurados (151). Em seguida, os participantes receberam orientações relativas aos cuidados sistêmicos e bucais.

3.3 OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE SALIVA

3.3.1 Obtenção das amostras de saliva

As coletas de saliva total sem estímulo foram executadas sempre no período matutino (de 8h às 11h30) para minimizar os efeitos do ritmo circadiano.

Os pacientes foram instruídos a fazerem bochecho com água durante 30 segundos. Aguardou-se mais um minuto antes de iniciar a coleta. Após esse período, os participantes foram orientados a não movimentar a língua, bochechas e lábios, não conversar e deveriam depositar a saliva em recipiente descartável de polipropileno (tubo Falcon de 50 mL) sempre que desejassem durante 5 minutos.

3.3.2 Fluxo salivar

A medida da taxa do fluxo da saliva total sem estímulo foi realizada imediatamente após a coleta pesando-se a saliva em balança de precisão (Shimadzu®, modelo AX200) e dividindo-se o valor pelo tempo da coleta- 5 minutos. Posteriormente, os valores foram convertidos em mL/min (152).

3.3.3 Estocagem e conservação da saliva

Foram pipetadas 300 μ L de saliva e depositadas em tubos criogênicos de polipropileno que continham 0,6 μ L de coquetel inibidor de protease (PIC; P8340, Sigma, St. Louis, USA). As alíquotas foram armazenadas em botijão de nitrogênio líquido até o transporte ao laboratório a fim de minimizar a degradação proteica.

No laboratório, as amostras foram armazenadas em freezer com temperatura de -80 °C até o momento da análise.

3.3.4 Análise das proteínas salivares

A massa molecular das proteínas salivares foi determinada através de eletroforese 1- DE (SDS- PAGE) e a identificação das proteínas salivares foi realizada através do espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF/TOF (MicroFlex, Bruker Daltonics), que utiliza o MALDI como método de ionização e o TOF como analisador.

3.3.4.1 SDS- PAGE

Alíquotas de 20 μ g de proteína dos *pools* das amostras de saliva dos pacientes com LESJ, AIJ e SDA foram misturadas com tampão (Tris-HCl 80mM, SDS 2%, Glicerol 10%, Bromofenol 0,0006%, pH: 6.8). Em seguida, as amostras foram tratadas com DTT (50 mM) 5 minutos a 65°C e posteriormente com iodoacetamida (100 mM) 30 minutos a 300°C. Então, foram carregadas 15 μ L de cada amostra em gel de poliacrilamida a 12% (12 x 14 cm). A eletroforese foi executada a uma voltagem constante de 100 V.

Para a coloração dos géis, eles foram inseridos em solução de fixação [40%(v/v) etanol, 10%(v/v) ácido acético] por uma hora e, posteriormente, foram realizadas três lavagens com H₂O destilada 15 minutos cada um. Posteriormente, os géis foram corados com solução de Coomassie coloidal [10%(v/v) ácido fosfórico, 10% (w/v) sulfato de amônio, 0,12%(w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250] por 24 horas e descolados mediante lavagem com H₂O destilada.

3.3.4.2 Espectrometria de Massa

3.3.4.2.1 *Preparo da Matriz*

Como matriz de dessecção para todas as análises foi utilizado o ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (α -HCCA – matriz para MALDI-TOF MS, Bruker, ref. 8255344) em solução. A solução de matriz foi preparada na concentração final de 10 mg/mL de α -CHCA diluído em uma solução aquosa de acetonitrila a 70% (V/V) (AcN 80%, PA – J. T. Baker, CAS nº 75-05-8), água ultrapura e ácido trifluoroacético diluído a 3% (V/V) (TFA 99%, PA – Mallinckrodt Chemicals), na proporção de 5:4:1 (AcN:água:TFA).

3.3.4.2.2 *Preparo das Amostras de Saliva*

Para o preparo das amostras, foram seguidas as etapas seguintes:

- a) Os criotubos contendo as amostras de saliva foram descongelados em temperatura ambiente.
- b) Após as amostras descongeladas, os criotubos foram centrifugados a 2.500 rpm, temperatura de 4°C durante 10 minutos.
- c) Foram depositados em ependorfs 90 μ l de água Milli-Q e, em seguida, inseridos 10 μ l do sobrenadante da saliva centrifugada.
- d) Os ependorfs foram agitados manualmente para que o sobrenadante se misturasse com a água Milli-Q.

3.3.4.2.3 *Preparo das Amostras na Placa de MALDI*

- a) A placa de aço inoxidável foi lavada com água e solvente orgânico (metanol, 2-propanol ou acetonitrila) em uma capela de exaustão. O procedimento foi repetido pelo menos quatro vezes. As placas foram secas levemente com um lenço de papel de rugosidade baixa e que não liberasse partículas (line-free).

- b) Reservaram-se três spots na primeira linha da placa para aplicação da matriz pura, a fim de estabelecer correlação entre a razão m/z e o tempo de voo (91).
- c) Foi depositado 1 μ l do analito no centro de cada spot da placa. Foram aplicadas três posições consecutivas (triplicata) da mesma amostra. Esse procedimento foi repetido na aplicação de todas as amostras.
- d) Deixou-se a placa secar a temperatura ambiente por 20 a 30 minutos.
- e) Após a secagem, foi depositado 1 μ l de matriz no centro de cada spot e esperou-se secar à temperatura ambiente.

3.3.4.2.4 *Aquisição dos Espectros de Massa*

Os espectros obtidos foram gerados pelo programa MALDI Biotyper 2.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) com as configurações padrão para obtenção da identificação feita em organismo *Homo sapiens*; com RP (Refletido Positivo) de 600-5000 e LP (Linear Positivo) de 2000 a 20000. O parâmetro adotado para avaliação da qualidade dos espectros foi o efeito de distorção e elevação da linha de base na intercepção com o eixo das ordenadas (intensidades relativas) ou região próxima (valores m/z abaixo de 3.000), onde foi frequente a presença de picos de alta intensidade.

- a) A placa metálica foi introduzida no espectrômetro de massa de acordo com as indicações do fabricante do equipamento.
- b) A aquisição ocorreu no modo automático, linear, positivo, frequência laser de 60 Hz, 240 disparos de laser por espectro, faixa de variação para os valores m/z selecionada entre 2 e 20 kDa, modo de movimentação do laser em espiral, exceto para amostras reanalisadas na mesma placa (Item 4.3.iii) em que o movimento de varredura foi alterado para que os disparos atingissem áreas intactas.
- c) Os espectros foram gravados em formato definido pelo fabricante do equipamento.

- d) Foi realizada a seleção de espectros para a fragmentação e sequenciamento. Os espectros foram selecionados em correspondência a íons com razão sinal/ruído da ordem de 104 e que não tinham contaminantes em uma faixa de 0,4% a 0,6% (no eixo x, m/z).

3.3.4.2.5 *Análise dos Espectros*

Os espectros foram analisados pelo programa mMass versão 5.5 (Martin Strohm; www.mMass.org) (153). Calculou-se a média de espectros dos três analitos de cada paciente. O espectro médio (averaged spectra) foi calculado com a função *math operations*, abrindo-se todos os espectros da mesma amostra e escolhendo *average all visible*. Os espectros individuais que apresentaram mais de 30% de elevação da linha de base foram excluídos do cálculo do espectro médio. Os limites de intensidade relativa foram ajustados para 0,5% e 87% para altura de picos. Os limites para razão sinal/ruído e intensidade absoluta foram mantidos em 3,5%.

Para a análise estatística, foram consideradas as faixas de espectros que estavam presentes em pelo menos 80% dos casos de um dos grupos. A relação/intensidade dessas faixas foram comparadas entre os grupos.

3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram analisados com o software estatístico StatisticalPackage for Social Sciences (SPSS® versão 23.0 para Windows®, SPSS Inc. /IBM Group, Chicago, USA). Foram realizados testes pareados para hipóteses bi-caudais com nível de significância de 5%. A distribuição das frequências de dados contínuos foi testada com o Teste Kolmogorov-Smirnov. Foram utilizados o teste paramétrico ANOVA e o teste não-paramétrico de ANOVA de Friedman, seguidos de testes *post-hoc*. As análises de subgrupos foram realizadas com teste t de *Student* para amostras dependentes.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS

Foram avaliados 94 indivíduos, sendo 27 (29%) com LESJ, 23 (24%) com AIJ e 44 (47%) SDA, dos quais 59 (63%) eram do gênero feminino ($p = ,012$). A idade média (desvio padrão) foi de 13,9 ($\pm 2,4$) anos ($p = ,249$) variando de 9 a 18 anos. O peso médio foi de 53,2 ($\pm 11,5$) kg ($p = ,886$) e altura de 1,60 ($\pm 0,12$) m ($p = ,059$). A cor declarada por 57,4% dos participantes foi parda ($p < ,0001$).

A frequência cardíaca observada foi de 81 (± 11) batimentos por minuto ($p = ,071$). A pressão sistólica e diastólica foram respectivamente 111 (± 12) ($p = ,048$) e 70 (± 11) mmHg ($p = ,005$). A diferença da sistólica e diastólica foi estatisticamente significativa quando comparada entre indivíduos com LESJ e AIJ ($p = ,043$ e $p = ,004$, respectivamente) (Tabela 1).

Tabela 1- Características demográficas

	Grupo			p - valor
	SDA n = 44	LESJ n= 27	AIJ n= 23	
Idade (DP)	13,6 ($\pm 2,3$)	14,8 ($\pm 2,3$)	13,8 ($\pm 2,3$)	0,249
Gênero feminino (%)	22 (50)	23 (85)	14 (61)	0,012
Frequência cardíaca (DP)	79 ($\pm 11,4$)	84 ($\pm 9,7$)	83 ($\pm 8,9$)	0,071
Pressão sistólica	111(± 10)	116 (± 15)	106 (± 9)	0,048
Pressão diastólica	69 (± 8)	76 (± 12)	65 (± 10)	0,005
Peso	53 (± 10)	53 (± 13)	52 (± 11)	0,886
Altura	162 (± 12)	155 (± 11)	161 (± 13)	0,059
Cor declarada (%)				< 0,001
branca	27 (61)	2 (7)	3 (13)	
parda	14 (32)	22 (81)	18 (78)	
preta	3 (6)	3 (12)	2 (9)	

4.2 CARACTERÍSTICAS ODONTOLÓGICAS

A mediana (percentis 25 e 75) do fluxo salivar sem estímulo foi de 0,52 (0,32 – 0,70) mL/min ($p = ,268$), sendo que no grupo com LESJ a mediana foi de 0,47 (0,25 - 0,66); na AIJ 0,58 (0,34 - 0,90) e no SDA 0,53 (0,35 - 0,69).

Enquanto que a mediana (percentis 25 e 75) do índice CPO-D foi de 1 (0 – 3) ($p = ,215$) (Figura 1). O uso de aparelho ortodôntico foi observado em 28% dos avaliados. Somente 2 (2%) participantes apresentavam lesão em tecido mole. Uma paciente com LESJ com leucoplasia em palato mole (SLEDAI-2K de 16 e SLICC/ACR-DI = 0) e um indivíduo com AIJ oligoarticular com úlcera aftosa (dados não demonstrados).

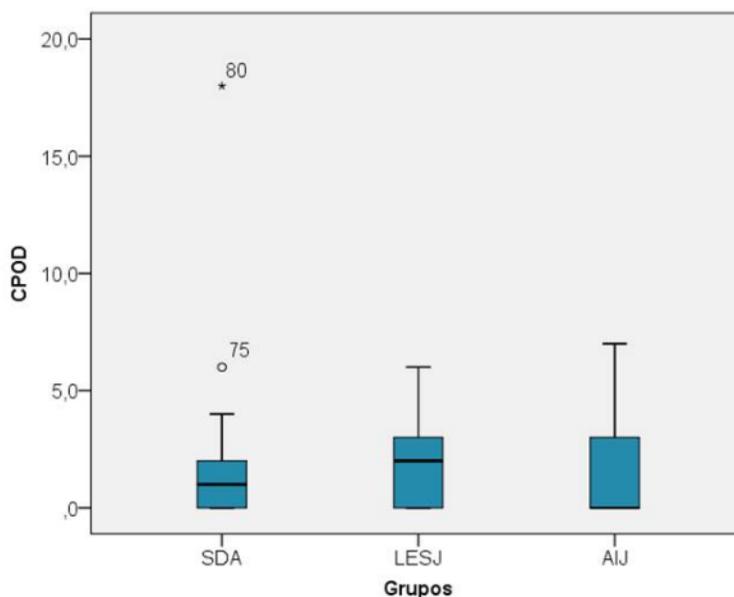


Figura 1- Análise comparativa do índice CPO-D.

4.3 USO DE MEDICAMENTOS

Verificou-se que 48 (51,1%) participantes faziam uso de medicamentos, sendo 2 (7,4%) do grupo SDA, todos os pacientes com LESJ e 19 (82,6%) com AIJ ($p < ,001$). A hidroxicloroquina foi a droga utilizada por um número maior de pacientes com LESJ (85,2%) quando comparado com pacientes com AIJ (0%) ($p < ,001$). A droga utilizada por um número maior de pacientes com AIJ foi metotrexato (69,6%) ($p < ,001$). Cálcio e prednisona foram os medicamentos de segundo maior uso nos pacientes com LESJ e AIJ ($p = ,0017$ e $p < ,001$). A vitamina D foi utilizada somente em 3 pacientes com LESJ ($p = 0,24$) (Tabela 2).

Tabela 2- Análise descritiva dos medicamentos utilizados nos pacientes com LESJ e AIJ

	Grupo				p - valor
	SDA n = 44	LESJ n= 27	AIJ n= 23	Total n = 94	
Sob uso de medicamento (%)	2 (4,5)	27 (100)	19 (82,6)	48 (51,1)	< ,001
Ácido fólico	0	2 (7,4)	7 (30,4)	9 (9,6)	0,021
Adalimumabe	0	0	1 (4,3)	1 (1,1)	0,460
Azatioprina	0	3 (11,1)	0	3 (3,2)	0,149
Cálcio	0	22 (81,5)	11 (47,8)	33 (35,1)	0,017
Ciclofosfamida	0	2 (7,4)	0	2 (2,1)	0,493
Enalapril	0	5 (18,5)	0	5 (5,3)	0,054
Etanercept	0	0	8 (34,8)	8 (8,5)	0,001
Furosemida	0	2 (7,4)	0	2 (2,1)	0,493
Leflunomida	0	0	1 (4,3)	1(1,1)	0,46
Losartana	0	1 (3,7)	0	1 (1,1)	0,351
Hidroxicloroquina	0	23 (85,2)	0	23 (24,5)	< ,001
Metotrexato	0	3 (11,1)	16 (69,6)	19 (20,2)	< ,001
Micofenolato	0	9 (33,3)	0	9 (9,6)	0,002
Omeprazol	0	19 (70,4)	9 (39,1)	28 (29,8)	0,027
Prednisona	0	22 (81,5)	6 (26,1)	28 (29,8)	< ,001
Vitamina D	0	3 (11,1)	0	3 (3,2)	0,24
outros	3 (6,8)	11 (40,7)	4 (17,4)	18 (19,1)	0,152

4.4 SDS- PAGE

A eletroforese 1- DE não apresentou diferença visual entre as bandas dos grupos avaliados (Figura 2).

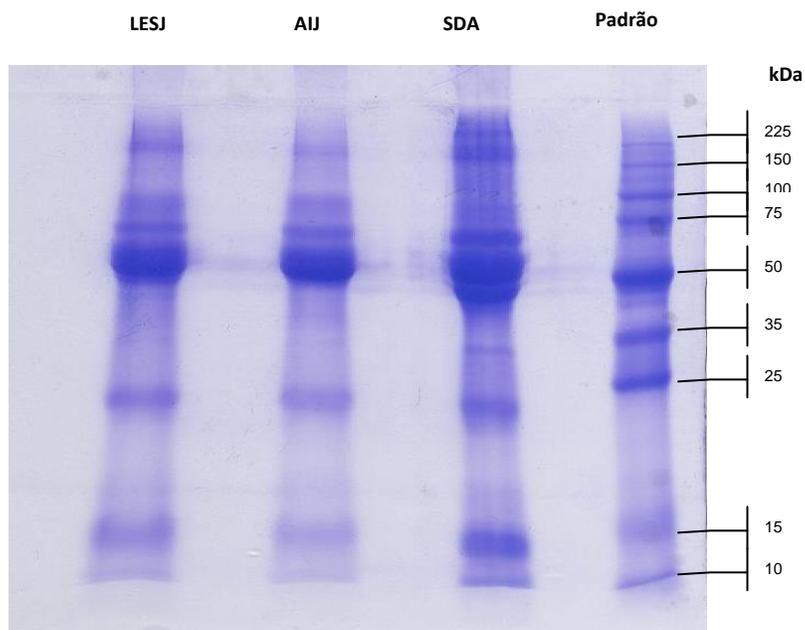


Figura 2- Gel representativo do fracionamento de proteínas por SDS-PAGE, correspondente ao *pool* da saliva de pacientes com LESJ, AIJ, SDA e o padrão de massa molecular, respectivamente.

4.5 FAIXAS DE ESPECTROS IDENTIFICADOS

4.5.1 Avaliação do *Pool* de Saliva

A EM revelou diferenças expressivas no *pool* do grupo SDA em relação aos grupos com doença com aumento nos picos dos espectros: 1224.5036 m/z (cerca de 9 vezes maior que o pico do LESJ) (Figura 3), 1315.5853 m/z (cerca de 40 vezes maior que o pico do LESJ) (Figura 4), 1731.6880 m/z (cerca de 70 vezes maior que o pico do

LESJ) (Figura 5) e 1866.7644 m/z (cerca de 30 vezes maior que o pico do LESJ) (Figura 6).

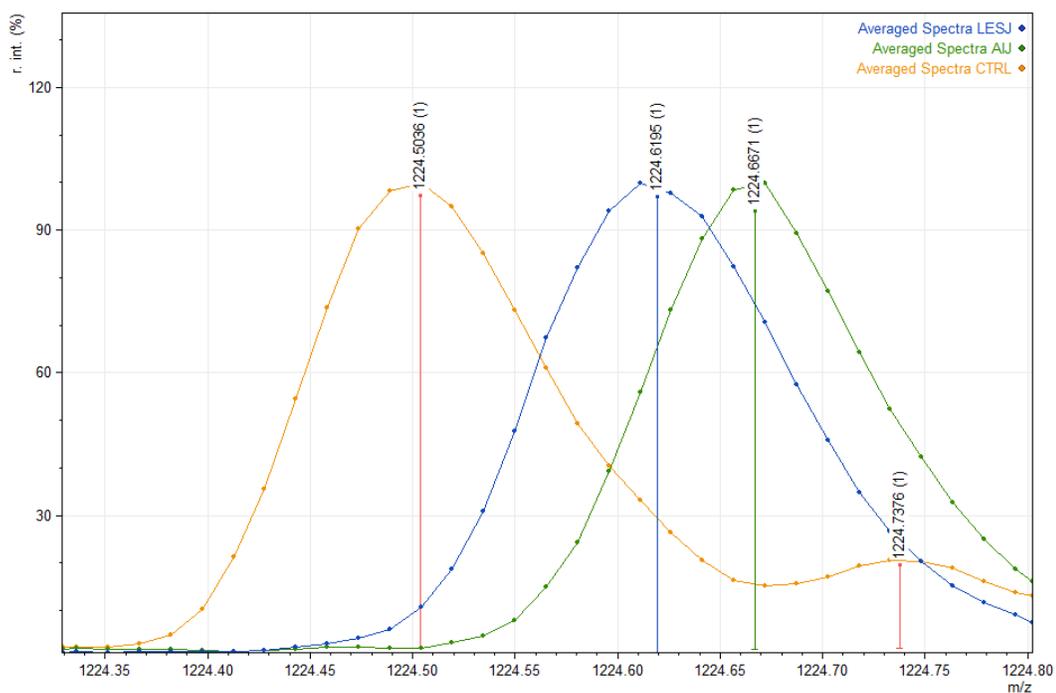


Figura 3- Faixa de espectro de 1224.5036 a 1224.7376 m/z do *pool* de saliva de pacientes com LESJ, AIJ e SDA (CTRL).

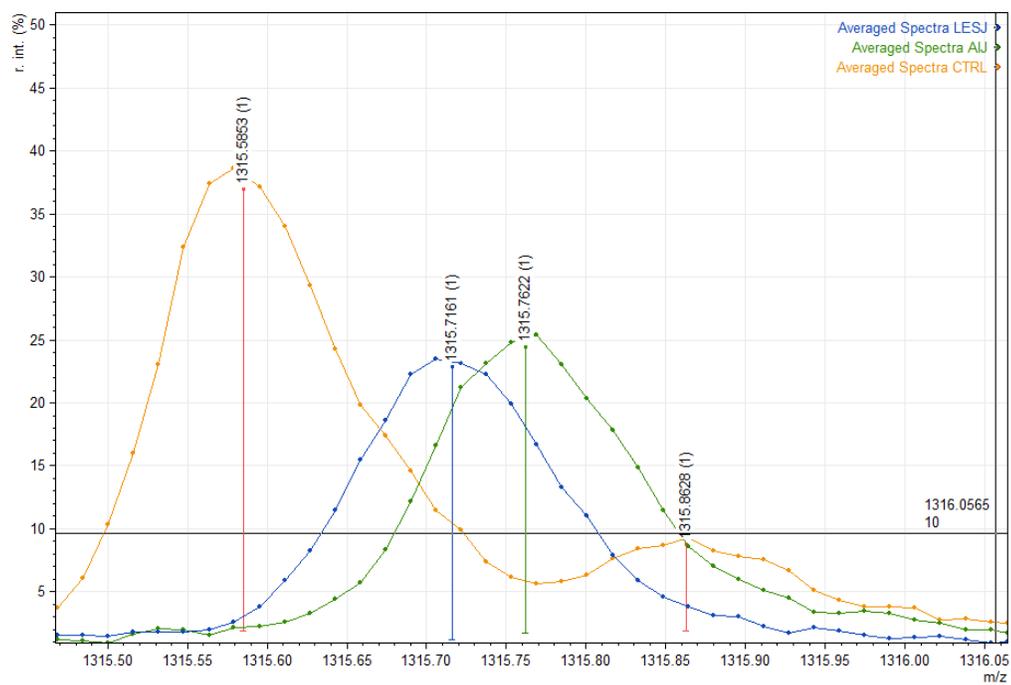


Figura 4- Faixa de espectro 1315.5853 a 1315.8628 m/z do *pool* de saliva de pacientes com LESJ, AIJ e SDA (CTRL).

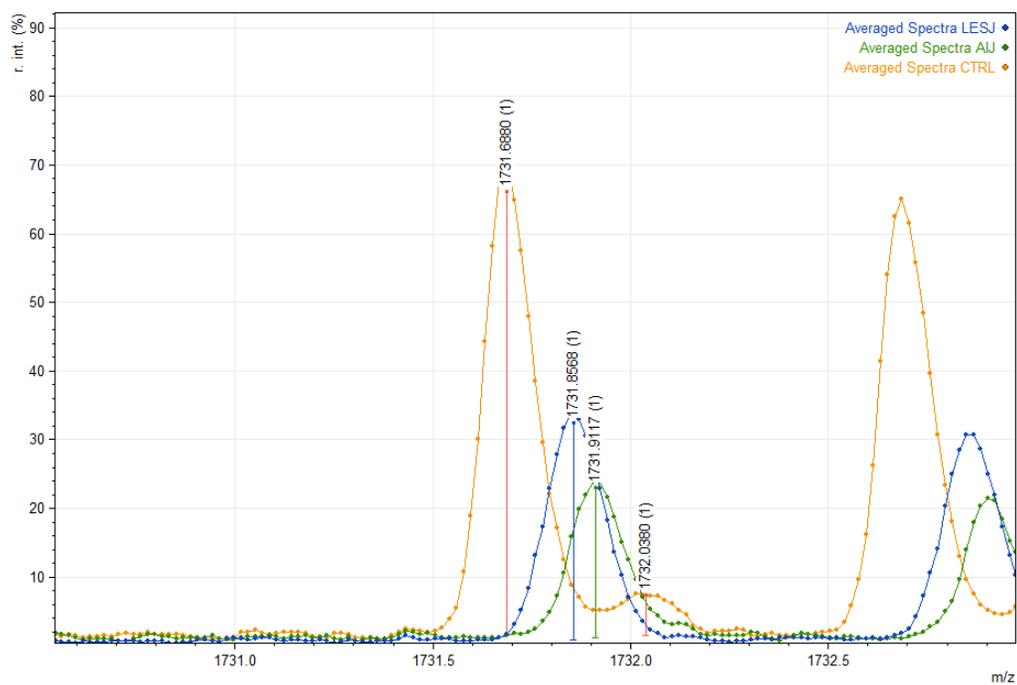


Figura 5- Faixa de espectro 1731.6880 a 1732.0380 m/z. do *pool* de saliva de pacientes com LESJ, AIJ e SDA (CTRL).

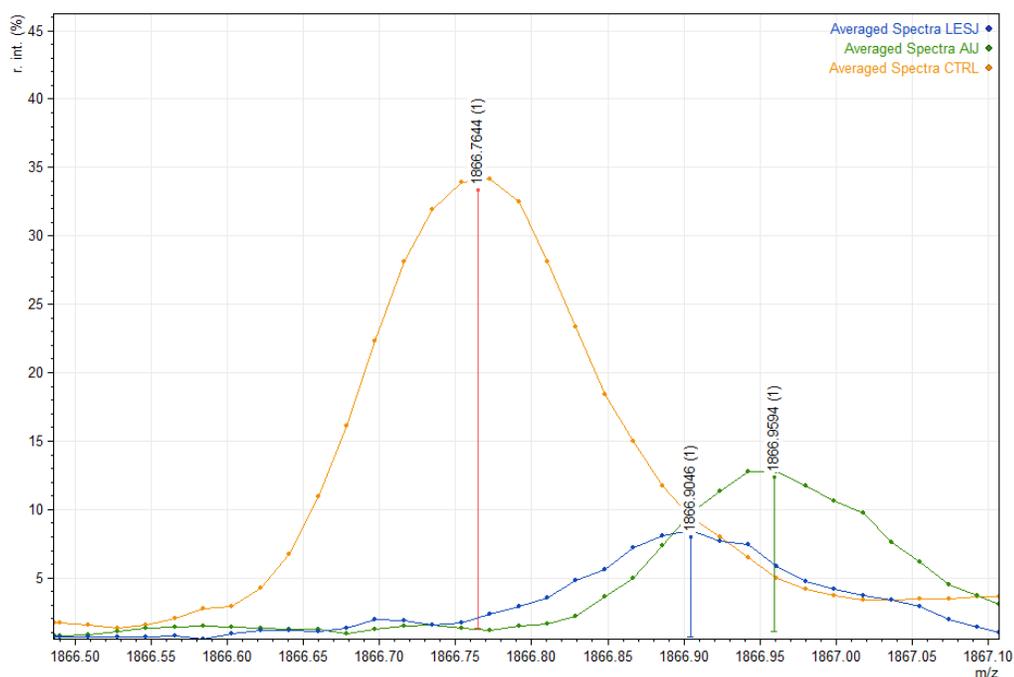


Figura 6- Faixas de espectro 1866.7644 a 1866.9594 m/z do *pool* de saliva de pacientes com LESJ, AIJ e SDA (CTRL).

4.5.2 Avaliação Individual das Amostras por Grupo

Ocorreu falha na aquisição de 14 amostras (15%), sendo 4 do grupo SDA, 4 com LESJ e 6 com AIJ.

A média da relação/intensidade (95% intervalo de confiança) da faixa de massa/carga de 1315.6027 a 1315.7536 apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = ,037$), onde o grupo SDA apresentou maior média de relação/intensidade 41,3 (31,8 – 50,7) quando comparada à do grupo LESJ 20,5 (15,1 – 25,9) ($p = ,026$) (Tabela 3).

Tabela 3- Análise de correlação das faixas de espectros entre os grupos

		Intervalo de confiança de 95% para média			<i>p</i> -valor*
		Média	Limite inferior	Limite superior	
e_990.4237_990.5418	SDA	40,0	32,6	47,4	0,262
	LESJ	32,7	24,3	41,1	
	AIJ	45,1	33,3	56,9	
e_1106.4907_1106.6151	SDA	5,7	4,2	7,1	0,211
	LESJ	3,3	1,6	5,1	
	AIJ	4,9	3,0	6,8	
e_1107.4678_1107.6341	SDA	16,9	12,0	21,8	0,900
	LESJ	16,4	1,1	31,7	
	AIJ	19,1	9,0	29,2	
e_1224.4718_1224.7613	SDA	84,2	75,5	92,8	0,267
	LESJ	94,3	86,0	102,6	
	AIJ	88,2	77,4	98,9	
e_1315.6027_1315.7536	SDA	41,3	31,8	50,7	0,037*; 0,026†; 0,638‡; 0,420+
	LESJ	20,5	15,1	25,9	
	AIJ	33,4	19,1	47,6	
e_1471.5897_1471.8495	SDA	49,5	38,3	60,7	0,769
	LESJ	51,3	29,4	73,3	
	AIJ	57,2	36,2	78,2	
e_1731.6166_1731.9945	SDA	32,2	25,9	38,5	0,323
	LESJ	41,1	29,7	52,5	
	AIJ	36,5	24,7	48,3	

* *One-way* ANOVA com teste *post-hoc* com nível de significância de 5%.

† Grupo SDA versus LESJ; ‡ grupo SDA versus AIJ; +LESJ versus AIJ

4.6 CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES COM LESJ

Dos 27 pacientes avaliados, verificou-se que a mediana (percentis 25 e 75) de tempo para elaboração do diagnóstico inicial da doença foi de 36 meses (12 – 62). Quanto à condição do LESJ, 40,91% apresentavam LES e NL (Figura 7). Em relação ao SLEDAI-2K, a mediana foi 1 (0 e 4,5), sendo que 52% (n=12) estavam na fase inativa da doença; 30% (n=7) atividade leve; 9% (n=2) atividade moderada e 9% (n=2) atividade alta (Figura 8) . Quanto ao SLICC/ACR-DI, verificou-se que a mediana foi 0 (0 - 1) (Tabela 4).

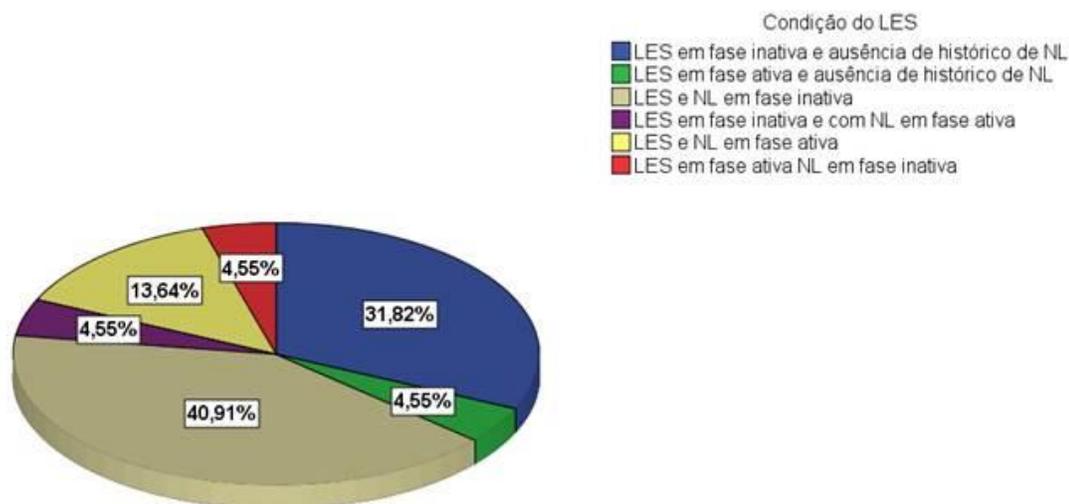


Figura 7- Distribuição da frequência do LESJ

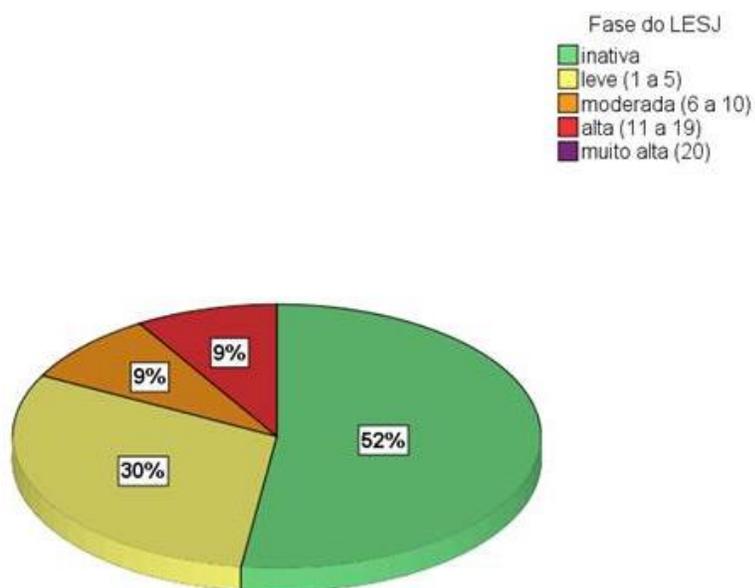


Figura 8- Distribuição das frequências da atividade do LESJ

Tabela 4- Índice de dano acumulado nos pacientes com LESJ, medido através do SLICC/ACR-DI

Domínio	n = 27 (%)
ocular	3 (11)
neuropsiquiátrico	2 (7)
renal	0
pulmonar	0
cardiovascular	2 (7)
vascular periférico	0
gastrointestinal	0
musculoesquelético	1 (4)
dermatológico	0
falência gonadal	0
diabetes	0
malignidade	0

O fluxo salivar dos pacientes que se encontravam na fase ativa foi de 0,44 mL/min ($\pm 0,29$) enquanto que nos da fase inativa foi de 0,55 mL/min ($\pm 0,25$) ($p = 0,358$).

Constatou-se que dos 23 pacientes em que os espectros foram avaliados, 11 (48%) encontravam-se na fase ativa da doença. Nenhuma diferença estatisticamente significativa em relação ao uso de medicamentos (Tabela 5). Em relação às faixas dos espectros identificados, a faixa de 1471.5897 a 1471.8495 apresentou diferença estatisticamente significativa ($p = ,010$) em relação à atividade do LESJ (Figura 9).

Tabela 5- Análise descritiva e comparativa dos medicamentos utilizados pelos pacientes com LESJ nas fases ativa e inativa

		LESJ			p - valor
		Ativa n = 11	Inativa = 12	n Total n = 23	
Sob uso de medicamento (%)	Ácido fólico	0	1 (8)	1 (4)	1
	Azatioprina	1 (9)	2 (17)	3 (13)	1
	Cálcio	9 (82)	9 (75)	18 (78)	1
	Ciclofosfamida	1 (9)	1 (8)	2 (9)	1
	Enalapril	1 (9)	2 (17)	3 (13)	1
	Furosemida	1 (9)	1 (8)	2 (9)	1
	Losartana	1 (9)	0	1 (4)	0,478
	Hidroxicloroquina	10(91)	9 (75)	19 (83)	0,59
	Metotrexato	0	2 (17)	2 (9)	0,478
	Micofenolato	4 (36)	3 (25)	7 (30)	0,667
	Omeprazol	8 (73)	9 (75)	17 (74)	1
	Prednisona	8 (73)	11 (92)	19 (83)	0,317
	Vitamina D	2 (18)	0	2 (9)	0,217

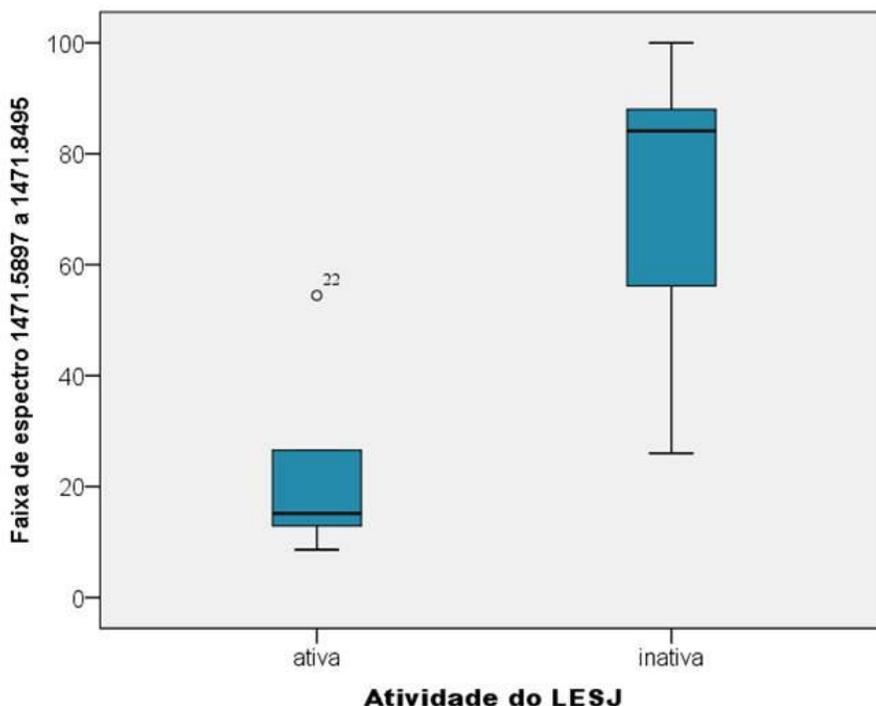


Figura 9- Análise comparativa da faixa de espectros em relação às fases do LESJ

4.7 CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES COM AIJ

Foram avaliados os espectros de massa da saliva de 17 pacientes com AIJ. Desses, 52,9% possuíam AIJ poliarticular com FR negativo e não havia nenhum paciente classificado com AIJ sistêmica, psoriásica ou indiferenciada. O fluxo salivar médio (desvio padrão) dos pacientes (n) classificados com AIJ poliarticular com FR negativo (n=9), com FR positivo (n=2), oligoarticular (n=5) e relacionada à entesite (n=1) foram 0,76 mL/min ($\pm 0,37$), 0,54 ($\pm 0,50$), 0,55 ($\pm 0,18$) e 2,7, respectivamente ($p = ,473$) (desconsiderando o único caso de AIJ relacionado à entesite). Em relação às faixas dos espectros identificadas, nenhuma apresentou diferença estatisticamente significativa

em relação à classificação da AIJ. O uso de medicamentos não apresentou diferença estatisticamente significativa (Tabela 6).

Tabela 6- Análise descritiva e comparativa dos medicamentos utilizados pelos pacientes com AIJ e seus subtipos

		AIJ				Total n = 17	p - valor
		Poliarticular FR negativo (n = 9)	Poliarticular FR positivo (n = 2)	Oligoarticular (n = 5)	Relacionada à entesite (n = 1)		
Sob uso de medicamento (%)	Ácido fólico	2 (22,2)	2 (100)	1 (20)	0	5 (29,4)	0,109
	Adalimumabe	1 (11,1)	0	0	0	1 (5,9)	0,723
	Cálcio	3 (33,3)	2 (100)	2 (40)	1 (100)	8 (47,1)	0,15
	Etanercept	4 (44,4)	1 (50)	0	0	5 (29,4)	0,141
	Leflunomida	1 (11,1)	0	0	0	1 (5,9)	0,723
	Metotrexato	5 (55,6)	2 (100)	3 (60)	1 (100)	11 (64,7)	0,395
	Omeprazol	5 (55,6)	1 (50)	2 (40)	1 (100)	9 (52,9)	0,65
	Prednisona	3 (33,3)	2 (100)	0	0	5 (29,4)	0,061

5 DISCUSSÃO

Foi realizado um estudo transversal em que se buscou avaliar o perfil proteico da saliva de pacientes com LESJ e comparar entre pacientes com AIJ e SDA. Optou-se por acrescentar um grupo de pacientes com AIJ porque, assim como o LESJ, ela é uma doença reumática autoimune difusa do tecido conjuntivo (154) e poderia servir como parâmetro de comparação para analisar as atividades inflamatórias das doenças.

Inicialmente, foram avaliadas as características demográficas dos grupos. Dos 27 pacientes com LESJ, a proporção entre os gêneros feminino/masculino foi de 8:1, o que é similar à proporção revisada na literatura (14). A distribuição da doença é universal, mas observa-se maior incidência em afro-americanos, asiáticos e índios-americanos. Neste estudo, 81% (n=22) dos pacientes com LESJ foram declarados pardos, 12% (n=3) negros e apenas 7% (n=2) brancos.

É importante ressaltar que no Brasil a cada 100 crianças, duas vão a consultas médicas devido a queixas reumatológicas. Muitas vezes, a doença demora a ser identificada e a criança é avaliada por no mínimo 4 médicos de especialidades diferentes o que pode atrasar o diagnóstico por cerca de até um ano (155). Apenas 10-15% de todos os casos de LES são diagnosticados durante a infância (156). O tempo desde o início dos sintomas até o diagnóstico varia de um mês a 3,3 anos (7, 27). Nossos resultados corroboram com esse período, uma vez que o tempo médio transcorrido para a elaboração do diagnóstico inicial do LESJ foi de 3,4 anos. Destaca-se que dos 27 pacientes com LESJ, somente 4 pacientes tiveram seu diagnóstico formulado antes de 1 ano e que 10 pacientes, após 4 anos. Observou-se que o diagnóstico de um paciente demorou mais de sete anos. Tal atraso pode ser provavelmente explicado em decorrência da precariedade do serviço público de saúde brasileiro. Outro aspecto a ser mencionado, refere-se ao baixo nível de escolaridade da população geral que costuma acessar esse serviço. Levantamento epidemiológico realizado por nossa equipe em pacientes adultos com LES, atendidos no Ambulatório

de Reumatologia do HUB constatou que o tempo médio de estudo foi de 10 anos (dado ainda não publicado). Portanto, caberia supor que a baixa escolaridade dos responsáveis de crianças com LESJ poderia explicar eventual desatenção com os sinais e sintomas da doença; retardando, assim, a busca por atendimento médico. O diagnóstico precoce de LES está associado, geralmente, a taxas mais baixas de surtos da atividade da doença, menor utilização dos serviços de saúde (19).

Devido à dificuldade no diagnóstico precoce, muitas vezes o início do tratamento é tardio o que agrava o quadro clínico. Além disso, geralmente, o LESJ está associado às comorbidades e à mortalidade dos pacientes (7). A nefrite lúpica (NL) é mais frequente em pacientes com LESJ do que em adultos com LES, sendo a principal responsável pela maior morbidade/mortalidade observada na população pediátrica (13). O envolvimento renal ocorre em 29% a 80% dos casos de LESJ e apresentam-se, geralmente, nos primeiros dois anos da doença (13, 27). Em nosso estudo, observamos que 64% dos pacientes com LESJ apresentavam histórico de NL.

O LESJ é uma doença caracterizada por períodos de atividade e de inatividade (13). O índice SLEDAI é um índice global que mede a atividade do LES, é considerado um índice reprodutível e de fácil utilização na prática clínica (1, 44). Uma modificação deste índice é o SLEDAI-2K. Nesse índice, os testes laboratoriais não são avaliados e o escore maior ou igual a um é considerado para doença ativa (45).

Estudo de coorte conduzido com 109 crianças indianas constatou que na avaliação realizada no 48º mês (44 crianças avaliadas), a mediana do SLEDAI- 2K teve escore 0 e variou de 0 a 50 (157). Outro trabalho realizado com 37 crianças canadenses evidenciou que a média do SLEDAI- 2K inicial foi de 13 e após um ano reduziu para 2,9 (27). Outro estudo conduzido com 102 crianças israelenses apresentou média do SLEDAI- 2K de 17 que reduziu para 7,6 após cinco anos (158).

Os pacientes examinados em nosso estudo já se encontravam em acompanhamento especializado e os prontuários evidenciaram dados incompletos quanto à atividade da doença. Além disso, o critério para avaliação de atividade da

doença não era o SLEDAI-2K. Assim, não temos o índice inicial dos pacientes para comparar com os dados atuais. Ao avaliarmos a atividade da doença com o índice SLEDAI-2K, verificamos que a mediana foi 1, variando de 0 a 16. Ou seja, a maioria dos pacientes do nosso estudo encontrava-se na fase ativa, porém com escore de intensidade leve. Ressaltamos a presença de somente dois pacientes com escore superior a 10, que significa alta atividade da doença. Portanto, pode-se constatar um melhor quadro de saúde da amostra estudada quando comparada aos estudos citados. Assim, pode-se observar que o acompanhamento médico especializado do paciente promove um controle expressivo da atividade da doença. Isto representa maior qualidade de vida, bem como economia na esfera pública e privada (20-24).

A avaliação dos danos irreversíveis decorrentes do LESJ foi realizada através do SLICC/ACR-DI (45). Esse índice tem valor prognóstico e define os danos permanentes provocados pelo LESJ e pelos medicamentos utilizados ou comorbidades associadas (13). Considera-se que há algum dano cumulativo decorrente da doença quando os pacientes são avaliados após seis meses de duração do LESJ e o valor desse escore é superior ou igual a um. Nesta pesquisa, verificou-se mediana 0 (0 – 1), sendo que apenas dois pacientes (7%) apresentavam índice 2, o que indica que poucos pacientes apresentavam sequelas decorrentes da doença.

As doenças reumáticas/ autoimunes comumente são acompanhadas por manifestações orofaciais que podem ser um dos sinais iniciais da enfermidade. As úlceras em mucosa bucal, palato mole, palato duro, lábios, gengiva e septo nasal têm incidência de 21 a 50% nos pacientes com LESJ (14). Mas, podem apresentar-se como lesões eritematosas, ulceradas, estomatites aftosas recorrentes ou lesões semelhantes a líquen plano ou leucoplasia (159). Entretanto, verificamos somente um caso de leucoplasia no palato mole em que a paciente encontrava-se na fase ativa tanto do LESJ como da NL (SLEDAI-2K= 16 e SLICC/ACR-DI=0).

As úlceras aftosas recorrentes são alterações relativamente comuns em pacientes com doenças reumáticas e autoimunes (160). Em geral, são dolorosas e

podem causar morbidade significativa, dependendo da localização, duração e frequência (161). Além disso, vários medicamentos podem causar essas lesões. Inclusive, um estudo de revisão narrativa forneceu uma lista com mais de 80 medicamentos utilizados no tratamento de doenças reumáticas e que podem provocar úlceras orais (160). Com base nessa relação de medicamentos, observou-se que os fármacos que poderiam provocar lesões aftosas utilizados pelos nossos pacientes com LESJ foram: azatioprina n=3 (11,1%), enalapril n= 5 (18,5%), losartana n=1 (3,7). Enquanto que a Leflunomida foi utilizada por um paciente com AIJ. O Metotrexato foi usado em 3 (11,1%) pacientes com LESJ e 16 (69,6%) com AIJ, e também pode gerar lesão bucais. No entanto, foi observado somente um participante com AIJ oligoarticular com lesão característica de úlcera aftosa, esse paciente estava sob uso de Metotrexato 15 mg uma vez por semana.

Para avaliar a condição dentária, foi utilizado o índice CPO-D que é largamente utilizado em levantamentos epidemiológicos de saúde bucal e preconizado pela Organização Mundial de Saúde (151). Além disso, é o índice mais difundido e utilizado em todo o mundo para conhecer a situação da cárie dentária numa determinada comunidade, para realizar avaliações com base epidemiológica e, também, para fazer comparações no tempo e no espaço (162). Estudo brasileiro que comparou a condição de saúde bucal de 14 pacientes com AIJ e de indivíduos sem doença; verificou média de CPO-D de 2,4 e não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (163). Outro trabalho nacional, que avaliou o índice CPO-D em 20 pacientes com LESJ e comparou com participantes sem doença; também não constatou diferença significativa entre os grupos (164). Nossos resultados, também não identificaram diferença no índice CPO-D entre os grupos, a mediana foi de 1 (0 – 3). O índice foi considerado bastante favorável nos três grupos, o que pode ser explicado pelo bom acesso dos pacientes aos serviços de Odontologia disponíveis nas Unidades de Atendimento em que foi realizada a pesquisa.

Ao longo dos últimos anos, tem havido grande crescimento do interesse por testes de diagnóstico menos invasivos como substitutos aos exames de sangue

convencionais. Nesse contexto, a saliva, por apresentar grande variedade de moléculas faz com que esse fluido seja uma fonte atraente de pesquisa para identificação de possíveis biomarcadores (78). Ressaltam-se, ainda, que a coleta é fácil, indolor e sem implicações de risco ao paciente (81, 83, 88).

Neste estudo, optou-se por realizar coleta de saliva total ao invés de glândulas específicas. Isto decorre do fato que a maioria das pesquisas que utilizam a técnica da EM empregam esse método de coleta (79-81). Além disso, a coleta de saliva total é presumivelmente o somatório da composição do fluido de todas as glândulas salivares maiores e menores, bem como de fluidos dos tecidos mucosos e periodontais. Todos esses componentes poderão atuar como material para estudo de biomarcadores. (79). Ademais, a coleta de saliva total é mais simples, rápida e requer menos custo com materiais/ equipamento quando comparada à coleta de glândulas salivares individuais (149).

O estudo da saliva total pode ser realizado com ou sem estímulo (75). Saliva estimulada pode ser coletada mais facilmente e em volumes mais elevados. No entanto, é predominantemente derivada das glândulas parótidas e consiste, principalmente, de água. Os principais componentes orgânicos da saliva são obtidos sem estímulo e são majoritariamente oriundos das glândulas submandibulares e sublinguais (72, 79). Por esses motivos, utilizou-se saliva total sem estímulo neste estudo.

O protocolo para a coleta de amostras de saliva deve ser padronizado, a fim de minimizar os efeitos de algumas das variáveis que causam variações intraindividuais (89). Por isso, deve-se restringir ingestão dietética por pelo menos uma hora antes da coleta, adquirir as amostras em um período determinado para se evitar variações do ritmo circadiano (79). Tais procedimentos foram adotados neste estudo.

No entanto, não é realista tentar controlar alguns outros fatores que afetam composição da saliva, como medicamentos em uso regular pelos pacientes (149). Até mesmo as diferenças na microbiota bacteriana normal da cavidade oral podem causar alterações no conteúdo proteico da saliva intra e inter indivíduos. Isso ocorre devido à

presença de enzimas bacterianas que catalisam as reações das proteínas salivares (165). Nesta pesquisa, não houve diferença dos índices CPO-D entre os grupos avaliados o que é um dado favorável, pois reduz a variação interindividual na composição molecular da saliva provocada por alguns agentes bacterianos.

A hipossalivação e a xerostomia são bem relatadas em adultos com AR (166). Porém, cerca de um terço dos pacientes com AR apresentam Síndrome de Sjögren secundária (SSs) a qual está associada à insuficiência secretora das glândulas salivares e, conseqüentemente, ao baixo fluxo salivar (167). O diagnóstico precoce e o monitoramento apropriado da SSs associada ao LES e à AR são importantes medidas para promover ganhos na qualidade de vida dos pacientes (159). Estudo com 604 pacientes adultos com AR indicou uma diminuição do fluxo salivar em 43% dos indivíduos (168). Informação sobre o fluxo e composição salivar em crianças com LESJ e AIJ não são bem relatadas (169). Pesquisa envolvendo 16 pacientes com AIJ com idade média de 9,3 anos não evidenciou diferença estatística na taxa de fluxo parotídeo. Porém, as concentrações salivares médias de cálcio, fósforo, potássio, lisozima e IgA foram significativamente menores entre indivíduos doentes e saudáveis (170). Em nosso estudo, não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas na taxa de fluxo salivar entre os pacientes com LESJ, AIJ e indivíduos saudáveis e nenhum paciente apresentava SSs.

A terapia medicamentosa é importante no tratamento de pacientes com doenças reumáticas. Frequentemente são administradas várias drogas com diferentes finalidades (169). Nos pacientes com LES, os fármacos anti-inflamatórios não esteroides, os inibidores seletivos da cicloxigenase-2 e os antimaláricos geralmente são eficazes para queixas musculoesqueléticas e serosite leve (171). Os pacientes que apresentam manifestações cutâneas, geralmente, se beneficiam com antimaláricos, como a hidroxicloroquina. Os corticosteroides sistêmicos, como a prednisona, são reservados para pacientes com sintomas associados ao envolvimento significativo de órgãos, em particular, envolvimento renal, sistema nervoso central e doenças vasculares sistêmicas (171). A dosagem de corticosteroide é progressivamente

diminuída à medida que os sintomas se resolvem. No entanto, para alguns pacientes é necessário que uma dose de manutenção permaneça até a remissão da atividade da doença (172).

Inclusive, neste trabalho, todos os pacientes com LESJ e 19 (82,6%) com AIJ ($p < ,001$) faziam uso de fármacos. A hidroxicloroquina foi a droga utilizada por um número maior de pacientes com LESJ (85,2%) quando comparada com pacientes com AIJ (0%) ($p < ,001$). A droga utilizada por um número maior de pacientes com AIJ foi metotrexato (69,6%) ($p < ,001$). Cálcio e prednisona foram os medicamentos de segundo maior uso nos pacientes com LESJ e AIJ ($p = ,0017$ e $p < ,001$).

No entanto, alguns medicamentos podem gerar, como efeito adverso, hipossalivação e/ou xerostomia, tais como: antidepressivos, antieméticos, anti-hipertensivos, anti-histamínicos, antirretrovirais, hipoglicemiantes, levotiroxina, anti-inflamatórios não-esteroides e antiespasmódicos, antipsicóticos e sedativos (76). Neste estudo, apenas cinco pacientes com LESJ faziam uso de medicamentos que poderiam causar hipossalivação, todos anti-hipertensivos: Enalapril ($n=3$), Flurosemida ($n=2$) e Losartana ($n=1$). Ao avaliar o fluxo salivar desses cinco pacientes, observamos que o valor médio apresentado foi de 0,35 mL/min (dado não demonstrado), estando portanto dentro dos parâmetros de normalidade (75). No grupo de pacientes com AIJ, os fármacos utilizados não possuíam tal efeito adverso. Por esse motivo, os medicamentos sistêmicos não alteraram de forma significativa a taxa do fluxo salivar sem estímulo entre os grupos ($p = ,268$). A mediana foi de 0,52 (0,32 – 0,70) mL/min, ou seja, encontrava-se com valores bem satisfatórios.

A eletroforese 1- DE, SDS-PAGE, é o método mais utilizado para análises qualitativas de proteínas no qual elas são separadas segundo o tamanho; também é útil para a determinação da massa molecular relativa das proteínas (92, 173). Neste trabalho, foi realizada análise do *pool* da saliva dos três grupos e não foi observada diferença através da técnica de SDS- PAGE. Tal fato poderia ser explicado devido à existência de proteínas específicas em concentrações muito elevadas na saliva, como é

o caso da amilase e da mucina e que podem interferir na análise de proteínas menos abundantes (92). Isso ocorre porque, as glândulas salivares humanas segregam dois tipos de mucinas: mucina oligomérica com massa molecular acima de 1 MDa e mucina monomérica com massa de 200-250 kDa, juntas representam cerca de 26% das proteínas totais da saliva (174). A alta massa molecular destas moléculas impede a sua migração através da poliacrilamida, resultando na sua deposição no topo do gel (92, 175).

Além disso, no SDS-PAGE as bandas proteicas tendem a se sobrepor e podem separar um número relativamente pequeno de proteínas (geralmente menos de 50). A técnica mais adequada, neste caso, seria a 2- DE. Esse método combina dois processos distintos e pode possibilitar a separação de mais de 1000 proteínas num único gel (93). Assim, tornaria viável a visualização de um número maior proteínas específicas. Contudo, por falta de recursos financeiros, não foi possível o emprego dessa técnica em nosso estudo.

Nas últimas décadas a EM tornou-se técnica valiosa devido aos grandes avanços na identificação de proteínas. É um método altamente sensível, requer quantidades menores de material biológico e tem uma eficiência mais elevada do que as plataformas convencionais (93). Tais avanços nas tecnologias de EM de alto rendimento, criaram a possibilidade de pesquisa de biomarcadores sensíveis e específicos para o LES. Um biomarcador ideal para o LES seria aquele biológica e fisiopatologicamente relevante, reprodutível, simples de aplicar na prática de rotina (barato, rápido e fácil de quantificar) e com elevado grau de sensibilidade e especificidade (176). Atualmente, não existe marcador biológico para o LES que cumpra todos esses requisitos. Sabe-se que alguns dos biomarcadores candidatos são proteínas de estresse não específicas, ligadas a uma grande variedade de doenças e condições associadas ao LES (39).

As abordagens atuais para o diagnóstico de LES baseiam-se em manifestações clínicas e na detecção de auto anticorpos no sangue (14). A proteômica baseada em EM tem sido usada para estudar uma variedade de espécimes biológicos (soro/ plasma,

urina, biópsias renais) de pacientes com LES, levando à identificação de biomarcadores relacionados ao diagnóstico e à atividade da doença, bem como o envolvimento de órgãos específicos (39). No entanto, não há publicação sobre a análise da saliva na investigação de biomarcadores para o diagnóstico do LES.

Por esse motivo, buscamos revisar publicações que utilizassem a mesma técnica analítica desta pesquisa em pacientes com síndrome de Sjögren (SS) que, similarmente ao LES e à AR, é uma doença autoimune difusa do tecido conjuntivo (154). Foi encontrado um artigo que utilizou o método de EM MALDI-TOF para analisar a saliva de 27 pacientes com SS (177). Verificou-se que os espectros de massa gerados na faixa de 750-7.500 Da eram muito ricos em peptídeos e encontrava-se com expressão diferente quando comparado ao controle sem doença (177). Outro trabalho analisou a saliva parotídea de 41 pacientes com SS primária e os perfis de expressão de proteínas foram gerados por EM do tipo SELDI-TOF (178). A faixa 10-200 kDa revelou oito picos com maior alteração no grupo com SS. Os picos de 11,8, 12,0, 14,3, 80,6 e 83,7 kDa estavam aumentados, enquanto os picos de 17,3, 25,4 e 35,4 kDa encontravam-se diminuídos em pacientes com SS (178).

Neste estudo, descrevemos estratégia usando EM (MALDI-TOF) em espécime de saliva de pacientes com LESJ, AIJ e SDA. Inicialmente, verificou-se falta de aquisição em 14 (15%) espécimes, sendo 4 do grupo SDA, 4 com LESJ e 6 com AIJ. Isso pode ter ocorrido devido às características das amostras ou a erros metodológicos, como problemas na homogeneização da mistura saliva/matriz ou cristalização inadequada que podem ter provocado baixa intensidade dos picos (179).

A média da relação/intensidade da faixa de massa/carga (m/z) de 1315.6027 a 1315.7536 apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos, onde o grupo SDA apresentou maior média de relação/intensidade 41,3 (31,8 – 50,7) quando comparada à do grupo LESJ 20,5 (15,1 – 25,9). Em relação às faixas dos espectros identificados, a faixa de 1471.5897 a 1471.8495 apresentou diferença estatisticamente significativa em relação à atividade do LESJ. Contudo, este resultado deve ser avaliado com cautela por se tratar de análise de subgrupo. Ou seja, o cálculo amostral não

considerou o tamanho deste subgrupo. Portanto, o poder estatístico é menor que 80%. Assim, pode-se incorrer no erro tipo 1 que é rejeitar a hipótese nula, quando esta for verdadeira. Tais picos de proteínas de m/z podem ser auto anticorpos ou proteínas relacionadas à baixa regulação da imunidade presente no LES. A origem e a identidade completa desses picos de proteína para o propósito de diagnóstico diferencial não é seria necessário. No entanto, a identidade exata das proteínas envolvidas seria essencial para entender o papel biológico que essas proteínas/ peptídeos poderiam exercer na patogênese da doença, o que levaria ao desenvolvimento de novos alvos terapêuticos (117). Para tal finalidade, seria necessário acoplar à técnica MALDI-TOF outra ferramenta proteômica como a separação de proteínas da amostra por eletroforese 1-DE ou, preferencialmente, 2-DE e/ou por cromatografia líquida (79, 91).

Conforme já mencionado, não foi possível realizar eletroforese 2-DE. Ademais, a eletroforese 1- DE realizada, não avaliou caso a caso de cada grupo. Em decorrência de limitação de recursos financeiros, aglomerou-se todas as amostras de cada grupo, compondo 3 *pools* de amostra de saliva, LESJ, AIJ e SDA. Apesar de a eletroforese 1- DE não ter apresentado indícios de diferença de bandas entre os grupos, a EM revelou diferenças expressivas no aumento do pico dos espectros 1224.5036, 1315.5853, 1731.6880 e 1866.7644 m/z no *pool* do grupo SDA.

Embora haja um número significativo de publicações, ainda há muitos desafios que precisam ser superados nas pesquisas futuras que visam identificar biomarcadores úteis do LES para a prática clínica. Em primeiro lugar, as diferenças nos resultados em trabalhos distintos podem ser atribuídas à diversidade nos critérios de seleção dos pacientes. Estudo recente publicado relatou a heterogeneidade molecular presente nos pacientes com LES que justificou a falha nas pesquisas que utilizam tal casuística (180). Assim, é necessário estabelecer critérios de seleção de amostras universalmente aceitos para aperfeiçoar as correlações fenotípicas/genotípicas e permitir que os resultados de diferentes estudos proteômicos sejam mais comparáveis. Pesquisas futuras precisam recrutar um maior número de pacientes em coortes independentes/ estudos multicêntricos e realizados com métodos padronizados (72). Além disso, devem

focar em biomarcadores que já foram identificados em múltiplos tipos de espécimes invasivos e não-invasivos. Devido à natureza heterogênea do LES, estudos que trabalham biomarcadores variados envolvidos em vias biologicamente relevantes podem ser mais significativos e mais substanciais do que os estudos que se centram em biomarcadores únicos a fim de fechar o diagnóstico e eleger o melhor tratamento dos pacientes (180).

Portanto, é importante que o pesquisador ou o clínico estejam cientes das possíveis diferenças geradas pelos diversos ensaios para interpretar adequadamente os intervalos de referência. Assim, a utilização da saliva para diagnóstico necessita de mais estudos a fim de padronizar os métodos de análise, validar os resultados e definir valores de referência em diferentes populações para torná-la disponível à prática clínica. Os resultados demonstram que a saliva tem apresentado biomarcadores promissores e, apesar de todos estes desafios, há uma evolução crescente de conhecimento com a utilização deste fluido biológico.

6 CONCLUSÃO

- O perfil proteico da saliva individual de pacientes com LESJ foi diferente em um dos espectros avaliados quando comparado ao do grupo SDA;
- o perfil proteico salivar de pacientes com LESJ nas fases ativa e inativa apresentou diferença em um dos espectros avaliados;
- o *pool* de saliva demonstrou que a relação/intensidade de picos de alguns espectros dos pacientes com LESJ e AIJ diferem em relação aos picos dos indivíduos SDA;
- a eletroforese unidimensional do *pool* da saliva não evidenciou diferença entre as bandas dos grupos estudados;
- o perfil de saúde da maioria dos pacientes com LESJ evidenciou atividade leve da doença e baixo dano cumulativo;
- a maioria dos pacientes apresentaram condições bucais satisfatórias com baixo índice CPO-D.
- o fluxo salivar encontrava-se dentro dos padrões de normalidade nos três grupos avaliados.

REFERÊNCIAS

1. Lam G, Petri M. Assessment of systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 2005; 23(5):S120- 32.
2. Sherer Y, Gorstein A, Fritzler MJ, Shoenfeld Y. Autoantibody explosion in systemic lupus erythematosus: more than 100 different antibodies found in SLE patients. *Semin Arthritis Rheum* 2004; 34(2): 501-37.
3. Vanarsa K, Mohan C. Proteomics in rheumatology: the dawn of a new era. *F1000 medicine reports* 2010; 2: 87.
4. Organização Mundial da Saúde. Principles and methods for assessing autoimmunity associated with exposure to chemicals. Genova: WHO; 2006.
5. Furst D, Clarke A, Fernandes A, Bancroft T, Greth W, Iorga S. Incidence and prevalence of adult systemic lupus erythematosus in a large US managed-care population. *Lupus* 2013; 22(1):99-105.
6. Vilar MP, Sato E. Estimating the incidence of systemic lupus erythematosus in a tropical region (Natal, Brazil). *Lupus* 2002; 11(8):528-32.
7. Cervera R, Khamashta MA, Font J, Sebastiani GD, Gil A, Lavilla P et al. Morbidity and mortality in systemic lupus erythematosus during a 10-year period: a comparison of early and late manifestations in a cohort of 1,000 patients. *Medicine* 2003; 82(5):299-308.
8. Danchenko N, Satia J, Anthony M. Epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comparison of worldwide disease burden. *Lupus* 2006;15(5):308-18.
9. Turchetti G, Yazdany J, Palla I, Yelin E, Mosca M. Systemic lupus erythematosus and the economic perspective: a systematic literature review and points to consider. *Clin Exp Rheumatol* 2012; 30(4073): S116–S122.
10. Lee P, Lee TL, Ho MK, Wong W, Lau YL. Recurrent major infections in juvenile-onset systemic lupus erythematosus- a close link with long-term disease damage. *Rheumatol* 2007;46(8):1290-6.

11. Denardo B, Tucker L, Miller L, Szer I, Schaller J. Demography of a regional pediatric rheumatology patient population. Affiliated Children's Arthritis Centers of New England. *J Rheumatol* 1994; 21(8):1553-61.
12. Chiewchengchol D, Murphy R, Edwards SW, Beresford MW. Mucocutaneous manifestations in juvenile-onset systemic lupus erythematosus: a review of literature. *Pediatr Rheumatol* 2015;13(1):1-9.
13. Campos LM, Sallum AME, da Silva CAA. Lupus Eritematoso Sistêmico na Infância. In: Carvalho MA. *Reumatologia: Diagnóstico e Tratamento*. 4. ed. Rio de Janeiro: Gen; 2014. p. 537-44.
14. Liphaut BL, Goldenstein-Schainberg C. Lúpus eritematoso sistêmico juvenil e lúpus neonatal. In: da Silva CAA. *Doenças Reumáticas na Criança e no Adolescente*. 2. ed. São Paulo: Manole; 2010. p. 183-201.
15. Miettunen PM, Ortiz-Alvarez O, Petty RE, Cimaz R, Malleson PN, Cabral DA, et al. Gender and ethnic origin have no effect on longterm outcome of childhood-onset systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2004; 31(8):1650-4.
16. Lo J, Tsai M, Wang L, Huang M, Yang Y, Lin Y, et al. Sex differences in pediatric systemic lupus erythematosus: a retrospective analysis of 135 cases. *J Microbiol Immunol Infect* 1999; 32(3):173-8.
17. Brunner HI, Silverman ED, To T, Bombardier C, Feldman BM. Risk factors for damage in childhood-onset systemic lupus erythematosus: Cumulative disease activity and medication use predict disease damage. *Arthritis Rheum* 2002; 46(2):436-44.
18. Haje M. Projeto facilita aposentadoria em caso de lúpus e epilepsia 2010. 2014 [cited 2014 Jul 9]. Available from: <http://www2camaralegbr/camaranoticias/noticias/151580-PROJETO-FACILITA-APOSENTADORIA-EM-CASO-DE-LUPUS-E-EPILEPSIA.html>. 2010.
19. Oglesby A, Korves C, Laliberté F, Dennis G, Rao S, Suthoff ED, et al. Impact of Early Versus Late Systemic Lupus Erythematosus Diagnosis on Clinical and Economic Outcomes *Appl Health Econ Health Policy* 2014;12(2):179-90.

20. Li T, Carls GS, Panopalis P, Wang S, Gibson TB, Goetzel RZ. Long-term medical costs and resource utilization in systemic lupus erythematosus and lupus nephritis: A five-year analysis of a large medicaid population. *Arthritis Care Res* 2009; 61(6):755-63.
21. Panopalis P, Yazdany J, Gillis JZ, Julian L, Trupin L, Hersh AO, et al. Health care costs and costs associated with changes in work productivity among persons with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Care Res* 2008; 59(12):1788-95.
22. Carls G, Li T, Panopalis P, Wang S, Mell AG, Gibson TB, et al. Direct and indirect costs to employers of patients with systemic lupus erythematosus with and without nephritis. *Int J Occup Environ Med* 2009; 51(1):66-79.
23. Yelin E, Trupin L, Katz P, Criswell LA, Yazdany J, Gillis J, et al. Impact of health maintenance organizations and fee-for-service on health care utilization among people with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Care Res* 2007; 57(3):508-15.
24. Pelletier EM, Ogale S, Yu E, Brunetta P, Garg J. Economic outcomes in patients diagnosed with systemic lupus erythematosus with versus without nephritis: results from an analysis of data from a US claims database. *Clin Ther* 2009; 31(11):2653-64.
25. Brunner HI, Gladman DD, Ibañez D, Urowitz MD, Silverman ED. Difference in disease features between childhood-onset and adult-onset systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2008; 58(2):556-62.
26. Rocha MFB. Lúpus eritematoso sistémico juvenil: Aspectos clínicos e de prognóstico. Porto. Dissertação [Mestrado Integrado em Medicina] Faculdade de Medicina da Universidade do Porto; 2011.
27. Hiraki LT, Benseler SM, Tyrrell PN, Hebert D, Harvey E, Silverman ED. Clinical and laboratory characteristics and long-term outcome of pediatric systemic lupus erythematosus: a longitudinal study. *J Pediatr* 2008; 152(4):550-6.
28. Fernandes E, Savioli C, Siqueira J, Silva C. Oral health and the masticatory system in juvenile systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2007;16(9):713-9.

29. Khatibi M, Shakoopour A, Jahromi ZM, Ahmadzadeh A. The prevalence of oral mucosal lesions and related factors in 188 patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2012; 21(12):1312-5.
30. Novo E, Garcia-MacGregor E, Viera N, Chaparro N, Crozzoli Y. Periodontitis and anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis: a comparative study. *J Periodontol* 1999; 70(2):185-8.
31. Mutlu S, Richards A, Maddison P, Scully C. Gingival and periodontal health in systemic lupus erythematosus. *Community Dent Oral Epidemiol* 1993; 21(3):158-61.
32. Ravelli A, Duarte-Salazar C, Buratti S, Reiff A, Bernstein B, Maldonado-Velazquez MR, et al. Assessment of damage in juvenile-onset systemic lupus erythematosus: A multicenter cohort study. *Arthritis Care Res* 2003; 49(4):501-7.
33. Fenniche S, Triki S, Benmously R, Ammar HM, Mokhtar I. Lupus erythematosus in children: a report of six cases. *Dermatol Online J* 2005;11(2).
34. Cancro MP, D'Cruz DP, Khamashta MA. The role of B lymphocyte stimulator (BLyS) in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 2009; 119(5):1066-73.
35. Lenzi M, Bellentani S, Saccoccio G, Muratori P, Masutti F, Muratori L, et al. Prevalence of non-organ-specific autoantibodies and chronic liver disease in the general population: a nested case-control study of the Dionysos cohort. *Gut* 1999; 45(3):435-41.
36. Schur PH, Sandson J. Immunologic factors and clinical activity in systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 1968; 278(10):533-8.
37. Giannouli S, Voulgarelis M, Ziakas PD, Tzioufas AG. Anaemia in systemic lupus erythematosus: from pathophysiology to clinical assessment. *Ann Rheum Dis* 2006; 65(2):144-8.
38. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* 1997;40(9):1725-.
39. Nicolaou O, Kousios A, Hadjisavvas A, Lauwerys B, Sokratous K, Kyriacou K. Biomarkers of systemic lupus erythematosus identified using mass spectrometry-

- based proteomics: a systematic review. *J Cell Mol Med* 2017 May; 21(5): 993–1012.
40. Tucker L, Menon S, Isenberg D. Systemic lupus in children: daughter of the Hydra? *Lupus* 1995; 4(2):83-5.
 41. Font J, Cervera R, Espinosa G, Pallarés L, Ramos-Casals M, Jiménez S, et al. Systemic lupus erythematosus (SLE) in childhood: analysis of clinical and immunological findings in 34 patients and comparison with SLE characteristics in adults. *Ann Rheum Dis* 1998; 57(8):456-9.
 42. Petri M, Orbai AM, Alarcón GS, Gordon C, Merrill JT, Fortin PR, et al. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2012; 64(8): 2677-86.
 43. Borba EF, Latorre LC, Brenol JC, Kayser C, Silva NA, Zimmermann AF, et al. Consenso de lúpus eritematoso sistêmico. *Rev Bras Reumatol* 2008; 48(4):196-207.
 44. Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH, Austin A, et al. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. *Arthritis Rheum* 1992;35(6):630-40.
 45. Gladman DD, Ibañez D, Urowitz MB. Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. *J Rheumatol* 2002;29(2):288-91.
 46. Gladman D, Goldsmith C, Urowitz M, Bacon P, Fortin P, Ginzler E, et al. The Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology (SLICC/ACR) Damage Index for Systemic Lupus Erythematosus International Comparison. *J Rheumatol* 2000; 27(2):373-6.
 47. Hay E, Bacon P, Gordon C, Isenberg D, Maddison P, Snaith M, et al. The BILAG index: a reliable and valid instrument for measuring clinical disease activity in systemic lupus erythematosus. *QJM* 1993; 86(7):447-58.
 48. Liang MH, Socher SA, Larson MG, Schur PH. Reliability and validity of six systems for the clinical assessment of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1989; 32(9):1107-18.

49. Vitali C, Bencivelli W, Isenberg D, Smolen J, Snaith M, Sciuto M, et al. Disease activity in systemic lupus erythematosus: report of the Consensus Study Group of the European Workshop for Rheumatology Research. II. Identification of the variables indicative of disease activity and their use in the development of an activity score. The European Consensus Study Group for Disease Activity in SLE. *Clin Exp Rheumatol* 1991;10(5):541-7.
50. Machado C, Ruperto N. Consenso em Reumatologia Pediátrica Parte II—definição de melhora clínica para o lúpus eritematoso sistêmico e dermatomiosite juvenil. *Rev Bras Reumatol*. 2005;45(1):14-9.
51. Gladman DD, Urowitz MB, Goldsmith CH, Fortin P, Ginzler E, Gordon C, et al. The reliability of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology damage index in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997;40(5):809-13.
52. Lotito AP, Mello SB. Artrite idiopática juvenil. In: da Silva CAA. *Doenças Reumáticas na Criança e no Adolescente*. 2. ed. São Paulo: Manole; 2010. p. 82-109.
53. Rosenkranz ME, Wilson DC, Marinov AD, Decewicz A, Grof-Tisza P, Kirchner D, et al. Synovial fluid proteins differentiate between the subtypes of juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2010; 62(6):1813-23.
54. Fjeld M, Arvidsson L, Smith H, Flato B, Ogaard B, Larheim T. Relationship between disease course in the temporomandibular joints and mandibular growth rotation in patients with juvenile idiopathic arthritis followed from childhood to adulthood. *Pediatr Rheumatol*. 2010; 8(1):1.
55. Minden K, Niewerth M, Listing J, Biedermann T, Bollow M, Schöntube M, et al. Long-term outcome in patients with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2002; 46(9):2392-401.
56. Finnegan S, Robson J, Scaife C, McAllister C, Pennington SR, Gibson DS, et al. Synovial membrane protein expression differs between juvenile idiopathic arthritis subtypes in early disease. *Arthritis Res Ther* 2014;16(1):1.

57. Oen KG, Cheang M, editors. Epidemiology of chronic arthritis in childhood. *Semin Arthritis Rheum* 1996; 26 (3): 575–91.
58. Thierry S, Fautrel B, Lemelle I, Guillemin F. Prevalence and incidence of juvenile idiopathic arthritis: a systematic review. *Joint Bone Spine* 2014; 81(2):112-7.
59. Santos FPS, Terreri MT, Quintero MVP. Artrite idiopática juvenil. In: Carvalho MA. *Reumatologia: Diagnóstico e Tratamento*. 4. ed. Rio de Janeiro: Gen; 2014. p. 522- 36.
60. Petty RE, Southwood TR, Manners P, Baum J, Glass DN, Goldenberg J, et al. International League of Associations for Rheumatology classification of juvenile idiopathic arthritis: second revision, Edmonton, 2001. *J Rheumatol* 2004; 31(2):390.
61. Barr T, Carmichael NM, Sándor GK. Juvenile idiopathic arthritis: a chronic pediatric musculoskeletal condition with significant orofacial manifestations. *J Can Dent Assoc* 2008; 74(9):813.
62. Sociedade Brasileira de Pediatria e Sociedade Brasileira de Reumatologia. Artrite Idiopática Juvenil: Diagnóstico. *AMB* 2012 Out: 1-16.
63. Petty RE, Southwood T, Baum J, Bhattay E, Glass D, Manners P, et al. Revision of the proposed classification criteria for juvenile idiopathic arthritis: Durban, 1997. *J Rheumatol* 1998; 25(10):1991- 4.
64. Berntson L, Damgård M, Andersson-Gäre B, Herlin T, Nielsen S, Nordal E, et al. HLA-B27 predicts a more extended disease with increasing age at onset in boys with juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol* 2008; 35(10):2055-61.
65. Shin J, Kim K, Chun J, Lee T, Kim K, Kim H, et al. Prevalence and patterns of anti-nuclear antibodies in Korean children with juvenile idiopathic arthritis according to ILAR criteria. *Scand J Rheumatol* 2008;37(5):348-51.
66. Payet J, Goulvestre C, Bialé L, Avouac J, Wipff J, Job-Deslandre C, et al. Anticyclic citrullinated peptide antibodies in rheumatoid and nonrheumatoid rheumatic disorders: experience with 1162 patients. *J Rheumatol* 2014;41(12):2395-402.
67. Ravelli A, Martini A. Juvenile idiopathic arthritis. *Lancet*. 2007;369(9563):767-78.

68. Van Nieuw Amerongen A, Bolscher J, Veerman E. Salivary proteins: protective and diagnostic value in cariology? *Caries Res* 2004;38(3):247-53.
69. Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent* 2001; 85(2):162-9.
70. Patel SA, Barros J. Introduction. In: Streckfus C. *Advances in salivary diagnostics*. New York: Springer; 2015. p. 1-16.
71. Chiappin S, Antonelli G, Gatti R, Elio F. Saliva specimen: a new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clin Chim Acta* 2007;383(1):30-40.
72. Nunes S, Alessandro L, Mussavira S, Sukumaran Bindhu O. Clinical and diagnostic utility of saliva as a non-invasive diagnostic fluid: a systematic review. *Biochem Med* 2015; 25(2):177-92.
73. Puy CL. The role of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2006; 11(5):449-55.
74. Martinez JR. *Treatment of Salivary Gland Disorders: Alternative Approaches*. [Accessed in september 17, 2012]. Available from URL: <http://www.nidcr.nih.gov/OralHealth/Topics/Saliva/AlternativeApproaches.htm>.
75. Falcão DPF, da Mota LMH, Pires AL, Bezerra ACB. Sialometry: aspects of clinical interest. *Rev Bras Reumatol* 2013; 53(6):525-31.
76. Bergdahl M, Bergdahl J. Low unstimulated salivary flow and subjective oral dryness: association with medication, anxiety, depression, and stress. *J Dent Res* 2000;79(9):1652-8.
77. Bosch JA, Turkenburg M, Nazmi K, Veerman EC, de Geus EJ, Amerongen AVN. Stress as a Determinant of Saliva-Mediated Adherence and Coadherence of Oral and Nonoral Microorganisms. *Psychosom Med* 2003;65(4):604-12.
78. Zhang A, Sun H, Wang P, Wang X. Salivary proteomics in biomedical research. *Clin Chim Acta* 2013 Jan; 415 (16):261-5.
79. Al-Tarawneh SK, Border MB, Dibble CF, Bencharit S. Defining salivary biomarkers using mass spectrometry-based proteomics: a systematic review. *OMICS* 2011; 15(6):353-61.

80. Kawas SA, Rahim ZH, Ferguson DB. Potential uses of human salivary protein and peptide analysis in the diagnosis of disease. *Arch Oral Biol* 2012;57(1):1-9.
81. Amado FM, Ferreira RP, Vitorino R. One decade of salivary proteomics: Current approaches and outstanding challenges. *Clin Biochem* 2013 Apr; 46(6):506-17.
82. Zheng X, Wu S-I, Hincapie M, Hancock WS. Study of the human plasma proteome of rheumatoid arthritis. *J Chromatogr A* 2009; 1216(16):3538-45.
83. Ogbureke KUE, Ogbureke EI. The History of Salivary Diagnostics. In: Streckfus C. *Advances in salivary diagnostics*. New York: Springer; 2015. p. 17-31.
84. Castagnola M, Cabras T, Vitali A, Sanna MT, Messina I. Biotechnological implications of the salivary proteome. *Trends Biotechnol* 2011;29(8):409-18.
85. Greenberg BL, Glick M, Frantsve-Hawley J, Kantor ML. Dentists' attitudes toward chairside screening for medical conditions. *J Am Dent Assoc* 2010; 141(1):52-62.
86. Bonne NJ, Wong DT. Salivary biomarker development using genomic, proteomic and metabolomic approaches. *Genome Med* 2012;4(10):1-12.
87. Fabian T, Fejerdy P, Csermely P. Salivary genomics, transcriptomics and proteomics: the emerging concept of the oral ecosystem and their use in the early diagnosis of cancer and other diseases. *Curr Genomics* 2008; 9(1):11.
88. Janardhanam SB, Zunt SL, Srinivasan M. Quality assessment of saliva bank samples. *Biopreserv Biobank* 2012;10(3):282-7.
89. Jehmlich N, Dinh K, Gesell-Salazar M, Hammer E, Steil L, Dhople V, et al. Quantitative analysis of the intra-and inter-subject variability of the whole salivary proteome. *J Periodontal Res* 2013 Jun; 48 (3): 392–403.
90. Schipper RG, Silletti E, Vingerhoeds MH. Saliva as research material: biochemical, physicochemical and practical aspects. *Arch Oral Biol* 2007;52(12):1114-35.
91. Barbosa EB, Vidotto A, Polachini GM, Henrique T, Marqui ABT, Tajara EH. Proteomics: methodologies and applications to the study of human diseases. *RAMB* 2012; 58(3):366-75.
92. Lamy E, Costa AR, Antunes CM, Vitorino R, Amado F. Protein Electrophoresis in Saliva Study. In: Ghowsi K. *Electrophoresis*. New York: InTech; 2012. p. 63-84.

93. Galdos-Riveros AC, Piza A, Resende L, Maria D, Miglino MA. Proteômica: novas fronteiras na pesquisa clínica. *Enciclopédia Biosfera* 2010; 6(11):1-24.
94. Silva LP, Bemquerer MP. Análise de peptídeos e proteínas por espectrometria de massa. In: Brasileiro ACM, Carneiro VT. *Manual de transformação genética em plantas*. Brasília: Embrapa; 2015. p. 401- 16.
95. Cunha RB, Castro MDS, Fontes W. Espectrometria de massa de proteínas. *Biotechnologia Cienc Desenvol* 2006; (36):2006.40-46.
96. Tanaka K. The origin of macromolecule ionization by laser irradiation (Nobel lecture). *Angew Chem Int Ed* 2003; 42(33):3860-70.
97. Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev* 2012; 36(2):380-407.
98. Marvin LF, Roberts MA, Fay LB. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. *Clin Chim Acta* 2003; 337(1):11-21.
99. Cho Y, Su H, Huang T, Chen H, Wu W, Wu P, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization/time-of-flight mass spectrometry for clinical diagnosis. *Clin Chim Acta* 2013; 415:266-75.
100. Dhiman N, Hall L, Wohlfiel SL, Buckwalter SP, Wengenack NL. Performance and cost analysis of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for routine identification of yeast. *J Clin Microbiol* 2011; 49(4):1614-6.
101. Caporossi L, Santoro A, Papaleo B. Saliva as an analytical matrix: state of the art and application for biomonitoring. *Biomarkers*. 2010; 15(6):475-87.
102. Good DM, Thongboonkerd V, Novak J, Bascands J-L, Schanstra JP, Coon JJ, et al. Body fluid proteomics for biomarker discovery: lessons from the past hold the key to success in the future. *J Proteome Res* 2007; 6(12):4549-55.
103. Bandhakavi S, Stone MD, Onsongo G, Van Riper SK, Griffin TJ. A dynamic range compression and three-dimensional peptide fractionation analysis platform expands proteome coverage and the diagnostic potential of whole saliva. *J Proteome Res* 2009; 8(12):5590-600.

104. Korostoff A, Reder L, Masood R, Sinha UK. The role of salivary cytokine biomarkers in tongue cancer invasion and mortality. *Oral Oncol* 2011; 47(4):282-7.
105. Hu S, Arellano M, Boontheung P, Wang J, Zhou H, Jiang J, et al. Salivary proteomics for oral cancer biomarker discovery. *Clin Cancer Res* 2008; 14(19):6246-52.
106. Rudney J, Staikov R, Johnson J. Potential biomarkers of human salivary function: a modified proteomic approach. *Arch Oral Biol* 2009; 54(1):91-100.
107. Haigh BJ, Stewart KW, Whelan JR, Barnett MP, Smolenski GA, Wheeler TT. Alterations in the salivary proteome associated with periodontitis. *J Clin Periodontol* 2010; 37(3):241-7.
108. Wu Z-Z, Wang J-G, Zhang X-L. Diagnostic model of saliva protein finger print analysis of patients with gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2009; 15(7):865.
109. Hirtz C, Chevalier F, Sommerer N, Raingeard I, Bringer J, Rossignol M, et al. Salivary protein profiling in type I diabetes using two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Clin Proteomics* 2006;2(1-2):117-27.
110. Rao PV, Reddy AP, Lu X, Dasari S, Krishnaprasad A, Biggs E, et al. Proteomic identification of salivary biomarkers of type-2 diabetes. *J Proteome Res* 2009; 8(1):239-45.
111. Streckfus CF, Bigler LR, Zwick M. The use of surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry to detect putative breast cancer markers in saliva: a feasibility study. *J Oral Pathol Med* 2006; 35(5):292-300.
112. Nicholas BL, Skipp P, Barton S, Singh D, Bagmane D, Mould R, et al. Identification of lipocalin and apolipoprotein A1 as biomarkers of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 181(10):1049-60.
113. Wetie N, Armand G, Wormwood KL, Russell S, Ryan JP, Darie CC, et al. A Pilot Proteomic Analysis of Salivary Biomarkers in Autism Spectrum Disorder. *Autism Res* 2015 Jun; 8(3):338-50.

114. Plebani M, Pittoni M, Celadin M, Bernardi D, Mion MM. Recent advances in diagnostic technologies for autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 2009; 8(3):238-43.
115. Alaiya A, Assad L, Alkhafaji D, Shinwari Z, Almana H, Shoukri M, et al. Proteomic analysis of Class IV lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant* 2015 Jan; 30(1): 62-70.
116. Caster DJ, Korte EA, Merchant ML, Klein JB, Wilkey DW, Rovin BH, et al. Autoantibodies targeting glomerular annexin A2 identify patients with proliferative lupus nephritis. *Proteomics Clin Appl* 2015; 9(11-12):1012-20.
117. Huang Z, Shi Y, Cai B, Wang L, Wu Y, Ying B, et al. MALDI-TOF MS combined with magnetic beads for detecting serum protein biomarkers and establishment of boosting decision tree model for diagnosis of systemic lupus erythematosus. *Rheumatology*. 2009; 48:626-31.
118. Kimura A, Kanoh Y, Sakurai T, Koumura A, Yamada M, Hayashi Y, et al. Antibodies in patients with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Neurology* 2010; 74(17):1372-9.
119. Morgan PE, Sturgess AD, Hennessy A, Davies MJ. Serum protein oxidation and apolipoprotein CIII levels in people with systemic lupus erythematosus with and without nephritis. *Free Radic Res* 2007; 41(12):1301-12.
120. Nielsen C, Ostergaard O, Rekvig O, Sturfelt G, Jacobsen S, Heegaard N. Galectin-3 binding protein links circulating microparticles with electron dense glomerular deposits in lupus nephritis. *Lupus* 2015; 24(11):1150-60.
121. Pavón EJ, García-Rodríguez S, Zumaquero E, Perandrés-López R, Rosal-Vela A, Lario A, et al. Increased expression and phosphorylation of the two S100A9 isoforms in mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus: a proteomic signature for circulating low-density granulocytes. *J Proteomics* 2012; 75(6):1778-91.
122. Somparn P, Hirankarn N, Leelahavanichkul A, Khovidhunkit W, Thongboonkerd V, Avihingsanon Y. Urinary proteomics revealed prostaglandin H 2 D-isomerase, not

- Zn- α 2-glycoprotein, as a biomarker for active lupus nephritis. *J Proteomics* 2012; 75(11):3240-7.
123. Sun L, Chen H, Hu C, Wang P, Li Y, Xie J, et al. Identify biomarkers of neuropsychiatric systemic lupus erythematosus by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry combined with weak cation magnetic beads. *J Rheumatol* 2011; 38(3):454-61.
 124. Wang L, Dai Y, Peng W, Qi S, Ouyang X, Tu Z. Differential expression of serine-threonine kinase receptor-associated protein in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2011; 20(9):921-7.
 125. Zhang X, Jin M, Wu H, Nadasdy T, Nadasdy G, Harris N, et al. Biomarkers of lupus nephritis determined by serial urine proteomics. *Kidney international*. 2008;74(6):799-807.
 126. Zhou D, Luo N, Wu Q, You Y, Zhai Z, Mou Z, et al. Transcellular distribution heterogeneity of Annexin A5 represents a protective response to lupus-related thrombophilia: A pilot Proteomics-based study. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 420(2):357-63.
 127. Mosley K, Tam F, Edwards R, Crozier J, Pusey C, Lightstone L. Urinary proteomic profiles distinguish between active and inactive lupus nephritis. *Rheumatology* 2006; 45(12):1497-504.
 128. Iizuka N, Okamoto K, Matsushita R, Kimura M, Nagai K, Arito M, et al. Identification of autoantigens specific for systemic lupus erythematosus with central nervous system involvement. *Lupus* 2010; 19(6):717-26.
 129. Kazemipour N, Qazizadeh H, Sepehrimanesh M, Salimi S. Biomarkers identified from serum proteomic analysis for the differential diagnosis of systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2015; 24(6):582-7.
 130. Serada S, Fujimoto M, Takahashi T, He P, Hayashi A, Tanaka T, et al. Proteomic analysis of autoantigens associated with systemic lupus erythematosus: Anti-aldolase A antibody as a potential marker of lupus nephritis. *Proteomics Clin Appl* 2007; 1(2):185-91.

131. Zhou X, Li J, Wang L, Wang C, Wu R, Li R. Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry in the genetic basis of systemic lupus erythematosus and the complicating kidney injury. *Chin Med J (Engl)* 2013; 126:2821-5.
132. Dai Y, Hu C, Huang Y, Huang H, Liu J, Lv T. A proteomic study of peripheral blood mononuclear cells in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2008; 17(9):799-804.
133. Li Y, Huang C, Zhao M, Liang G, Xiao R, Yung S, et al. A Possible Role of HMGB1 in DNA Demethylation in CD4⁺ sup. *Clin Dev Immunol* 2013; 2013: 1-5.
134. Wang L, Dai Y, Qi S, Sun B, Wen J, Zhang L, et al. Comparative proteome analysis of peripheral blood mononuclear cells in systemic lupus erythematosus with iTRAQ quantitative proteomics. *Rheumatol Int* 2012; 32(3):585-93.
135. Nielsen CT, Ostergaard O, Stener L, Iversen LV, Truedsson L, Gullstrand B, et al. Increased IgG on cell-derived plasma microparticles in systemic lupus erythematosus is associated with autoantibodies and complement activation. *Arthritis & Rheumatology*. 2012;64(4):1227-36.
136. Ostergaard O, Nielsen CT, Iversen LV, Tanassi JT, Knudsen S, Jacobsen S, et al. Unique protein signature of circulating microparticles in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2013; 65(10):2680-90.
137. Qian W-J, Jacobs JM, Liu T, Camp DG, Smith RD. Advances and challenges in liquid chromatography-mass spectrometry-based proteomics profiling for clinical applications. *Mol Cell Proteomics* 2006; 5(10):1727-44.
138. Sui W, Tang D, Zou G, Chen J, Ou M, Zhang Y, et al. Differential proteomic analysis of renal tissue in lupus nephritis using iTRAQ reagent technology. *Rheumatol Int* 2012; 32(11):3537-43.
139. Mischak H. Pro: urine proteomics as a liquid kidney biopsy: no more kidney punctures! *Nephrol Dial Transplant* 2015;30(4):532-7.
140. Fang S, Zeng F, Guo Q. Comparative proteomics analysis of cytokeratin and involucrin expression in lesions from patients with systemic lupus erythematosus. *Acta Biochim. Biophys* 2008; 40(12):989-95.

141. De Benedetti F, Ravelli A, Martini A. Cytokines in juvenile rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 1997; 9(5):428-33.
142. Thompson SD, Luyrink LK, Graham TB, Tsoras M, Ryan M, Passo MH, et al. Chemokine receptor CCR4 on CD4+ T cells in juvenile rheumatoid arthritis synovial fluid defines a subset of cells with increased IL-4: IFN- γ mRNA ratios. *The Journal of Immunology*. 2001;166(11):6899-906.
143. Suzuki M, Ross GF, Wiers K, Nelson S, Bennett M, Passo MH, et al. Identification of a urinary proteomic signature for lupus nephritis in children. *Pediatr Nephrol* 2007; 22(12):2047-57.
144. Miyamae T, Malehorn DE, Lemster B, Mori M, Imagawa T, Yokota S, et al. Serum protein profile in systemic-onset juvenile idiopathic arthritis differentiates response versus nonresponse to therapy. *Arthritis Res Ther* 2005; 7(4):R746- R755.
145. Gibson DS, Blelock S, Curry J, Finnegan S, Healy A, Scaife C, et al. Comparative analysis of synovial fluid and plasma proteomes in juvenile arthritis—proteomic patterns of joint inflammation in early stage disease. *J Proteomics* 2009; 72(4):656-76.
146. Gibson DS, Banha J, Penque D, Costa L, Conrads TP, Cahill DJ, et al. Diagnostic and prognostic biomarker discovery strategies for autoimmune disorders. *J Proteomics* 2010; 73(6):1045-60.
147. Giusti L, Baldini C, Ciregia F, Giannaccini G, Giacomelli C, De Feo F, et al. Is GRP78/BiP a potential salivary biomarker in patients with rheumatoid arthritis? *Proteomics Clin Appl* 2010; 4(3):315-24.
148. Flowers SA, Ali L, Lane CS, Olin M, Karlsson NG. Selected reaction monitoring to differentiate and relatively quantitate isomers of sulfated and unsulfated core 1 O-glycans from salivary MUC7 protein in rheumatoid arthritis. *Mol Cell Proteomics* 2013; 12(4):921-31.
149. Pfaffe T, Cooper-White J, Beyerlein P, Kostner K, Punyadeera C. Diagnostic potential of saliva: current state and future applications. *Clin Chem* 2011; 57(5):675-87.

150. Griffiths B, Mosca M, Gordon C. Assessment of patients with systemic lupus erythematosus and the use of lupus disease activity indices. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2005; 19(5):685-708.
151. Organização Mundial da Saúde. Oral health surveys: basic methods: World Health Organization. Genova: WHO; 1987.
152. Vissink A, Wolff A, Veerman ECI. Saliva collectors. In: Wong DT, editor. *Salivary diagnostics*. Ames (IA): Wiley-Blackwell; 2008. p. 37–59
153. Strohm M, Hassman M, Košata B, Kodíček M. mMass data miner: an open source alternative for mass spectrometric data analysis. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2008; 22(6):905-8.
154. Sociedade Brasileira de Reumatologia. Tudo sobre a reumatologia [Internet]. São Paulo; 2012. [citado em 2017 Feb 22]. Disponível em: <http://reumatologia.org.br/tudo-sobre-a-reumatologia/>
155. Schainberg CG. Reumatologia infantil [Internet]. ReumatoUSP: Universidade de São Paulo. [citado em 2017 Mar 1]. Disponível em: <http://www.reumatosp.med.br/para-pacientes.php?id=10553327&idSecao=18294311>
156. Olowu W. Childhood-onset systemic lupus erythematosus. *J Natl Med Assoc* 2007; 99(7):777.
157. Sawhney S, Jariwala M, Agarwal M. A77: Clinical and Laboratory Features and Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000 (SLEDAI 2K) at Onset and Follow Up in a Cohort of 109 Paediatric Lupus Patients From a Tertiary Level Centre in India. *Arthritis Rheum* 2014; 66(S3):S109-S10.
158. Uziel Y, Gorodnitski N, Mukamel M, Padeh S, Brik R, Barash J, et al. Lupus around the World Outcome of a national Israeli cohort of pediatric systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2007;16(2):142-6.
159. Abrão ALP, Santana CM, Bezerra ACB, Amorim RFB, Silva MB, Mota LMH, et al. What rheumatologists should know about orofacial manifestations of autoimmune rheumatic diseases. *Rev Bras Reumatol* 2016; 56(5):441-50.

160. Matute GR, Alonso ER. Recurrent aphthous stomatitis in Rheumatology. *Reumatol Clin (English Edition)*. 2011; 7(5):323-8.
161. Mays JW, Sarmadi M, Moutsopoulos NM. Oral manifestations of systemic autoimmune and inflammatory diseases: diagnosis and clinical management. *J Evid Based Dent Pract* 2012; 12(3):265-82.
162. Frias AC, Junqueira SR. *Saúde Bucal Coletiva*. São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo [citado em 2017 Mar 7]. Disponível em: <http://143.107.240.85/site/wp-content/uploads/GTextoSBC.pdf>
163. Santos DR. Avaliação da qualidade de vida relacionada à saúde bucal de crianças e adolescentes com artrite idiopática juvenil [dissertação]. Uberlândia: Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia; 2014.
164. Fernandes EGC, Guissa VR, Saviolli C, Siqueira JTT, Valente M, Silva CAA. Osteonecrosis of the jaw on imaging exams of patients with juvenile systemic lupus erythematosus. *Rev Bras Reumatol* 2010; 50(1):3-15.
165. Esser D, Alvarez-Llamas G, De Vries MP, Weening D, Vonk RJ, Roelofsen H. Sample stability and protein composition of saliva: implications for its use as a diagnostic fluid. *Biomark Insights* 2008;3: 25-37.
166. Turesson C, O'Fallon WM, Crowson CS, Gabriel SE, Matteson EL. Occurrence of extraarticular disease manifestations is associated with excess mortality in a community based cohort of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2002; 29(1):62-7.
167. Andonopoulos A, Drosos A, Skopouli F, Moutsopoulos H. Sjogren's syndrome in rheumatoid arthritis and progressive systemic sclerosis. A comparative study. *Clin Exp Rheumatol* 1988; 7(2):203-5.
168. Russell SL, Reisine S. Investigation of xerostomia in patients with rheumatoid arthritis. *J Am Dent Assoc* 1998; 129(6):733-9.
169. Walton A, Welbury R, Foster H, Thomason J. Juvenile chronic arthritis: a dental review. *Oral Dis* 1999; 5(1):68-75.
170. Siamopoulou A, Mavridis A, Vasakos S, Benecos P, Tzioufas A, Andonopoulos A. Sialochemistry in juvenile chronic arthritis. *Rheumatology*. 1989; 28(5):383-5.

171. Fessler BJ, Alarcón GS, McGwin G, Roseman J, Bastian HM, Friedman AW, et al. Systemic lupus erythematosus in three ethnic groups: XVI. Association of hydroxychloroquine use with reduced risk of damage accrual. *Arthritis Rheum* 2005; 52(5):1473-80.
172. Albilia JB, Lam DK, Clokie CM, Sándor GK. Systemic lupus erythematosus: a review for dentists. *J Can Dent Assoc* 2007;73(9):823-30.
173. Wilson DC. Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular [Internet]. University of Cambridge: Cambridge University Press; 2010. [citado em 2017 Abr 3]. Disponível em: http://www2iquspbr/docente/miyamoto/DEG_5_Tecnicas_eletroforeticaspdf
174. Zalewska A, Zwierz K, Zólkowski K, Gindzieński A. Structure and biosynthesis of human salivary mucins. *Acta Biochim Pol* 1999; 47(4):1067-79.
175. Tabak LA. Structure and function of human salivary mucins. *Crit Rev Oral Biol Med* 1990; 1(4):229-34.
176. Illei GG, Tackey E, Lapteva L, Lipsky PE. Biomarkers in systemic lupus erythematosus: I. General overview of biomarkers and their applicability. *Arthritis Rheum* 2004; 50(6):1709-20.
177. Zoukhri D, Rawe I, Singh M, Brown A, Kublin CL, Dawson K, et al. Discovery of putative salivary biomarkers for Sjögren's syndrome using high resolution mass spectrometry and bioinformatics. *J Oral Sci* 2012; 54(1):61-70.
178. Ryu O, Atkinson J, Hoehn G, Illei G, Hart T. Identification of parotid salivary biomarkers in Sjögren's syndrome by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and two-dimensional difference gel electrophoresis. *Rheumatol* 2006; 45(9):1077-86.
179. Mello RV. Aplicação de MALDI-TOF MS na caracterização de microalgas da família Selenastraceae (Chlorophyta) [dissertação]. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos. Programa de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais; 2016.

180. Banchereau R, Hong S, Cantarel B, Baldwin N, Baisch J, Edens M, et al. Personalized immunomonitoring uncovers molecular networks that stratify lupus patients. *Cell* 2016; 165(3):551-65.

APÊNDICE A- ARTIGO 1



Publicado na Revista Brasileira de Reumatologia, v. 56(5): 441-450, 2016.

ISSN 0482-5004. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbre.2016.02.006>

Fator de Impacto: 0,859

Extrato da Capes: B2

O que o reumatologista deve saber sobre as manifestações orais das doenças reumáticas autoimunes

Autores:

Aline Lauria Pires Abrão

Caroline Menezes Santana

Ana Cristina Barreto Bezerra

Rivadávio Fernandes Batista de Amorim

Mariana Branco da Silva

Licia Maria Henrique da Mota

Denise Pinheiro Falcão



REVISTA BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA

www.reumatologia.com.br



Artigo de revisão

O que o reumatologista deve saber sobre as manifestações orofaciais das doenças reumáticas autoimunes



Aline Lauria Pires Abrão^{a,*}, Caroline Menezes Santana^b, Ana Cristina Barreto Bezerra^a, Rivadávio Fernandes Batista de Amorim^b, Mariana Branco da Silva^c, Licia Maria Henrique da Mota^d e Denise Pinheiro Falcão^b

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília (UnB), Brasília, DF, Brasil

^b Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília (UnB), Brasília, DF, Brasil

^c Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília (UnB), Brasília, DF, Brasil

^d Serviço de Reumatologia, Hospital Universitário de Brasília (UnB), Brasília, DF, Brasil

INFORMAÇÕES SOBRE O ARTIGO

Histórico do artigo:

Recebido em 4 de fevereiro de 2015

Aceito em 28 de agosto de 2015

On-line em 11 de fevereiro de 2016

Palavras-chave:

Doenças reumáticas autoimunes

Manifestações orofaciais

Saliva

Lesões bucais

Doença periodontal

R E S U M O

Manifestações orofaciais ocorrem com frequência nas doenças reumáticas e, comumente, representam sinais iniciais ou de atividade da doença que ainda são negligenciados na prática clínica. Entre as doenças reumáticas autoimunes com possíveis manifestações orais incluem-se artrite reumatoide (AR), miopatias inflamatórias (MI), esclerose sistêmica (ES), lúpus eritematoso sistêmico (LES), policondrite recidivante (PR) e síndrome de Sjögren (SS). Sinais e sintomas orofaciais, como hipossalivação, xerostomia, disfunções temporomandibulares, lesões na mucosa bucal, doença periodontal, disfagia e disfonia, podem ser a primeira expressão dessas doenças reumáticas. Este artigo revisa as principais manifestações orofaciais das doenças reumáticas que podem ser de interesse do reumatologista, para diagnóstico e acompanhamento das doenças reumáticas autoimunes.

© 2016 Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

What rheumatologists should know about orofacial manifestations of autoimmune rheumatic diseases

A B S T R A C T

Orofacial manifestations occur frequently in rheumatic diseases and usually represent early signs of disease or of its activity that are still neglected in clinical practice. Among the autoimmune rheumatic diseases with potential for oral manifestations, rheumatoid arthritis (RA), inflammatory myopathies (IM), systemic sclerosis (SSc), systemic lupus erythematosus (SLE), relapsing polychondritis (RP) and Sjögren's syndrome (SS) can be cited. Signs and symptoms such as oral hyposalivation, xerostomia, temporomandibular joint

Keywords:

Autoimmune rheumatic diseases

Orofacial manifestations

Saliva

Oral lesions

Periodontal disease

* Autor para correspondência.

E-mail: alinelauria@hotmail.com (A.L. Abrão).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.rbr.2015.08.011>

0482-5004/© 2016 Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

disorders, lesions of the oral mucosa, periodontal disease, dysphagia, and dysphonia may be the first expression of these rheumatic diseases. This article reviews the main orofacial manifestations of rheumatic diseases that may be of interest to the rheumatologist for diagnosis and monitoring of autoimmune rheumatic diseases.

© 2016 Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introdução

As doenças reumáticas autoimunes são um grupo heterogêneo de condições caracterizadas pelo rompimento da tolerância imunológica e produção de autoanticorpos e uma série de substâncias responsáveis por lesões em diversas estruturas do organismo. Nessa categoria podem ser incluídas: a artrite reumatoide (AR), as miopatias inflamatórias (MI), a esclerose sistêmica (ES), o lúpus eritematoso sistêmico (LES) e a síndrome de Sjögren (SS).¹

Algumas doenças reumáticas apresentam manifestações mucocutâneas. Geralmente, as alterações são consequências de distúrbios sistêmicos e manifestam-se de forma insidiosa, podendo apresentar sinais e sintomas na cavidade oral (tabela 1). Contudo, a abordagem bucal no contexto das doenças autoimunes parece não ter despertado ainda o interesse científico. Serão discutidos alguns achados clínicos odontológicos frequentemente encontrados nos pacientes atendidos no Ambulatório de Reumatologia do Hospital Universitário de Brasília (HUB-UnB), fundamentados numa revisão de literatura narrativa. Para esta revisão, foram inseridos os seguintes termos no banco de dados da PubMed *Rheumatic Autoimmune Disease [all fields] AND dentistry [all fields]*. Limitou-se aos estudos feitos em humanos. Verificou-se a existência de somente 68 artigos publicados até 21 de junho de 2015. Alguns estudos apontam dados epidemiológicos de interesse médico-odontológico. Nesse contexto, percebe-se claramente a pouca abordagem do assunto. Contudo, os artigos evidenciam que o cirurgião-dentista pode e deve atuar no diagnóstico precoce e manejo dessas doenças, uma vez que esses pacientes apresentam necessidades específicas.

Assim, esta revisão narrativa se propõe a abordar as principais manifestações orofaciais nas doenças reumáticas autoimunes que podem ser de interesse do reumatologista para diagnóstico e acompanhamento clínico.

Revisão de literatura

Artrite reumatoide

A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória crônica, autoimune e de etiologia desconhecida.² As características clássicas dessa doença são poliartrites crônicas, bilaterais e simétricas, dores e inflamações articulares que podem resultar em deformidade, instabilidade e destruição das articulações sinoviais.^{3,4} Acomete, com mais frequência, a membrana sinovial das pequenas articulações das extremidades, origina tumefação, edema e dor, pode levar à destruição óssea e cartilaginosa, incapacidade grave e mortalidade prematura.³

As manifestações orofaciais mais comuns em pacientes com AR são:

Disfunção temporomandibular

A articulação temporomandibular (ATM) é uma articulação sinovial e pode ser acometida por distúrbios nos tecidos não articulares tais como: espasmos musculares, fibromialgia, distrofia miotônica, dentre outras. Contudo, os tecidos articulares da ATM também podem ser afetados por traumas mecânicos, infecções, iatrogenias, gota, bem como por doenças reumáticas autoimunes, como AR e psoríase.⁵ Observa-se presença de mediadores inflamatórios típicos da osteoartrite, incluindo o fator de necrose tumoral (TNF) - α , interleucina (IL) -1 β , IL-6 e a IL-8. Tais achados estão correlacionados com a extensão da doença, isto é, sintomas clínicos, quantidade de derrame articular ou alterações morfológicas.^{6,7}

As disfunções temporomandibulares (DTMs) são consideradas as condições mais comuns de dor orofacial de origem não dental e é função do cirurgião-dentista fazer o exame clínico da ATM e solicitar exames por imagem dessa região anatômica. A DTM pode manifestar sintomas como dor de ouvido, dor de cabeça, neuralgias inespecíficas e dor de dente. Seu diagnóstico requer abordagem de natureza odontológica e médica, o que faz a avaliação da prevalência de DTM uma questão complexa. Observa-se que seu estudo é frequentemente negligenciado na prática clínica das doenças autoimunes reumáticas.^{8,9}

As DTMs podem ocorrer tanto em adultos como, mais comumente, em crianças com AR. Um estudo que avaliou 223 crianças portadoras de artrite idiopática juvenil revelou que 38,6% apresentaram envolvimento da ATM (dor, inchaço e/ou limitação na amplitude de movimento).¹⁰ Quando o envolvimento da ATM se manifesta durante o desenvolvimento da criança, pode ocorrer restrição do crescimento da mandíbula que resulta em micrognatia e/ou anquilose.¹¹

Em adultos, os estudos sobre a prevalência de DTM na AR têm valores dispares de 5% a 86% a depender da população estudada, do critério de diagnóstico e dos meios de avaliação.^{4,5} Constitui a manifestação orofacial mais comum na AR. O paciente pode referir dor aguda, bilateral, profunda e difusa, exacerbada durante a função. O exame clínico pode revelar: má-oclusão, sensibilidade e inflamação das regiões pré-auriculares, rigidez da articulação ao acordar, limitação do movimento mandibular, ruídos intracapsulares (crepitação ou estalido) e dor nos músculos mastigatórios e/ou cervicais.^{4,12} Exames por imagem podem evidenciar perda de estrutura óssea em cabeça de côndilo (fig. 1). A anquilose da ATM é um achado incomum, tardio e pode ser bilateral.^{4,13}

Tabela 1 – Manifestações orais das doenças reumáticas autoimunes e suas implicações clínicas

Manifestações orais	Doenças reumáticas autoimunes					Implicações clínicas	
	AR	MI		ES	LES		SS
		PM	DM				
Doença periodontal	X			X	X	<ul style="list-style-type: none"> • Fator de agravamento para diabetes, doenças reumáticas e cardíacas 	
Lesão de cárie				X	X	X	<ul style="list-style-type: none"> • A depender da extensão da lesão, pode causar dor, prejudicar a mastigação e causar focos de infecção que podem agravar a diabetes, doenças reumáticas e cardíacas
Candidose					X	X	<ul style="list-style-type: none"> • Prurido e/ou queimação na mucosa • Risco de infecção esofágica • Inapetência
Hipossalivação	X			X	X	X	<ul style="list-style-type: none"> • Disfonia • Disfagia • Aftas e úlceras na mucosa bucal • Maior propensão a infecções bucais e da orofaringe³⁰ • Esofagites recorrentes • Sono interrompido para ingestão de água e para urinar
Xerostomia	X		X	X	X	X	<ul style="list-style-type: none"> • Diminuição na qualidade de vida
Halitose						X	<ul style="list-style-type: none"> • Diminuição na qualidade de vida
Ardência bucal	X			X	X	X	<ul style="list-style-type: none"> • Disgeusia • Dificuldade na alimentação • Cancerofobia
Úlceras orais			X		X	X	<ul style="list-style-type: none"> • Dor • Dificuldade na alimentação e higienização bucal
DTM	X		X	X	X		<ul style="list-style-type: none"> • Cefaleia • Otolgia e/ou zumbido • Sensação de tamponamento do ouvido • Dor cervical irradiada • Dor de cabeça crônica • Limitação na abertura bucal • Dificuldades para mastigar e falar¹²
Microstomia				X			<ul style="list-style-type: none"> • Limitação na abertura bucal • Dificuldade na alimentação e higienização bucal⁴⁶
Reabsorção regional do osso da mandíbula/ATM				X			<ul style="list-style-type: none"> • Limitação na abertura da boca
Disfagia		X	X			X	<ul style="list-style-type: none"> • Desidratação • Desnutrição • Aspiração de secreções e/ou alimentos para o pulmão -pneumonia aspirativa
Disfonia	X	X	X			X	<ul style="list-style-type: none"> • Diminuição da qualidade de vida
Alterações na língua		X	X			X	<ul style="list-style-type: none"> • Dificuldade na percepção dos alimentos, fonação e deglutição.
Quelite angular						X	<ul style="list-style-type: none"> • Dor e limitação na abertura da boca
Alterações morfológicas dentárias			X				<ul style="list-style-type: none"> • Alteração da estética facial e da função mastigatória
Alterações patológicas nas glândulas salivares					X	X	<ul style="list-style-type: none"> • Hipossalivação, disfagia e disfonia
Alterações nos músculos da mímica, mastigatórios e faringe			X				<ul style="list-style-type: none"> • Disfagia • Disfonia • Dificuldade mastigatória
Neuralgia do nervo trigêmeo							<ul style="list-style-type: none"> • Episódios de dor intensa nos olhos, lábios, nariz, couro cabeludo, testa e/ou mandíbula

AR, artrite reumatoide; DM, dermatomiosite; DTM, disfunção temporomandibular; ES, esclerose sistêmica; LES, lúpus eritematoso sistêmico; MI, miopatias inflamatórias; PM: polimiosite; SS, síndrome de Sjögren.

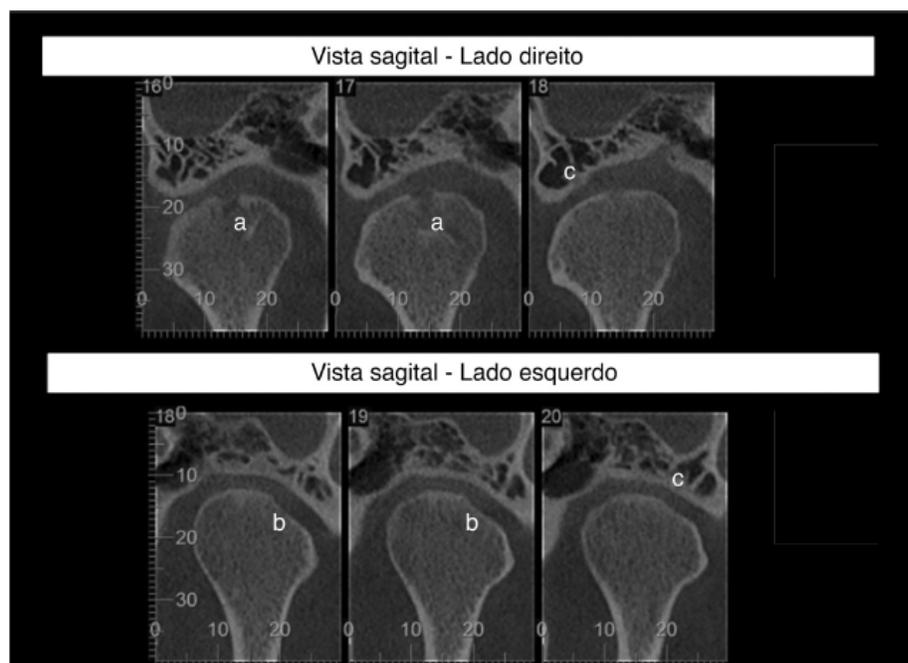


Figura 1 – Tomografia computadorizada da articulação temporomandibular de paciente com artrite reumatoide e queixa de estalido durante função mastigatória. Observa-se presença de cisto subcondral na porção superior da cabeça mandibular direita (a), desgaste da porção lateral da cabeça mandibular esquerda (b) e aplainamento das eminências articulares (c).

Doença periodontal

A doença periodontal (DP) é uma doença infecciosa crônica causada por bactérias Gram-negativas anaeróbias que acomete os tecidos de proteção e suporte do dente, como a gengiva, o ligamento periodontal, o cimento e o osso alveolar. A designação DP inclui tanto processos reversíveis (gingivite) quanto irreversíveis (periodontite). Quando não diagnosticada e tratada poderá causar destruição progressiva do osso alveolar, causar mobilidade e subsequente perda do dente.¹⁴ Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, a doença periodontal afeta de 10 a 15% da população mundial.¹⁴ Dados oficiais brasileiros mostram que 19,4% da população adulta, na faixa de 35 a 44 anos, possuem essa doença.¹⁵

Alguns estudos recentes também sugerem uma associação significativa entre AR e DP.^{13,16-18} A relação entre AR e a progressão de condições inflamatórias como a periodontite não está clara. A razão principal é a falta de uniformização na classificação das várias formas de ambas as doenças.¹⁹ Estima-se que a prevalência da DP aumente em duas vezes nos pacientes com AR em comparação com a população em geral.¹⁷ Assim como a presença de AR moderada a severa também aumenta mais de duas vezes o risco de desenvolver formas de periodontite moderada a grave comparativamente a indivíduos sem AR.¹⁷⁻¹⁹

Além disso, há evidências da semelhança na patogênese da AR e da DP. Microrganismos, tais como *Porphyromonas gingivalis*, podem desempenhar um papel em ambas as condições.¹⁶ Verificou-se que tal espécie bacteriana pode

invadir os condrócitos humanos isolados de articulações do joelho, interferem no ciclo celular e induzem a apoptose dessas células.²⁰ Outro fator importante seria que a *P. gingivalis* expressa o peptídeo arginina deiminase (PAD), que converte a arginina em citrulina, pelo processo de citrulinização. Esse processo, que é comum a algumas proteínas humanas, está associado à fisiopatologia da AR. Apresenta uma baixa imunotolerância às proteínas citrulinadas no líquido sinovial, o que desencadeia o desenvolvimento de imunoglobulinas contra essas proteínas presentes nas articulações e tendões.^{21,22} Além disso, estudos demonstraram presença de anticorpos em resposta a bactérias anaeróbias bucais em tecido sinovial e no soro. Observou-se, também, a presença de DNA bacteriano oral no fluido sinovial de pacientes com AR.¹⁸ Na verdade, a AR e a DP apresentam uma diversidade de características clínicas e fisiopatológicas marcadamente semelhantes (tabela 2).^{23,24}

Apesar de a doença periodontal apresentar manifestações clínicas locais, sua natureza inflamatória crônica pode contribuir para alterar e até mesmo agravar o curso da AR e de outras doenças reumáticas. Uma recente revisão sistemática feita por Kaur et al. (2013) demonstrou bom nível de evidência para apoiar uma associação entre AR e DP, levando-se em consideração a perda do dente, o nível clínico de inserção e as taxas de sedimentação de eritrócitos. Evidência moderada foi notada nas taxas de proteína C reativa e a interleucina-1. Foi observado um resultado positivo do tratamento periodontal sobre as características clínicas da AR. No entanto, mais estudos são necessários para explorar plenamente os processos bioquímicos e as relações entre essas doenças inflamatórias

Tabela 2 – Semelhanças nas características patofisiológicas da AR e DP.^{23,24}

Características patofisiológicas	Artrite reumatoide	Doença periodontal
Infiltrado celular	Macrófagos, linfócitos T, Plasmócitos e PMN	Idem
Fenômeno imune	Deposição de complexo imune, fixação de complemento	Idem
Citocinas	IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α e TGF- β	Idem
Células locais afetadas	Condrócitos e sinoviócitos	Fibroblasto gengival, osteoblasto e queratinócitos
Indução de reabsorção óssea	PGE ₂ , TNF- α , IL-1 β	PGE ₂ , TNF- α , IL-1 β , LPS
Destruição tecidual	Metaloproteinase, fosfolipase e elastase	Idem
Tecido de granulação	Presente na interface cartilagem/osso	Presente na interface cimento/osso

AR, artrite reumatoide; DP, doença periodontal; IL-1, interleucina-1 alfa; IL-1 β , interleucina-1 beta; IL-6, interleucina-6; IL-8, interleucina-8; LPS, lipopolissacarídeo; PGE₂, protaglandina E2; PMN, leucócitos polimorfonucleares; TNF α , fator de necrose tumoral alfa; TGF β , fator de transformação de crescimento beta.

crônicas, apesar da semelhança nas características patofisiológicas da AR e DP. Verifica-se que seis meses após a terapia periodontal a melhoria da condição bucal está fortemente associada com a melhoria da função endotelial, reduzindo processos inflamatórios locais e sistêmicos.²⁵

Hipossalivação/Xerostomia

Dentre as alterações bucais, verifica-se que a hipossalivação (baixo fluxo salivar) e a xerostomia (sensação de boca seca) são comuns nas doenças reumáticas autoimunes sendo que a xerostomia acomete 1% dos portadores de AR.²⁶ Cerca de um terço dos pacientes com AR apresenta SS secundária.²⁷ Estudo com 604 pacientes com AR indicou uma diminuição do fluxo salivar em 43% dos indivíduos.²⁸ O risco de desenvolver hipossalivação aumenta com a gravidade da doença. Interessante mencionar que estudo conduzido em 483 pacientes internados, devido a complicações de doenças reumáticas, constatou que apenas 17,7% dos pacientes com xerostomia realizaram tratamento para tal queixa. Em contrapartida, 84,8% dos pacientes com xerofthalmia receberam tratamento para xerofthalmia. Observou-se ainda que as modalidades de tratamento administradas para xerostomia não foram efetivas e nem estavam de acordo com as recomendações atuais encontrados na literatura médica.²⁹

Portanto, o diagnóstico oportuno e o monitoramento apropriado da SS associada à AR são importantes medidas para promover ganhos na qualidade de vida dos pacientes (conforme será abordado na SS), uma vez que a saliva desempenha

funções de interesse sistêmico como gustação, reparação epitelial da orofaringe e esôfago, tamponamento do conteúdo ácido esofágico, dentre outras funções.³⁰

Miopatias inflamatórias

Polimiosite (PM) e dermatomiosite (DM) são doenças autoimunes classificadas como miopatias inflamatórias idiopáticas e caracterizam-se por inflamação na musculatura estriada.³¹

A PM é uma doença sistêmica do tecido conjuntivo, cujo achado clínico predominante é fraqueza muscular proximal, bilateral e simétrica. Acomete músculos da cintura escapular e pélvica e progride para a musculatura proximal dos membros. O início é frequentemente gradual e progressivo. Tem incidência variável geograficamente, com cerca de um caso para cada 100 mil habitantes, predomina no gênero feminino.³²

O comprometimento da musculatura esquelética da parede posterior da faringe e do terço proximal do esôfago pode dar origem à disfagia alta, com refluxo de alimentos para vias aéreas altas e disfonia. Consequentemente, o paciente pode apresentar queixa de hipersalivação. Essa, porém, será decorrente da atividade funcional deficiente dos músculos da deglutição, associada ao reflexo salivar causado pelo refluxo. O comprometimento do flexor do pescoço ocorre em dois terços dos casos, o que pode ocasionar dificuldade para sustentá-lo. Os sintomas constitucionais incluem: fadiga, febre baixa, perda de peso, artralgia ou artrite de pequenas e médias articulações.³³

Há raros casos de relatos que envolvem ulcerações em toda a extensão da língua, de aspecto linear, com secreção esbranquiçada nas bordas e atrofia de hemilíngua em que a mucosa se apresenta hiperemiada.³⁴

A DM é uma doença autoimune de etiologia desconhecida, que se caracteriza por uma vasculopatia sistêmica de pequenos vasos com envolvimento predominantemente muscular e cutâneo. A caracterização da DM se baseia, além do envolvimento cutâneo, no padrão de envolvimento muscular e na presença de manifestações clínicas associadas e alterações histopatológicas.³⁵

A prevalência de envolvimento oral na DM é desconhecida. A maioria das informações disponíveis vem de relatos de casos individuais ou de pequenas séries de casos sendo que alguns relatos de casos iniciais não separam claramente a DM da PM.³⁶

Pode ocorrer envolvimento dos músculos da mímica, o que leva a uma diminuição da expressão facial. Da mesma forma, o acometimento dos músculos mastigatórios e da faringe podem resultar em disfagia, disfonia e hipersalivação. O envolvimento do músculo estriado na faringe ou esôfago proximal também contribui para a disfagia. A disfagia na DM atinge 18% a 50% dos pacientes e correlaciona-se com a severidade da doença.^{36,37} Ademais, aumenta o risco de pneumonia por aspiração. As taxas de mortalidade são de 1 a 5 anos em 31% dos pacientes com DM e disfagia.³⁷ Entretanto, a manifestação de hipersalivação nem sempre é atribuível ao excesso de produção salivar, mas pode ser causada por uma incapacidade de reter e engolir saliva devido à fraqueza do tônus muscular perioral ou disfagia. O envolvimento da musculatura da língua resulta em macroglossia com hipotonia, o que também podem dificultar a mastigação, deglutição e

fonação.³⁸ O acometimento da membrana mucosa é relatado em cerca de 10-20% dos casos.³⁹ Edema na mucosa, eritema e telangiectasia são as alterações orais mais comuns.³⁸

Apesar de 27,5% dos pacientes com DM apresentarem artrite, o acometimento da ATM é raro, com apenas um caso descrito na literatura. Em alguns relatos foram descritos vasos sanguíneos proeminentes em toda mucosa oral e lesões similares a estomatites aftosas e úlceras.⁴⁰ Cerca de 10 a 46% dos pacientes desenvolvem úlceras orais e gengivais dolorosas.⁴¹ Os dentes apresentam raízes curtas e bojudas, com obliteração dos canais radiculares, bem como calcificação da câmara pulpar. A xerostomia também se apresenta como uma queixa comum.⁴²

Esclerose sistêmica

A esclerose sistêmica (ES) é uma doença autoimune que se caracteriza por inflamação e hiper-reatividade vascular da micro e macrocirculação associadas à deposição excessiva de colágeno nos tecidos, com consequente fibrose da pele e/ou órgãos internos.⁴³ Tem predileção pelo sexo feminino e sua incidência é de 2 a 10 para cada 1.000.000 indivíduos na população em geral.⁴⁴ Além disso, existe um reconhecido aumento de morbidade e mortalidade, com sobrevida estimada de 66% em 10 anos.⁴⁵

As manifestações orais são pouco estudadas e muitas vezes negligenciadas pelos clínicos, apesar de acarretar grande incapacidade funcional. A microstomia é o achado bucal mais frequente e se desenvolve devido à deposição de colágeno nos tecidos periorais, causa limitação da abertura da boca, enrugamento dos sulcos periorais, rigidez do palato mole, da laringe e da mucosa oral.⁴⁶ Além disso, a hipossalivação e a xerostomia são manifestações secundárias da doença. Podem ocorrer, também, DTM com graus variáveis de reabsorção posterior do ramo da mandíbula, processo coronoide, mento e côndilo.⁵ Acredita-se que essas áreas são reabsorvidas devido à deposição crônica de colágeno. O câncer da língua tem frequência significativamente aumentada em pacientes com ES e com uma abertura de boca inferior a 30 mm.⁴⁷

A reabsorção de alguns dentes também tem sido relacionada com certa frequência nesses pacientes. Pode ocorrer um aumento anormal da frequência de dentes cariados e erupção dentária atípica. Parece, também, haver predisposição à DP devido ao maior acúmulo de placa bacteriana. Isso decorre da dificuldade de higienização da boca causada pela diminuição da abertura de boca e dificuldade de manuseio da escova dental. Essa última é causada pelas alterações escleróticas nos dedos e nas mãos. Ademais, o uso de corticosteroides sistêmicos por longos períodos atua na redução da resposta inflamatória periodontal, torna seu processo progressivo e muitas vezes de forma insidiosa.⁴⁸

Lúpus eritematoso sistêmico

LES é uma doença autoimune, de etiologia desconhecida, influenciada por fatores ambientais e genéticos, que afeta principalmente mulheres nas segunda e terceira décadas de vida.⁴⁹ A prevalência das lesões bucais nos pacientes com LES varia entre 6,5% a 21%. Acomete principalmente língua, mucosa jugal, lábios e palato. Por esse motivo, as úlceras orais

são consideradas eventos primários que estão incluídos nos seguintes índices de atividade da doença: Bilag (British Isles Lupus Assessment Group),⁵⁰ Sledai (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index),⁵¹ Selena-Sledai (Safety of Estrogens in Lupus Erythematosus National Assessment), Slam (Systemic Lupus Activity Measure)⁵² e Ecalm (European Consensus Lupus Activity Measurement).⁵³

As lesões se manifestam de forma variada, como máculas e placas na mucosa. As lesões podem ser eritematosas, ulceradas, estomatites aftosas recorrentes e lesões semelhantes a líquen plano ou leucoplasia (fig. 2). O tamanho das lesões também é variável e as úlceras apresentam-se desde uma pequena erosão superficial até uma área larga e extensa.^{54,55} Os poucos estudos sobre lesões bucais em pacientes com LES demonstram, microscopicamente, para ou ortoceratose, acantose, atrofia epitelial, degeneração vacuolar da membrana basal com necrose dos queratinócitos basais, espessamento da membrana basal, infiltrado mononuclear liquenoide e vasculite nos tecidos conectivos profundos. Lesões no vermelhão dos lábios, principalmente no lábio inferior, merecem atenção especial dos profissionais, pois podem estar relacionadas à queilite lúpica, com ou sem displasia epitelial.^{54,56}

Outros sinais/sintomas orofaciais secundários incluem: ardência bucal, hipossalivação, xerostomia, doenças das glândulas salivares (como necrose focal da glândula parótida), DTM, gengivite descamativa e DP.⁵⁴ A hipossalivação pode levar ao aumento da ocorrência de lesões de cárie e à predisposição de candidose, especialmente se estiverem sendo administrados agentes imunossupressores, como corticosteroides.⁵⁶

Síndrome de Sjögren

A SS é uma doença autoimune inflamatória de curso crônico frequente na qual há infiltração linfocitária nas glândulas exócrinas, principalmente em glândulas lacrimais e salivares, prejudicando sua função secretora.⁵⁵ Simultaneamente, podem ocorrer manifestações sistêmicas de natureza cutânea, respiratória, renal, hepática, neurológica e vascular. Existem duas formas distintas: a SS primária – que não se manifesta associada a outra desordem – e a SS secundária – em que o paciente manifesta a síndrome associada a outras doenças autoimunes.^{57,58}

Calcula-se que afete 0,2% da população mundial, principalmente mulheres na razão de 9:1.^{57,58} No Brasil, pela ausência de estimativas oficiais ou cientificamente confirmadas sobre sua incidência, não se sabe o número exato de indivíduos com SS. Porém, existe a referência quanto à maioria dos casos diagnosticados contemplar mulheres na menopausa ou em idade mais avançada.⁵⁹

A SS tem curso variável e um amplo espectro de manifestações clínicas. Além disso, muitos dos sintomas são inespecíficos, o que torna o diagnóstico difícil e tardio. Oitenta por cento dos pacientes com SS apresentam o início insidioso dos sintomas de secura que evoluem ao longo de um período de vários meses a anos.⁵⁸

As manifestações bucais observadas em pacientes com SS são atribuídas ao envolvimento das glândulas salivares, o que leva à diminuição da secreção salivar. A perda da lubrificação, da capacidade tamponante e antimicrobiana da saliva causam



Figura 2 - Paciente com lúpus eritematoso sistêmico e queixa de sensibilidade dentária gengival. Observa-se presença de doença periodontal com extensa perda de gengiva inserida (a) e regiões com exudato purulento (b). Verifica-se manifestação de líquen plano reticular com estrias de Wickham em gengiva (c) e mucosa (d). O cirurgião-dentista encaminhou para o reumatologista, pois suspeitava que o lúpus encontrava-se em fase ativa e tal suspeita foi confirmada.

aumento na incidência de infecção oral/dental, friabilidade da mucosa e sintomas de irritação e ardência bucal (fig. 3).⁵⁷ Por outro lado, alguns pacientes referem xerostomia que pode não estar acompanhada pela diminuição da taxa de secreção salivar.³⁰ No entanto, observa-se que no estágio inicial da doença, momento em que o diagnóstico ainda não se encontra bem estabelecido, os pacientes podem apresentar queixas de xerostomia decorrentes de mudanças na composição da saliva ou pela redução da secreção salivar proveniente das glândulas salivares menores da mucosa labial e palato. Ou seja, a sialometria pode evidenciar que o paciente apresenta um fluxo salivar normal, porém exames da composição da saliva apontarão alterações qualitativas.⁶⁰

Comumente são notadas lesões de cárie dentária e infecções fúngicas nas mucosas (principalmente candidose), que podem se manifestar como lesões pseudomembranosas ou eritematosas. A friabilidade da mucosa em pacientes com SS muitas vezes leva a lesões de tecidos moles. Tais sinais incluem lábios secos e rachados, glossite rombóide mediana ou língua fissurada, língua despapilada, estomatite, quelite angular, lesões aftosas, úlceras em mucosa labial, dificuldade na deglutição de alimentos sólidos e odinofagia.⁵⁷

Observa-se que indivíduos com SS frequentemente apresentam distúrbios da voz e sintomas correlacionados que estão associados com redução da qualidade de vida. Sabe-se que a lubrificação das cordas vocais é feita pela saliva.⁶¹ Portanto, esse fluido biológico é importante para adequada fonação.

Outro aspecto relevante refere-se à queda na qualidade de vida dos pacientes com SS devido a mudanças dos hábitos alimentares causadas pela boca seca.⁶² Verifica-se, ainda, que a secura bucal está fortemente correlacionada com fadiga, dor, sofrimento psíquico, danos à qualidade do sono e é considerada fator de risco vascular.⁶³ Neste estudo, os autores concluíram que a abordagem terapêutica multidisciplinar pode ser a melhor maneira de minimizar a secura bucal e suas consequências em pacientes com SS primária.⁶³

Finalmente, outra manifestação bucal bastante comum é o aumento assintomático e autolimitado das glândulas parótidas ou outras glândulas salivares maiores,⁵⁵ que pode sinalizar o estágio inicial da SS.

Portanto, o estabelecimento do diagnóstico precoce da SS é fundamental para a instituição do tratamento correto, que consiste no alívio dos sinais e sintomas, a fim de que sejam



Figura 3 - Língua despapilada (a) e com candidose (b) em paciente com síndrome de Sjögren que se apresentou com queixa de ardência bucal, sensação de algo preso na garganta e paladar reduzido. Exames de padrões salivares evidenciaram hipossalivação severa (fluxo sem estímulo: 0 mL/min; fluxo com estímulo: 0,1 mL/min) e pH ácido (6,3). Observa-se perda de estrutura mineral com formação de fendas nos dentes (c) e porosidades nas resinas (d), situações que promovem grande desconforto ao paciente devido ao maior atrito dessas com a mucosa ressecada.

minimizadas ou evitadas sequelas que possam repercutir na saúde e na qualidade de vida dos pacientes.⁶⁴

Sialogogos gustatórios, mecânicos e químicos têm sido usados para estimular a produção de saliva. Entretanto, a efetividade desses recursos é baixa, pois fornecem apenas alívio passageiro e requerendo aplicações frequentes.⁶⁵ Muitos tratamentos tópicos como sprays, pastilhas, colutórios, géis, óleos ou cremes dentais têm sido avaliados, mas não existe qualquer evidência forte de que o tratamento tópico seja eficaz para aliviar a sensação de boca seca.⁶⁶ Lubrificantes à base de triéster glicérol oxigenado são mais eficazes do que sprays de eletrólitos à base de água. Mascar chiclete aumenta a produção de saliva, mas não há evidência de que a goma seja melhor ou pior do que substitutos da saliva. Contudo, devem-se evitar sialogogos ácidos e os que contêm açúcar,⁶⁶ pois reduzem o pH bucal. Além disso, promovem maior desmineralização dentária e irritam uma mucosa já muito sensível. Deve-se optar pelo uso de gomas de mascar sem açúcar, mas com flúor e bicarbonato em sua composição. Tais componentes aumentam o pH salivar e auxiliam na prevenção da cárie dentária.^{67,68}

Os sialogogos químicos, como pilocarpina e cevimelina, são eficazes no alívio da hipossalivação, mas têm potencial para causar efeitos adversos.⁶⁵ A eletroestimulação aplicada nas vias aferentes, através da mucosa bucal ou na pele, em regiões de glândulas salivares, evidenciou aumento da produção salivar e alívio da xerostomia em pacientes com SS⁶⁵ e em pacientes submetidos à radioterapia em região cérvico-encefálica.⁶⁹

Uma revisão sistemática foi feita para reunir evidências sobre a terapia medicamentosa em SS primária de ensaios clínicos randomizados. Os autores sugeriram que produtos de substituição de saliva e gomas de mascar sem açúcar podem ser eficazes quando há boca seca de leve a moderada. Devem ser evitados o consumo de álcool e tabagismo e é essencial o estabelecimento de higiene bucal minuciosa. O tratamento de escolha para pacientes com função residual da glândula salivar é a pilocarpina oral e a cevimelina. No entanto, a eficácia das duas drogas não foi comparada. As doses que comprovaram melhores efeitos de eficácia e segurança foram de 5 mg de pilocarpina a cada 6 horas e de 30 mg de cevimelina a cada 8 horas. A N-acetilcisteína pode ser uma alternativa em pacientes com contraindicações ou intolerância para agonistas muscarínicos.⁷⁰

Conclusão

As manifestações orofaciais em pacientes com doenças reumáticas autoimunes são problemas comuns, mas pouco abordados pelo reumatologista em sua prática clínica diária. Este artigo trouxe um resumo das principais manifestações observadas, a fim de familiarizar o reumatologista com seu diagnóstico e alertar para a possível necessidade de encaminhamento precoce para o cirurgião-dentista.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Agradecimentos

À Nathalya Lopes Silva, Rafaelly Stavale, Talitha Giovanna da Silva e Francisca Iresdania Alves Macêdo pela grande cooperação no levantamento bibliográfico. A segunda e última autoras também são gratas pelo apoio financeiro da Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

REFERÊNCIAS

- Mosca M, Chiara T, Rosaria T, Stefano B. Undifferentiated connective tissue diseases (UCTD): simplified systemic autoimmune diseases. *Autoimmun Rev.* 2011;10(5):256-8.
- Helmick CG, Felson DT, Lawrence RC, Gabriel S, Hirsch R, Kwoh CK, et al. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States: Part I. *Arthritis Rheum.* 2008;58(1):15-25.
- Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Birnbaum NS, et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 2010;62(9):2569-81.
- Sidebottom A, Salha R. Management of the temporomandibular joint in rheumatoid disorders. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2013;51(3):191-8.
- Aliko A, Ciancaglini R, Alushi A, Tafaj A, Ruci D. Temporomandibular joint involvement in rheumatoid arthritis: systemic lupus erythematosus and systemic sclerosis. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2011;40(7):704-9.
- Takahashi T, Kondoh T, Fukuda M, Yamazaki Y, Toyosaki T, Suzuki R. Proinflammatory cytokines detectable in synovial fluids from patients with temporomandibular disorders. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.* 1998;85(2):135-41.
- Kaneyama K, Segami N, Nishimura M, Suzuki T, Sato J. Importance of proinflammatory cytokines in synovial fluid from 121 joints with temporomandibular disorders. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2002;40(5):418-23.
- Melchiorre D, Calderazzi A, Bongi SM, Cristofani R, Bazzichi L, Eligi C, et al. A comparison of ultrasonography and magnetic resonance imaging in the evaluation of temporomandibular joint involvement in rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis. *Rheumatology.* 2003;42(5):673-6.
- Manfredini D, Guarda-Nardini L, Winocur E, Piccotti F, Ahlberg J, Lobbezoo F. Research diagnostic criteria for temporomandibular disorders: a systematic review of axis I epidemiologic findings. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.* 2011;112(4):453-62.
- Cannizzaro E, Schroeder S, Muller LM, Kellenberger CJ, Saurenmann RK. Temporomandibular joint involvement in children with juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol.* 2011;38(3):510-5.
- Scrivani SJ, Keith DA, Kaban LB. Temporomandibular disorders. *N Engl J Med.* 2008;359(25):2693-705.
- Roldán-Barraza C, Janko S, Villanueva J, Araya I, Lauer HC. A Systematic Review and Meta-analysis of Usual Treatment Versus Psychosocial Interventions in the Treatment of Myofascial Temporomandibular Disorder Pain. *J Oral Facial Pain Headache.* 2013;28(3):205-22.
- Klasser GD, Balasubramaniam R, Epstein J. Topical review-connective tissue diseases: orofacial manifestations including pain. *J Orofac Pain.* 2007;21(3):171-84.

14. Petersen PE, Ogawa H. Strengthening the prevention of periodontal disease: the WHO approach. *J Periodontol.* 2005;76(12):2187-93.
15. Bascones-Martínez A, Matesanz-Pérez P, Escribano-Bermejo M, González-Moles M-Á, Bascones-Ilubdaín J, Meuman J-H, et al. Periodontal disease and diabetes - Review of the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2011;16(6):e722-9.
16. Hitchon CA, Chandad F, Ferucci ED, Willwzme A, Ioan-Facsinay A, van der Woude D, et al. Antibodies to Porphyromonas gingivalis are associated with anticitrullinated protein antibodies in patients with rheumatoid arthritis and their relatives. *J Rheumatol.* 2010;37(6):1105-12.
17. Berthelot JM, Goff BL. Rheumatoid arthritis and periodontal disease. *Joint Bone Spine.* 2010;77(6):537-41.
18. Oğrendik M, Kokino S, Ozdemir F, Bird PS. Serum antibodies to oral anaerobic bacteria in patients with rheumatoid arthritis. *Medscape Gen Med.* 2005;7(2):2.
19. Mercado F, Marshall RI, Klestov AC, Bartold PM. Relationship between rheumatoid arthritis and periodontitis. *J Periodontol.* 2001;72(6):779-87.
20. Pischon N, Roehner E, Hocke A, Guessan PN, Müller HC, Matziolis G, et al. Effects of Porphyromonas gingivalis on cell cycle progression and apoptosis of primary human chondrocytes. *Ann Rheum Dis.* 2009;68(12):1902-7.
21. Detert J, Pischon N, Burmester GR, Buttgerit F. The association between rheumatoid arthritis and periodontal disease. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(5):218.
22. De Smit MJ, Brouwer E, Vissink A, van Winkelhoff AJ. Rheumatoid arthritis and periodontitis; a possible link via citrullination. *Anaerobe.* 2011;17(4):196-200.
23. Preshaw PM, Taylor JJ. How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? *J Clin Periodontol.* 2011;38(s11):60-84.
24. Lundberg K, Wegner N, Yucel-Lindberg T, Venables PJ. Periodontitis in RA—the citrullinated enolase connection. *Nat Rev Rheumatol.* 2010;6(12):727-30.
25. Tonetti MS, D'Aiuto F, Nibali L, Donald A, Storry C, Parkar M, et al. Treatment of periodontitis and endothelial function. *N Engl J Med.* 2007;356(9):911-20.
26. Tureson C, O'Fallon WM, Crowson CS, Gabriel SE, Matteson EL. Occurrence of extraarticular disease manifestations is associated with excess mortality in a community based cohort of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2002;29(1):62-7.
27. Andonopoulos A, Drosos AA, Skopouli FN, Moutsopoulos HM. Sjogren's syndrome in rheumatoid arthritis and progressive systemic sclerosis. A comparative study. *Clin Exp Rheumatol.* 1988;7(2):203-5.
28. Russell SL, Reisine S. Investigation of xerostomia in patients with rheumatoid arthritis. *J Am Dental Assoc (1939).* 1998;129(6):733-9.
29. Guobis Z, Baseviciene N, Paipaliene P. Aspects of xerostomia prevalence and treatment among rheumatic inpatients. *Medicina (Kaunas, Lithuania).* 2007;44(12):960-8.
30. Falcão DP, Mota LMHD, Pires AL, Bezerra ACB. Sialometry: aspects of clinical interest. *Rev Brasil Reumatol.* 2013;53(6):525-31.
31. Scola R, Werneck L, Prevedello D. Polimiosite e dermatomiosite. Dendrito, Curitiba. 1999;4:77-82.
32. Yazici Y, Kagen LJ. Clinical presentation of the idiopathic inflammatory myopathies. *Rheum Dis Clin N Am.* 2002;28(4):823-32.
33. Lundberg IE, Dastmalchi M. Possible pathogenic mechanisms in inflammatory myopathies. *Rheum Dis Clin N Am.* 2002;28(4):799-822.
34. Gibson J, Lamey PJ, Zoma A, Ballantyne J. Tongue atrophy in mixed connective tissue disease. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1991;71(3):294-6.
35. Mastaglia FL, Ojeda VJ. Inflammatory myopathies: part 1. *Ann Neurol.* 1985;17(3):215-27.
36. Tanaka TI, Geist SMRY. Dermatomyositis: a contemporary review for oral health care providers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2012;114(5):e1-8.
37. Oh THE, Brumfield KA, Hoskin TL, Stolp KA, Murray JA, Basford JR. Dysphagia in inflammatory myopathy: clinical characteristics, treatment strategies, and outcome in 62 patients. *Mayo Clin Proc.* 2007;82(4):441-7.
38. Tanaka TI, Geist SRY. Dermatomyositis: a contemporary review for oral health care providers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2012;114(5):e1-8.
39. Márton K, Hermann F, Dankó K, Fejérdy P, Madléna M, Nagy G. Evaluation of oral manifestations and masticatory force in patients with polymyositis and dermatomyositis. *J Oral Pathol Med.* 2005;34(3):164-9.
40. Brennan MT, Patronas NJ, Brahim JS. Bilateral condylar resorption in dermatomyositis A case report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontol.* 1999;87(4):446-51.
41. Huber AM, Dugan EM, Lachenbruck PA, Feldman BM, Perez MD, Zemel LS, et al. Preliminary validation and clinical meaning of the Cutaneous Assessment Tool in juvenile dermatomyositis. *Arthritis Care Res.* 2008;59(2):214-21.
42. Akdis CA, Akdis M, Bieber T, Bindslev-Jensen C, Boguniewicz M, Eigenmann P, et al. Diagnosis and treatment of atopic dermatitis in children and adults: European Academy of Allergy and Clinical Immunology/American Academy of Allergy, Asthma and Immunology/PRACTALL Consensus Report. *Allergy.* 2006;61(8):969-87.
43. Tamby MC, Chanseaud Y, Guillevin L, Mouthon L. New insights into the pathogenesis of systemic sclerosis. *Autoimmun Rev.* 2003;2(3):152-7.
44. Katsambas A, Stefanaki C. Life-threatening dermatoses due to connective tissue disorders. *Clin Dermatol.* 2005;23(3):238-48.
45. Silman A. Scleroderma-demographics and survival. *J Rheumatol.* 1997; Supplement 48: 58-61.
46. Yuen HK, Marlow NM, Reed SG, Mahoney S, Summerlin LM, Leite R, et al. Effect of orofacial exercises on oral aperture in adults with systemic sclerosis. *Disabil Rehabil.* 2012;34(1):84-9.
47. Alanta A, Cabane J, Hachulla E, Princ G, Ginisty D, Hassin M, et al. Recommendations for the care of oral involvement in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Care Res.* 2011;63(8):1126-33.
48. Nagy G, Kovács J, Zeher M, Czirják L. Analysis of the oral manifestations of systemic sclerosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994;77(2):141-6.
49. Al-Rayes H, Al-Swailem R, Arfin M, Sobki S, Rizvi S, Tariq M. Lupus Around the World Systemic lupus erythematosus and infections: a retrospective study in Saudis. *Lupus.* 2007;16(9):755-63.
50. Hay EM, Bacon PA, Gordon C, Isenberg DA. The BILAG index: a reliable and valid instrument for measuring clinical disease activity in systemic lupus erythematosus. *QJM.* 1993;86(7):447-58.
51. Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH, Austin A, et al. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. *Arthritis Rheum.* 1992;35(6):630-40.
52. Liang MH, Socher SA, Larson MG, Schur PH. Reliability and validity of six systems for the clinical assessment of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1989;32(9):1107-18.

53. Vitali C, Bencivelli W, Isenberg DA, Smolen JS, Snaith ML, Sciuto M, et al. Disease activity in systemic lupus erythematosus: report of the Consensus Study Group of the European Workshop for Rheumatology Research. II. Identification of the variables indicative of disease activity and their use in the development of an activity score. The European Consensus Study Group for Disease Activity in SLE. *Clin Exp Rheumatol*. 1991;10(5):541-7.
54. Brennan MT, Valerin MA, Napeñas JJ, Lockhart PB. Oral manifestations of patients with lupus erythematosus. *Dent Clin N Am*. 2005;49(1):127-41.
55. Mays JW, Sarmadi M, Moutsopoulos NM. Oral manifestations of systemic autoimmune and inflammatory diseases: diagnosis and clinical management. *J Evidence Based Dent Pract*. 2012;12(3):265-82.
56. Albilía JB, Lam DK, Clokie CM, Sándor GK. Systemic lupus erythematosus: a review for dentists. *J Can Dent Assoc*. 2007;73(9):823-30.
57. Kassan SS, HM Moutsopoulos. Clinical manifestations and early diagnosis of Sjogren syndrome. *Arch Intern Med*. 2004;164(12):1275.
58. Dawson LJ, Smith PM, Moots RJ, Field ES. Sjogren's syndrome-time for a new approach. *Rheumatology (Oxford)*. 2000;39(3):234-7.
59. Barbieri R, Chierighin A. Síndrome de Sjögren. *Temas Reumatol Clín*. 2009;10(3):88-93.
60. Falcão DP, Leal SC, Vieira CN, Wolff A, Almeida TF, Nunes FP, et al. Sialometry of upper labial minor glands: a clinical approach by the use of weighing method Schirmer's test strips paper. *Sci World J*. 2014;268634.
61. Tanner K, Pierce JL, Merrill RM, Miller KL, Kendall KA, Roy N. The Quality of Life Burden Associated With Voice Disorders in Sjögren's Syndrome. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2015;124:721-7.
62. Lanfranchi H, Ansola M. Dry Mouth and Nutrition Quality of Life in Patients With Sjögren Syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2013;116(6):e499.
63. Gandía M, Morales-Espinoza EM, Martín-González RM, Retamozo S, Kostov B, Belenguer-Prieto R, et al. Factors influencing dry mouth in patients with primary Sjögren syndrome: usefulness of the ESSPRI index. *Oral Health Dent Manage*. 2014;13(2):402-7.
64. Miedany YE, Ahmed I, Mourad HG, Mehanna AN, Aty SA, Gamal HM, et al. Quantitative ultrasonography and magnetic resonance imaging of the parotid gland: can they replace the histopathologic studies in patients with Sjogren's syndrome? *Joint Bone Spine*. 2004;71(1):29-38.
65. Strietzel FP, Lafaurie GI, Mendoza GR, Alajbeg I, Pejda S, Vuletic L, et al. Efficacy and safety of an intraoral electrostimulation device for xerostomia relief: a multicenter, randomized trial. *Arthritis Rheum*. 2011;63(1):180-90.
66. Furness S, Worthington HV, Bryan G, Birchenough S, McMillian R. Interventions for the management of dry mouth: topical therapies. *Cochrane Database Syst Rev*. 2011;7:CD008934.
67. Anderson LA, Orchardson R. The effect of chewing bicarbonate-containing gum on salivary flow rate and pH in humans. *Arch Oral Biol*. 2003;48(3):201-4.
68. Bijella MF, Brighenti FL, Buzalafi MAR. Fluoride kinetics in saliva after the use of a fluoride-containing chewing gum. *Braz Oral Res*. 2005;19(4):256-60.
69. Lakshman AR, Babu GS, Rao S. Evaluation of effect of transcutaneous electrical nerve stimulation on salivary flow rate in radiation induced xerostomia patients: A pilot study. *J Cancer Res Ther*. 2015;11(1):229.
70. Ramos-Casals M, Tzioufas AG, Stone JH, Sisó A, Bosch X. Treatment of primary Sjögren syndrome: a systematic review. *JAMA*. 2010;304(4):452-60.

APÊNDICE B- ARTIGO 2



Publicado na Revista Brasileira de Reumatologia, v. 53(6): 525-531, 2013.

ISSN 0482-5004. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbr.2013.03.001>.

Fator de Impacto: 0,859

Extrato da Capes: B2

Sialometria: aspectos de interesse clínico

Autores:

Denise Pinheiro Falcão

Licia Maria Henrique da Mota

Aline Lauria Pires

Ana Cristina Barreto Bezerra



REVISTA BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA

www.reumatologia.com.br



SOCIEDADE BRASILEIRA
DE REUMATOLOGIA

Artigo de revisão

Sialometria: aspectos de interesse clínico

Denise Pinheiro Falcão^{a,*}, Licia Maria Henrique da Mota^{a,b}, Aline Lauria Pires^c,
Ana Cristina Barreto Bezerra^c

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília (UnB), Brasília, DF, Brasil

^bServiço de Reumatologia, Hospital Universitário de Brasília (UnB), Brasília, DF, Brasil

^cPrograma de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília (UnB), Brasília, DF, Brasil

INFORMAÇÕES

Histórico do artigo:

Recebido em 26 de setembro de 2012

Aceito em 12 de março de 2013

Palavras-chave:

Saliva

Sialometria

Fluxo Salivar

Hipossalivação

Xerostomia

RESUMO

A saliva total é um complexo de secreções multiglandulares composto de fluido gengival, células epiteliais descamadas, microrganismos, produtos do metabolismo bacteriano, resíduos alimentares, leucócitos, muco da cavidade nasal e da faringe. A saliva possui diversas funções, incluindo reparação tecidual, tamponamento, proteção, digestão, gustação, ação antimicrobiana, manutenção da integridade do dente e sistema de defesa antioxidante. A redução do fluxo salivar (hipossalivação) é um distúrbio comum, e estima-se que cerca de 20% da população geral tenham esta alteração.

A hipossalivação pode ser decorrente de diabetes mellitus, hipotireoidismo, desidratação, comprometimento do parênquima glandular por processos infecciosos, doenças granulomatosas ou condições autoimunes e inflamatórias (como a síndrome de Sjögren e a artrite reumatoide), radioterapia da região cefálica e/ou cervical, bem como pode estar associada a distúrbios do humor, efeitos adversos ocasionados pelo uso de algumas medicações ou, ainda, ser de causa idiopática. As terapias convencionais para o tratamento da redução do fluxo salivar, com o uso de sialogogos gustatórios e químicos, ainda apresentam restrições.

Contudo, novas alternativas têm mostrado grande perspectiva no tratamento deste problema. Diagnosticar um paciente como hipossalivador crônico é um desafio na prática clínica, e os métodos de avaliação do fluxo salivar são pouco conhecidos pelos reumatologistas. A avaliação seriada do fluxo salivar é importante para o correto diagnóstico e prognóstico de determinadas condições bucais e sistêmicas. Esta revisão aborda alguns aspectos relacionados à função da saliva, às consequências da hipossalivação e aos métodos de medição da taxa de fluxo salivar, conceitos úteis na prática diária do reumatologista.

© 2013 Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

* Autor para correspondência.

E-mail: dfalcao@terra.com.br (D.P. Falcão).

Sialometry: aspects of clinical interest

ABSTRACT

Keywords:

Saliva
Sialometry
Salivary flow
Hyposalivation
Xerostomia

Whole saliva is a multiglandular secretion complex consisting of gingival fluid, desquamated epithelial cells, microorganisms, products of bacterial metabolism, food debris, leukocytes mucus from the nasal cavity and the pharynx. Saliva has many functions, including tissue repair, tamponage, protection, digestion, taste, antimicrobial action, maintaining tooth integrity and antioxidant defense system. A decrease in salivary flow (hyposalivation) is a common disorder and it is estimated that approximately 20% of the general population have this alteration. Hyposalivation may be due to diabetes mellitus, hypothyroidism, dehydration, impaired glandular parenchyma by infectious processes, granulomatous diseases or autoimmune and inflammatory conditions (such as Sjögren's syndrome and rheumatoid arthritis), radiotherapy of head and/or neck region, or it may be associated with mood disorders, adverse effects caused by the use of some medications or even be idiopathic. Conventional therapies for the treatment of reduced saliva flow with the use of chemical and gustatory secretagogues are still limited. However, new alternatives have shown great perspective in the treatment of this disorder. To diagnose a patient as having chronic hyposalivation is a challenge in clinical practice and methods of salivary flow assessment are little known by rheumatologists. The serial evaluation of salivary flow is important for the diagnosis and prognosis of certain oral and systemic conditions. This review addresses some aspects related to the role of saliva, the consequences of hyposalivation and methods of salivary flow rate measurement, useful concepts in the daily practice of rheumatology.

© 2013 Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

Introdução

A saliva é uma mistura de fluidos secretada principalmente pelos três pares de glândulas salivares maiores: parótida, submandibular e sublingual. Também participam desta secreção de 400 a 500 pequenas glândulas salivares distribuídas pela mucosa bucal (exceto na gengiva e metade anterior do palato duro), pelos lábios e ao longo da mucosa do trato aerodigestivo superior, presente da cavidade nasal até a laringe e faringe.^{1,2} Juntas, essas glândulas são responsáveis pelos 5% restantes da saliva secretada pelo homem.³ A saliva secretada pelas principais glândulas difere quanto à composição, e considera-se que o homem secreta aproximadamente de 0,5 litro de saliva por dia em resposta à estimulação do sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático.⁴

A redução do fluxo salivar (hipossalivação) é um distúrbio comum e estima-se que cerca de 20% da população geral tenham esta alteração.⁵ É natural o ser humano passar por períodos curtos de hipossalivação, sendo frequente sua ocorrência quando sob estresse psicológico.^{6,7} Alterações de fluidos e eletrólitos, como ocorrem no diabetes mellitus, no hipotireoidismo e na baixa hidratação também podem provocar redução do fluxo salivar. Entretanto, a hipossalivação pode ser decorrente de múltiplas causas, que podem incluir comprometimento do parênquima glandular por processos infecciosos e inflamatórios, associados ou não a doenças granulomatosas, condições autoimunes (como a síndrome de Sjögren e a artrite reumatoide),^{2,8} radioterapia da região cefálica e/ou cervical,^{9,10} como também pode estar associada aos distúrbios do humor,⁶ efeitos adversos ocasionados pelo uso de algumas medicações⁶ ou, ainda, ser de causa idiopática.¹¹ A redução do fluxo e as mudanças da composição salivar atingem 25% da

população idosa, sendo comuns queixas de desconforto bucal e sistêmico em decorrência dessas mudanças.¹²

As terapias convencionais para o tratamento da redução do fluxo salivar, com o uso de sialogogos gustatórios e químicos, ainda apresentam restrições. Contudo, novas alternativas têm mostrado grande perspectiva no tratamento deste problema.^{13,14}

Diagnosticar um paciente como hipossalivador crônico é um desafio na prática clínica¹⁵ devido à falta de registros históricos que apontem o padrão salivar do paciente.¹⁶ Contudo, a avaliação seriada do fluxo salivar é importante para o correto diagnóstico e para o prognóstico de determinadas condições bucais e sistêmicas.^{17,18} Afirma-se que os profissionais da saúde ainda não adotaram esta prática em virtude do desconhecimento da existência de processos simples de avaliação.¹⁸⁻²⁰ Como resultado, a hipossalivação deixa de ser diagnosticada em pacientes assintomáticos. Por outro lado, alguns pacientes podem ser erroneamente diagnosticados como portadores de boca seca quando a xerostomia (sensação de boca seca) não é acompanhada pela diminuição da taxa de secreção salivar.²¹

Esta revisão objetiva abordar alguns aspectos relacionados à função da saliva, às consequências da hipossalivação e aos métodos de medição da taxa de fluxo salivar, conceitos úteis na prática diária do reumatologista.

Funções da saliva

A saliva possui inúmeras funções (Tabela 1) relacionadas à manutenção da integridade bucal e sistêmica²² e é fundamental para a primeira linha de defesa bucal.

Entretanto, a complexidade da composição molecular da saliva tem evidenciado sua importância no contexto sistê-

mico. A saliva atua na manutenção do pH do trato gastrintestinal superior.²³ Além disso, possui fatores de defesa como anticorpos, citocinas e fatores de crescimento que estão associados aos mecanismos de defesa e cicatrização de processos

inflamatórios e infecciosos não restritos à boca, mas também à orofaringe, ao esôfago e ao estômago.²⁴⁻²⁸

Os componentes salivares interagem com os microrganismos, sendo importantes para o controle da composição da microbiota bucal.²⁶ Nesse contexto, cabe destacar que pacientes sedados em unidades de terapia intensiva costumam apresentar mudanças nos padrões salivares em apenas duas semanas de internação. Observa-se que a maioria desses pacientes apresenta elevação da microbiota bucal gram-negativa, e que há também grande ocorrência de pneumonia nosocomial. Assim, tem-se estabelecido correlação entre as alterações da saliva e a manifestação de pneumonia nosocomial.²⁹

Tabela 1 – Funções da saliva e de seus componentes

Função	Efeito	Constituintes ativos
Reparação tecidual	Cicatrização da mucosa bucal, gástrica e da orofaringe	Fator de crescimento epidermal (FCE)
Proteção	Lubrificação da boca, orofaringe e esôfago Impermeabilização Lavagem Formação de película	Glicoproteínas Água
Tamponamento	Manutenção do pH inadequado para colonização de microrganismos Neutralização de acidez	Fosfato, bicarbonato e proteínas
Digestão	Formação do bolo alimentar Neutralização do conteúdo esofágico Digestão do amido, proteínas e lipídeos	Mucina e água Fosfato e bicarbonato Amilase, protease e lipase
Gustação	Solubilização de moléculas Maturação dos botões gustativos	Água Gustina e Zn ⁺⁺
Ação antimicrobiana	Barreira Anticorpos Antagonismo bacteriano Atividade antiviral Atividade antifúngica	Glicoproteína IgA, IgM e IgG Lisozima Lactoferrina Sistema de peroxidases, cistatinas, mucina e imunoglobulinas Histatina, cromogranina A e imunoglobulinas
Integridade do dente	Maturação do esmalte Proteção contra desmineralização Remineralização	Cálcio e fosfato Mucinas, fosfato e cálcio Proteínas rica em prolina, estaterina, fosfato e cálcio
Sistema de defesa antioxidante	Evita a formação de radicais livres, elimina os existentes e e repara os danos causados	Ácido úrico, albumina, alfa-tocoferol, betacaroteno, ascorbato e glutathione

Cate, 1998⁵³; Amerogen e Veerman, 2002.⁵⁴ (Adaptado.)

Consequências da hipossalivação

Em uma revisão sistemática sobre o assunto, concluiu-se que a taxa de fluxo de saliva total estimulada inferior aos limites normais (< 1,0 mL/min saliva estimulada) pode ser considerado fator preditor de cárie.³⁰ No que diz respeito ao grau de formação de cálculo dental, sabe-se que ele é dependente da taxa de secreção das glândulas salivares e que o baixo fluxo salivar, somado à alta viscosidade salivar, seria um fator de risco para a doença periodontal em idosos.³¹

A saliva reflete também o controle do consumo de água pelo organismo, pois quando o corpo está com falta de água, a boca fica seca, manifestando a sede.^{32,33} Observa-se que portadores de hipossalivação severa costumam ingerir mais líquido no decorrer do dia e durante a noite. Assim, são passíveis de acordar à noite com maior frequência para beber água e urinar. Essas interrupções frequentes do sono noturno podem favorecer insônia, depressão e queda da memória, o que afeta a qualidade de vida do indivíduo.³⁴

Além disso, verifica-se que a hipossalivação severa está associada à maior ocorrência de infecções fúngicas oportunistas em boca e orofaringe, mucosite, dificuldade para ingerir sólidos secos, disfagia, queimação na língua e em outras regiões da mucosa bucal, lesão de cárie rampante, biofilme dentário, instabilidade de próteses removíveis totais, disgeusia e halitose.^{24,35-38} Outro aspecto importante refere-se também à mudança de hábitos alimentares, pois a falta de saliva pode reduzir prazer de comer, devido à redução do paladar.^{38,39} Portanto, a hipossalivação pode causar danos de ordem física, funcional e social, diminuindo a qualidade de vida dos seus portadores.^{10,40}

No tocante aos danos de ordem social e à qualidade de vida, sabe-se que a halitose promove sérios transtornos emocionais aos seus portadores.^{41,42} Fisher (1.915) afirmou que o mau hálito pode ser sexualmente abominável por indicar uma variedade de doenças.⁴³ A saliva representa um fluido corporal sistêmico que contém, entre outros, compostos orgânicos voláteis (COVs). Esses compostos são considerados excelentes indicadores de exposição química ambiental e ocupacional, decorrentes de absorção transdérmica, inalação, ou pela ingestão de alimentos.⁴⁴ Os COVs da saliva têm sido usados em estudos fisiológicos, metabólicos, farmacocinéticos, forenses e toxicológicos.⁴⁴ Além disso, estudos clássicos^{45,46} e atuais^{47,48} afirmam que a halitose, na maioria dos casos, é de origem bucal e resultante do metabolismo das bactérias

anaeróbias proteolíticas que liberam compostos sulfurados voláteis (CSVs).

A saliva é fundamental não apenas para diluição desses compostos, mas também para proporcionar a lavagem da orofaringe, dificultando, assim, a estagnação de matéria orgânica e a consequente formação de compostos gasosos desagradáveis. Cabe destacar que, dependendo da capacidade de volatilização desses compostos, eles poderão ou não excitar o olfato humano de outras pessoas. Nesse contexto, é importante destacar que a halitose é a percepção de uma alteração na qualidade do odor do fluxo expiratório. Portanto, ela pode se manifestar como um sinal, halitose real, perceptível pelo examinador e pelas pessoas do convívio do portador; ou como um sintoma, pseudo-halitose, perceptível apenas pelo paciente.³⁷ A pseudo-halitose representa um grande desafio na rotina de atendimento clínico e ocasiona grandes mudanças comportamentais em decorrência da crença de se possuir mau hálito e da dificuldade de se estabelecer um diagnóstico preciso.⁴⁷ Esta situação pode ocorrer pela baixa concentração de compostos voláteis que excitam as terminações retronasais do portador, pela sensação de gosto ruim ou devido a distúrbios psiquiátricos, como a síndrome de referência olfativa. Não obstante, verifica-se que indivíduos portadores de hipossalivação severa e assialia são vulneráveis a distúrbios sensoriais gustatórios que acarretam gosto desagradável.⁴⁹

Métodos de avaliação do fluxo salivar

Testes utilizados no rastreamento de um fator de risco, no diagnóstico de uma doença e na estimativa do prognóstico de um paciente são fases importantes e dispendiosas da atenção à saúde, por isso merecem destaque na pesquisa clínica.⁵⁰

Vários métodos têm sido propostos para avaliação do fluxo salivar. A escolha da técnica pode ser feita coletando-se a saliva total ou de uma glândula específica. Além disso, a amostra pode ser obtida para avaliar o fluxo de saliva com e sem estímulo.

A saliva total é um complexo de secreções multiglandulares, composta de fluido gengival, células epiteliais descamadas, microrganismos, produtos do metabolismo bacteriano, resíduos alimentares, leucócitos, muco da cavidade nasal e da faringe.²⁶ Sua principal vantagem como elemento de avaliação clínica se deve à facilidade de coleta e por isso é mais utilizada que a amostra individualizada.

Quanto à ausência ou presença de estímulo na avaliação do fluxo salivar, a primeira irá principalmente refletir as condições funcionais das glândulas submandibulares e sublinguais, pois estas são as maiores responsáveis pela secreção basal. Entretanto, a natureza do estímulo irá influenciar o tipo de resposta. O estímulo mecânico favorece resposta acentuada da glândula parótida, enquanto o estímulo gustatório ativa os três pares de glândulas salivares maiores. A tabela 2 evidencia diferentes métodos utilizados para se avaliar a taxa de fluxo de saliva total. Na prática clínica utiliza-se com maior frequência o método de escoamento passivo para se avaliar a saliva não estimulada. Em relação à natureza do estímulo, têm-se valido mais do estímulo mecânico. Verifica-se que o período de cinco minutos de coleta tem sido muito utilizado

para avaliar a taxa de fluxo de saliva não estimulada e estimulada.

A tabela 3 evidencia os valores encontrados para a taxa de fluxo de saliva total sem estímulo e sob diferentes tipos de estímulos e também a variabilidade inter e intrapacientes. Além da técnica empregada, outros fatores podem influir nos resultados obtidos, tais como temperatura ambiente, umidade relativa do ar, ruídos no ambiente, horário da coleta, período de duração da coleta, tipo de estímulo gustatório, consistência e dimensão do estímulo mecânico, período de jejum, clareza do ambiente, e até mesmo estação do ano.^{17,51,52} Esses fatores devem ser controlados na medida do possível, e uma padronização de execução do exame deve ser adotada para não prejudicar a confiabilidade dos resultados dos exames.

A tabela 4 expõe valores de referência para se classificar os portadores de hipossalivação severa, leve e de normossialia. Contudo, o paciente deverá ser instruído a não fumar, comer, beber ou realizar quaisquer procedimentos de higiene bucal nas duas horas que antecedem as medições. Além disso, deverá tomar 300 mL de água duas horas antes das coletas de saliva para se evitar que a variabilidade na hidratação do organismo possa afetar os resultados. Outro aspecto importante refere-se à padronização do horário, ou seja, o monitoramento do fluxo deverá ser realizado sempre no mesmo horário em que se realizou a primeira coleta para se evitar as variações circadianas. Cabe ressaltar que o ambiente de atendimento deverá ser tranquilo e que o paciente deverá deixar seu celular desligado, pois, caso contrário, o toque ou qualquer tipo de sinalização do aparelho poderá gerar ansiedade e alterar os resultados. Quanto à sequência da avaliação, deve-se primeiro avaliar a saliva sem estímulo para depois verificar a taxa de fluxo salivar sob estímulo.

O profissional deve se empenhar para tornar este exame parte da rotina de atendimento nos casos em que o paciente será submetido a tratamentos que poderão promover alterações de fluxo salivar. Como por exemplo, antes de se prescrever medicamentos xerogênicos, além de quimio e iodoterapia, nos casos em que pacientes serão submetidos à radioterapia em região cervicocéfálica, na suspeita e no monitoramento da progressão de doenças autoimunes, bem como em outras situações de interesse odontológico.

Conclusões

A saliva possui diversas funções, incluindo reparação tecidual, tamponamento, proteção mecânica, digestão, gustação, ação antimicrobiana, manutenção da integridade do dente e sistema de defesa antioxidante. A hipossalivação pode ocasionar danos de ordem física, funcional e social, ocasionando impacto negativo na qualidade de vida dos pacientes.

Como um fluido orgânico, que varia de acordo com uma série de fatores e circunstâncias, o fluxo salivar deve ser avaliado clinicamente, e a adoção dessa prática requer padronização na sua execução.

Portanto, é importante que o reumatologista conheça as funções da saliva, as consequências da hipossalivação e os métodos de avaliação do fluxo salivar, uma vez que diagnosticar um paciente como hipossalivador crônico é um desafio na prática clínica, e a avaliação seriada do fluxo salivar é impor-

Tabela 2 – Métodos propostos para avaliação do fluxo de saliva total

Tipo saliva total	Métodos	Técnica de medição*	Vantagem	Desvantagem
Sem estímulo	Drenagem passiva	A saliva escorre passivamente da boca para um recipiente graduado	- Reproduzível - Confiável para medir fluxo salivar	- Evaporação de saliva
	Drenagem ativa	A saliva acumulada na boca deve ser periodicamente expectorada em um recipiente graduado	- Reproduzível - Confiável para medir fluxo salivar	- Evaporação de saliva - Há pequena estimulação do fluxo salivar no ato de cuspir
	Sucção	A saliva formada no assoalho bucal é aspirada e acumulada em um recipiente graduado	Independência da colaboração do paciente	- Há pequena estimulação do fluxo salivar
	Absorção	Swab, rolo de algodão ou gaze, previamente pesado, é introduzido na boca por um determinado tempo e pesado posteriormente	Detecta a presença de saliva na cavidade bucal, de forma simples e fácil, especialmente em ambulatórios e consultórios	- Há pequena estimulação do fluxo salivar - Método menos confiável - Altera a concentração de alguns componentes salivares
Com estímulo	Mecânico	Mastigar parafina, silicone ou goma de mascar sem sabor e expectorar a saliva em um recipiente graduado	- Ausência de efeitos colaterais - Não há contaminação da saliva com substâncias exógenas	A frequência de mastigações deve ser padronizada com auxílio de metrônomo
	Gustatório	Aplicação de ácido cítrico nas bordas laterais da língua		Pode interferir na análise de alguns componentes salivares
	Absorção	Swab previamente pesado é introduzido na boca para ser mastigado por um determinado tempo e pesado posteriormente	Detecta a presença de saliva na cavidade bucal, de forma simples e fácil, especialmente em ambulatórios e consultórios)	Há pequena estimulação do fluxo salivar - Método menos confiável - Altera a concentração de alguns componentes salivares

Tabela 3 - Taxa de fluxo de saliva total

Autor (ano)	Taxa de fluxo		Participantes			Tipo de estímulo	
	S/E	C/E	n	Idade	Gênero		
Becks e Wainwright (1943) ⁵⁶	0,32 (0,23)	2,0 (0,9)*	484	50*	5 - 49	M + F	Parafina
Bergdahl (2000) ⁵⁷	0,33 (0,26)	2,5 (1,06)	669		20 - 69	M	Parafina
	0,26 (0,21)	2,02 (0,93)	758		20 - 69	F	Parafina
Engelen et al. (2003) ⁵⁸	0,45 (0,18)	1,22 (0,52)	8		19 - 33	M	Parafina
		0,50 (0,24)					Odor
	0,35 (0,17)	2,69 (1,92)	14		19 - 33	F	Ácido cítrico
		1,06 (0,40)					Parafina
Eliasson et al. (2006) ⁵⁹	0,3 (0,2)	0,52 (0,20)	46		22 - 82	M	Odor
		2,06 (0,68)					Ácido cítrico
		2,4 (1,3)					Parafina
	0,2 (0,2)	1,8 (0,8)	96		18 - 81	F	Parafina

S/E, sem estímulo; C/E, com estímulo; M, masculino; F, feminino.

* Taxa de fluxo mL/min (desvio padrão).

Tabela 4 – Classificação da taxa de fluxo de saliva total

Taxa de fluxo De saliva total (ml/min)	Muito baixa	Baixa	Normal
sem estímulo	< 0,1	0,1- 0,25	> 0,25
Com estímulo	< 0,7	0,7 - 1,0	> 1,0
Ericsson e Hardwick, 1978. ⁶⁰			

tante para o correto diagnóstico, prognóstico e monitoramento de determinadas condições sistêmicas e bucais.

Conflitos de interesse

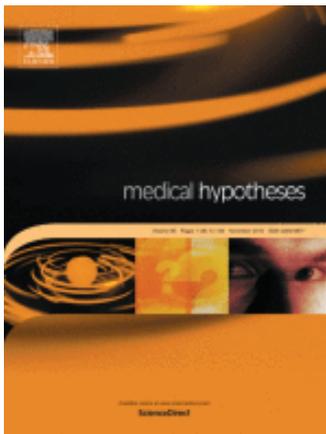
Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

REFERÊNCIAS

- Ferris RL, Myers EN. Salivary gland disorders. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2008;265: 735-36.
- Barcellos KSA, Andrade LEC. Histopatologia e imunopatologia de glândulas salivares menores de pacientes com síndrome de Sjögren (SS). *Bras J Rheumatol* 2005;45(4): 215-23.
- Melvin JE, Yule D, Shuttleworth T, Begenisich T. Regulation of fluid and electrolyte secretion in salivary gland acinar cells. *Annu Rev Physiol* 2005;67: 445-69.
- Watanabe S, Dawes C. The effects of different foods and concentrations of citric acid on the flow rate of whole saliva in man. *Arch Oral Biol* 1988;33(1): 1-5.
- Martinez JR. Treatment of Salivary Gland Disorders: Alternative Approaches. Available from URL: <http://www.nidcr.nih.gov/OralHealth/Topics/Saliva/AlternativeApproaches.htm> [accessed in september 17, 2012].
- Bergdahl M, Bergdahl J. Low unstimulated salivary flow and subjective oral dryness: association with medication, anxiety, depression, and stress. *J Dent Res* 2000;79(9): 1652-8.
- Bosch JA, Turkenburg M, Nazmi K, Veerman EC, de Geus EJ, Nieuw Amerongen AV. Stress as a determinant of saliva-mediated adherence and coadherence of oral and nonoral microorganisms. *Psychosom Med* 2003;65 (4): 604-12.
- Mota LMHd, Cruz BA, Brenol CV, et al. Consenso da Sociedade Brasileira de Reumatologia 2011 para o diagnóstico e avaliação inicial da artrite reumatoide. *Bras J Rheumatol* 2011;51(3): 207-19.
- Murdoch-Kinch CA, Russo N, Griffith S, Braun T, Eisbruch A, D'Silva NJ. Recovery of salivary epidermal growth factor in parotid saliva following parotid sparing radiation therapy: a proof-of-principle study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;97(1): 28-46. 2011;111(1): 64-70.
- Kakoei S, Haghdoost AA, Rad M, et al. Xerostomia after radiotherapy and its effect on quality of life in head and neck cancer patients. *Arch Iran Med* 2012;15(4): 214-18.
- Porter SR, Scully C, Hegarty AM. An update of the etiology and management of xerostomia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;97(1): 28-46.
- Atkinson JC, Grisius M, Massey W. Salivary hypofunction and xerostomia: diagnosis and treatment. *Dent Clin North Am* 2005;49(2): 309-26.
- Jensen S, Pedersen A, Vissink A, et al. A systematic review of salivary gland hypofunction and xerostomia induced by cancer therapies: management strategies and economic impact. *Support Care Cancer* 2010;18(8): 1061-79.
- Alajbeg I, Falcão DP, Tran SD, et al. Intraoral electrostimulator for xerostomia relief: a long-term, multicenter, open-label, uncontrolled, clinical trial. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2004;97(1): 28-46. 2012;113(6): 773-81.
- Navazesh M, Christensen C, Brightman V. Clinical criteria for the diagnosis of salivary gland hypofunction. *J Dent Res* 1992;71(7): 1363-9.
- Dawes C. Factors influencing salivary flow rate and composition. In: Edgar M, Dawes C, O'Mullane D, editors. *Saliva and Oral Health*. 3rd ed. London: British Dental Association; 2004:32-49.
- Sanchez-Guerrero J, Aguirre-Garcia E, Perez-Dosal MR, Kraus A, Cardiel MH, Soto-Rojas AE. The wafer test: a semi-quantitative test to screen for xerostomia. *Rheumatology (Oxford)* 2002;41(4): 381-9.
- Dawes C. Salivary flow patterns and the health of hard and soft oral tissues. *J Am Dent Assoc* 2008;139 Suppl: 18S-24S.
- Lopez-Jornet P, Camacho-Alonso F, Bermejo-Fenoll A. A simple test for salivary gland hypofunction using Oral Schirmer's test. *J Oral Pathol Med* 2006;35(4): 244-8.
- Leal SC, Falcão DP, Vieira CN, Zancheti AC, Filgueira T, Allegretti RV. Saliva e sua análise na prática clínica de um grupo de periodontistas *Rev Periodontia* 2008;18(2): 55-59.
- Borges BC, Fulco GM, Souza AJ, de Lima KC. Xerostomia and hyposalivation: a preliminary report of their prevalence and associated factors in Brazilian elderly diabetic patients. *Oral Health Prev Dent* 2010;8(2): 153-58.
- Navazesh M, Denny P, Sobel S. Saliva: a fountain of opportunity. *J Calif Dent Assoc* 2002;30(10): 783-8.
- Herrera JL, Lyons MF, 2nd, Johnson LF. Saliva: its role in health and disease. *J Clin Gastroenterol* 1988;10(5): 569-78.
- von Bultzingslowen I, Brennan MT, Spijkerket FK, et al. Growth factors and cytokines in the prevention and treatment of oral and gastrointestinal mucositis. *Support Care Cancer* 2006;14(6): 519-27.
- von Bultzingslowen I, Sollecito TP, Fox PC, et al. Salivary dysfunction associated with systemic diseases: systematic review and clinical management recommendations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;103 Suppl: S57 e1-15.
- Costa HO, Eckley CA. Correlação do pH e volume salivares com sintomas laringofaríngeos. *Rev Bras Otorrinolaringol* 2004;70(1): 24-28.
- Eckley CA, Costa HO. Estudo comparativo do pH e do volume salivar em indivíduos com laringofaringite crônica por doença do refluxo gastroesofágica antes e após o tratamento. *Rev Bras Otorrinolaringol* 2006;72(1): 55-60.
- Oxford GE, Tayari L, Barfoot MD, Peck AB, Tanaka Y, Humphreys-Beher MG. Salivary EGF levels reduced in diabetic patients. *J Diabetes Complicat* 2000;14(3): 140-45.
- Gibson G, Barrett E. The role of salivary function on oropharyngeal colonization. *Spec Care Dentist* 1992;12(4): 153-56.
- Micenaustch S, Yengopal V, Böncker M, Leal SC, Bezerra ACB, Oliveira LB. Minimum intervention (MI): A new approach in dentistry. A evidence-based compendium. South Africa: Midentistry corp, 2005.
- Hiroto T, Yoshihara A, Ogawa H, Ito K, Igarashi A, Miyazaki H. A preliminary study on the relationship between stimulated saliva and periodontal conditions in community-dwelling elderly people. *J Dent* 2006;34(9): 692-8.
- Jenkins GN. *The physiology of the mouth*. 3rd ed. Great Britain: The Alden Press, 1970.
- Mandel ID. The function of saliva. *J Dent Res*. 1987;66: 623-62.
- Tsuno N, Besset A, Ritchie K. Sleep and Depression. *J Clin Psychiatry* 2005;66(10): 1254-69.
- Ikebe K, Matsuda K, Morii K, et al. Impact of dry mouth and hyposalivation on oral health-related quality of life of elderly Japanese. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;103(2): 216-22.
- Mese H, Matsuo R. Salivary secretion, taste and hyposalivation. *J Oral Rehabil* 2007;34(10): 711-23.
- Falcão DP, Vieira CN, Batista de Amorim RF. Breaking paradigms: a new definition for halitosis in the context of pseudo-halitosis and halitophobia. *J Breath Res* 2012;6(1): 01705-05.
- Samnieng P, Ueno M, Shinada K, Zaitu T, Wright FA, Kawaguchi Y. Association of hyposalivation with oral function, nutrition and oral health in community-dwelling elderly Thai. *Community Dent Hlth* 2012;29(1): 117-23.

39. Zalewska A, Waszkiewicz N, Szajda SD, Waszkiel D. Impact of salivary flow and lysozyme content and output on the oral health of rheumatoid arthritis patients. *CORD Conference Proceedings* 2011;65: 40-45.
40. Jensen SB, Pedersen AML, Vissink A, et al. A systematic review of salivary gland hypofunction and xerostomia induced by cancer therapies: Prevalence, severity and impact on quality of life. *Support Care Cancer* 2010;18(8): 1039-60.
41. Suzuki N, Yoneda M, Naito T, Iwamoto T, Hirofuji T. Relationship between halitosis and psychologic status. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;106(4): 542-7.
42. Zaitso T, Ueno M, Shinada K, Wright FA, Kawaguchi Y. Social anxiety disorder in genuine halitosis patients. *Health Qual Life Outcomes* 2011;9: 94.
43. Fisher RA. The evolution of sexual preferences. *Eugen. Rev* 1915;7: 184 -92.
44. Soini HA, Klouckova I, Wiesler D, et al. Analysis of volatile organic compounds in human saliva by a static sorptive extraction method and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chem Ecol.* 2010;36(9): 1035-42.
45. Richter VJ, Tonzetich J. The Application of Instrumental Technique for the Evaluation of Odoriferous Volatiles from Saliva and Breath. *Arch Oral Biol* 1964;9: 47-54.
46. Tonzetich J, Kestenbaum RC. Odour production by human salivary fractions and plaque. *Arch Oral Biol* 1969;14(7): 815-27.
47. Fukui M, Hinode D, Yokoyama M, Yoshioka M, Kataoka K, Ito H-O. Levels of salivary stress markers in patients with anxiety about halitosis. *Arch Oral Biol* 2010;55(11): 842-47.
48. Kim JG, Kim YJ, Yoo SH, et al. Halimeter ppb Levels as the Predictor of Erosive Gastroesophageal Reflux Disease. *Gut Liver* 2010;4(3): 320-25.
49. Bergdahl M, Bergdahl J. Perceived taste disturbance in adults: prevalence and association with oral and psychological factors and medication. *Clin Oral Investig* 2002;6(3): 145-9.
50. Newman TB, Browner WS, Cummings SR. Delineando estudos de testes médicos. In: Hulley SB, Cummings SR, Browner WS, Grady DG, Newman TB, editors. *Delineando a Pesquisa Clínica - Uma Abordagem Epidemiológica: Artmed* 2008:384.
51. Shannon IL, Suddick RP. Effects of light and darkness on human parotid salivary flow rate and chemical composition. *Arch Oral Biol* 1973;18(5): 601-08.
52. Navazesh M, Kumar SK. Measuring salivary flow: challenges and opportunities. *J Am Dent Assoc* 2008;139 Suppl: 35S-40S.
53. Cate ART. *Oral histology: Development, structure, and function.* 5a. ed. St. Louis: Mosby-year book, 1998.
54. Amerogen AVN, Veerman ECI. Salivary glands and saliva - The defender of oral cavity. *Oral Dis* 2002;8: 12-22.
55. Vissink A, Wolff A, Veerman ECI. Saliva collectors. In: Wong DT, editor. *Salivary Diagnostics.* New Delhi, India: Wiley-Blackwell, 2008:320.
56. Becks H, Wainwright WW. Human Saliva XIII. Rate of flow of resting saliva in healthy individuals. *J Dent Res* 1943;22(5): 391-96.
57. Bergdahl M. Salivary flow and oral complaints in adult dental patients. *Community Dent Oral Epidemiol* 2000;28(1): 59-66.
58. Engelen L, de Wijk RA, Prinz JF, van der Bilt A, Bosman F. The relation between saliva flow rate after different stimulations and the perception of flavor and texture attributes in custard desserts. *Physiol Behav* 2003;78(1): 165-69.
59. Eliasson L, Birkhed D, Osterberg T, Carlen A. Minor salivary gland secretion rates and immunoglobulin A in adults and the elderly. *Eur J Oral Sci* 2006;114(6): 494-9.
60. Ericsson V, Hardwick L. Individual diagnosis, prognosis and counselling for caries prevention. *Caries Res* 1978;12 (Suppl 1):94-102.

APÊNDICE C- ARTIGO 3



Publicado na Revista *Medical Hypotheses*, v. 89: 97-100, 2016.

Fator de Impacto: 1,136

Extrato da Capes: B1

Salivary proteomics: A new adjuvant approach to the early diagnosis of familial juvenile systemic lupus erythematosus

Autores:

Aline Lauria P. Abrão

Denise Pinheiro Falcão

Rivadávio Fernandes Batista de Amorim

Ana Cristina B. Bezerra

Gilson Augusto N.M. Pombeiro

Luciano Junqueira Guimarães

Felipe Fregni

Luciano Paulino Silva

Lícia Maria Henrique da Mota



Contents lists available at ScienceDirect

Medical Hypotheses

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mehy

Salivary proteomics: A new adjuvant approach to the early diagnosis of familial juvenile systemic lupus erythematosus



Aline Lauria P. Abrão^{a,*}, Denise Pinheiro Falcao^b, Rivadávio Fernandes Batista de Amorim^c, Ana Cristina B. Bezerra^a, Gilson Augusto N.M. Pombeiro^d, Luciano Junqueira Guimarães^d, Felipe Fregni^c, Luciano Paulino Silva^e, Licia Maria Henrique da Mota^b

^a School of Health Sciences, University of Brasilia, Brazil

^b School of Medicine, University of Brasilia, Brazil

^c Laboratory of Neuromodulation & Center for Clinical Research Learning, Harvard Medical School, United States

^d University of Brasilia, Brazil

^e Embrapa Genetic Resources and Biotechnology and University of Brasilia, UnB, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 November 2015

Accepted 10 February 2016

ABSTRACT

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic multisystemic disease characterized by autoimmune inflammatory disturbance. Pleomorphic manifestations are present and a potentially progressive and debilitating course can be detected. SLE rarely manifests before age 5, and its onset peaks is around puberty. Although clinical manifestations, immunological alterations and treatment do not differ between juvenile and adult SLE, children tend to present with a more aggressive disease course than adults. Hence, autoimmune rheumatic diseases are the most common cause of morbidity and mortality in pediatric populations. Blood serum analysis plays an especially important role in the detection and monitoring of autoantibodies in SLE. However, since blood sampling is an uncomfortable procedure, especially in children, novel less invasive techniques and approaches are of utmost importance to evaluate pediatric subjects. In this regard, saliva samples have several advantages, such as: easy access, fast collection, painless and riskless procedure. Saliva has antimicrobial, immunomodulatory and anti-inflammatory properties, as well as several other relevant features. The whole saliva is a complex mixture of major and minor salivary gland secretion, gingival crevicular fluid, transudates plasma protein, keratinocyte products and oral microbiota. This biological fluid reflects the physiological state of the body, including the emotional condition, and endocrine, nutritional and metabolic changes. Therefore, salivary proteomics is becoming increasingly used for the early diagnosis of several diseases such as breast cancer, oral cancer, Sjögren's syndrome, diffuse systemic sclerosis, rheumatoid arthritis, among others. Considering the detection of some potential markers related to SLE in serum and urine, this study aims to conduct an initial evaluation of the possible presence of such biomarkers in saliva. Furthermore, it is expected to track down new salivary proteins that could be correlated with the disease. As such, it is important to evaluate whether the analysis of the salivary proteome of children whose mothers have SLE may help identify biomarkers for the early detection and monitoring of the condition.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic multisystemic disease. It is an autoimmune inflammatory disorder with pleomorphic manifestations and a potentially progressive and debilitating course. Characteristic features of SLE include the presence of a large number of autoantibodies and immune complex deposition, which causes widespread inflammation and tissue damage [1].

Due to the presence of autoantibodies, which target particular compounds in the cell, SLE is considered an autoimmune disease. It is suggested that autoimmune processes precede the clinical

* Corresponding author at: Asa Norte, Campus Darcy Ribeiro, University of Brasilia, Brasilia – DF, Brazil. Tel.: +55 61 3107 1710.

E-mail addresses: alinealpa@oabr.aer.mil.br, alinelauria@hotmail.com (A.L.P. Abrão), dfalcao@terra.com.br (D.P. Falcao), ramorim@neuromodulationlab.org (R.F.B. de Amorim), acrisbarreto@gmail.com (A.C.B. Bezerra), gilson.pombeiro@gmail.com (G.A.N.M. Pombeiro), lujunqueiramed@hotmail.com (L.J. Guimarães), felipe.fregni@ppcr.hms.harvard.edu (F. Fregni), luciano.paulino@embrapa.br, paulinoluciano@unb.br (L.P. Silva), liciamhota@gmail.com (L.M.H. da Mota).

manifestation of the disease [2]. Although the presence of autoantibodies is a characteristic feature of the disease, their number and relative concentration may vary widely among patients. Anti-Sm (Smith), nuclear ribonucleoprotein (nRNP), Ro (SS-A), La (SS-B) and anti-P antibodies are thought to be specific to lupus, though over 50 auto antigens have been identified in patients with SLE [3].

The worldwide prevalence of SLE is 40–50 per 100,000 individuals, and the condition affects predominantly women with a remarkable 10:1 female to male ratio disease incidence [4]. A recent study covering a broad geographical area of the United States of America found SLE to have an incidence of 6.63 per 100,000 North-Americans [5]. The mortality rate associated with the condition is around 3–5 times higher than that observed in the general population, and is mostly attributed to the chronic inflammatory processes [6].

The clinical course of SLE involves periods of exacerbation and remission. The frequent symptoms and clinical manifestations include fatigue, fever, myalgia, weight loss, peripheral lymphadenopathy, aseptic necrosis of the joints, photosensitivity and skin lesions [7]. The identification and prediction of disease activity are therefore crucial for effective treatment planning [4].

Although SLE may affect individuals of all ages, the initial clinical manifestations usually occurs in subjects between 15 and 44 years old [8]. Since many patients who develop the condition are only beginning their occupational careers, they experience significant losses in quality of life, which can restrict labor activities. Therefore, SLE impose a heavy financial burden on society, both at an individual level and for the public health system as a whole [9].

Familial patterns of SLE suggest that genetic susceptibility may play a role in the pathogenesis of the condition, though environmental, stochastic and epigenetic factors must be taken into account [3]. The ratio of the risk of disease recurrence among the siblings of affected individuals to disease incidence in the general population supports a potent role for genetic predisposition in disease susceptibility is about 40% [10].

Although juvenile SLE (JSLE) is rarer than the adult form of the disease, both conditions share similar characteristics. Around 10–20% of patients with SLE are diagnosed during the first decade of life [11]. The mean age of symptom onset is 12.1 years, with manifestations rarely occurring before age 5 [12–14]. The annual incidence of SLE in pediatric populations is estimated to be 6–20 per 100,000, with girls and non-whites being predominantly affected by the condition. Children usually experience higher disease activity and a more aggressive course compared to adults [15]. Renal and cutaneous involvement, fever, lymphadenopathy, vasculitis, and serum parameters such as high levels of autoantibodies (anti-Sm, anti-double strand DNA [dsDNA] and antiphospholipid antibodies) have significant diagnostic value for SLE, since they are highly specific to the condition and can also be used as classification criteria [16]. Other antibodies, although not disease-specific, can also contribute to the diagnosis [17]. Considering that SLE is responsible for the highest morbidity and mortality rates in pediatric patients with autoimmune rheumatic diseases, its early diagnosis is especially important [18,19].

Proteomics and autoimmune disease

In recent years, the advent of proteomics knowledge and techniques have provided new perspectives for the diagnosis of autoimmune diseases [20]. The main goals of protein analysis are to help in understanding the molecular mechanisms responsible for the regulation of cellular processes, and to identify biomarkers that can be used for diagnosis, disease monitoring and the identification of treatment targets.

In general, the study of autoimmune responses consists in assessing the presence and/or concentration of specific antibodies in biological fluids. Proteomics evaluation allows the simultaneous assessment of a large number of analytes extracted directly from small quantities of biological materials, in some situations (e.g. protein profiling) with no need for complex sample procedures. Its easy execution, small sample requirements, and reduced need of reagents make it viable when compared to immunoassays. Proteomics also allows for the simultaneous analysis of several samples by a single examiner within short periods of time [20,21].

Hypothesis

The study will be conducted in two phases. Firstly, we will conduct a matched case-control study to compare the protein profile of women's saliva with diagnostic for SLE, with two other control groups: women with another autoimmune rheumatic disease (rheumatoid arthritis) and women without autoimmune rheumatic diseases. The null hypothesis is that the salivary protein profiles are similar among the groups.

If the null hypothesis is rejected, a second phase will be performed. The saliva of children whose mothers have SLE will be compared to the saliva of children whose mothers do not have any autoimmune rheumatic disease.

Evaluation of the hypothesis

Several new methods, devices and techniques to elucidate the physiopathology of rheumatic diseases have emerged in recent years, such as gene polymorphism assays, DNA microarrays and proteomic analysis [22].

Mass spectrometry (MS) is one of the most widely used methods to access proteome's profile. This technique can be used as an additional resource to detect unknown compounds, quantify known elements, and elucidate the structure and chemical properties of the identified molecules [23]. MS has been selected over several other methods and used by many different studies to detect the presence or absence of proteins in blood, urine and saliva. This technique can determine the levels of gene expression and identify post-translational modifications of biomarkers in a proteome that is altered by disease or pharmacological interventions [24,25]. Although serum and plasma samples have been investigated by several MS-based proteomic studies, few studies have analyzed the salivary proteome [26].

MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight) is a MS technique which has proved to have several potential applications, and has been successfully used in the investigation and identification of proteins and peptides, in the taxonomic identification of microorganisms, in the identification and analysis of DNA polymorphisms, and in the investigation of post-transcriptional RNA modifications [27,28]. MALDI-TOF MS involves the co-crystallization of peptides with an organic matrix, which is subjected to laser bombardment and sublimates, at which point the ions transfer their charge to the analytes, forming peptide ions. The ionized molecules are then accelerated in a vacuum pipe. Upon reaching the detector, the time elapsed between ionization and detection is used to calculate its mass-to-charge ratio (m/z) [29,30].

This technique has been used to analyze the serum proteome of patients with SLE, and detected four potential diagnostic biomarkers (m/z ratios 4070.09, 7770.45, 28045.1 and 3376.02) for the disease [31]. Another study demonstrated the differential expression of 15 proteins in the serum of patients with SLE [22]. Proteins in urine samples have also been examined as potential biomarkers. The TNF-like weak inducer of apoptosis, for instance, has been found to distinguish patients with SLE and lupus nephritis (LN)

from those with the former condition but not the latter. Similarly, lipocalin-2 or neutrophil gelatinase-associated lipocalin is a protein expressed by leukocytes and epithelial cells under inflammatory conditions. It is present in patients with LN, but not in those without the condition [32], in both adult and pediatric populations with SLE [33]. Two additional markers (urinary MCP-1 and urinary OPG) have also been found to differentiate subjects with SLE and high renal activity (score ≥ 4) from those with the same condition but low renal activity (score < 4) [34]. Similar results have also been reported for the adhesion molecules urinary VCAM-1 and urinary ICAM-1 [35]. A very recent addition to the list of urinary markers of chronic LN is angiostatin [36]. A number of other proteins are still currently under investigation, and have yielded promising results as potential biomarkers. The proteomic analysis of serum and urine has been the focus of extensive research across several laboratories; new potential biomarkers derived from these sources are very likely to be identified in the near future [37].

Since saliva contains approximately 2000 proteins, of which 597 are also present in blood [38], salivary proteomics has proved to have great potential in the diagnosis of several diseases, including SLE. Saliva has antimicrobial, immunomodulatory and anti-inflammatory properties, as well as several other features [39]. The whole saliva is a complex mixture of secretions from the minor and major salivary glands, gingival crevicular fluids, protein transudates, molecules produced by oral keratinocytes and microbiota. As such, it reflects the physiological state of the body, and may be sensitive to emotional changes, as well as endocrine, nutritional and metabolic alterations [26,40–42]. Its analysis offers a number of advantages, such as the ease of sample collection and the absence of pain or discomfort to the patient.

The salivary proteome has been studied for biomarkers of different systemic and oral conditions, such as gastric cancer [43], diabetes type 1 and 2 [44,45], oral squamous cell carcinoma [46], breast cancer [47], caries risk [48], periodontal disease [49], pulmonary disease [50], and autism [51]. The quantitative and qualitative study of the salivary proteome may therefore make significant contributions to the diagnostics, treatment monitoring, disease pathogenesis, outcome predictions, classification of disease subtypes, risk assessments, characterization of metabolic pathways, quantification of biomarkers and identification of treatment targets [42,52].

Despite the valuable potential of this area of research, a search of the PubMed database using the keywords ((lupus [Title/Abstract] AND salivary [Title/Abstract]) AND proteomics [Title/Abstract] OR proteome [Title/Abstract] in October 2015 yielded no publications on the topic in humans. Therefore, it is important to consider the potential pathway of salivary proteomics in the diagnosis and prediction of disease activity of SLE in order to ensure the most appropriate approach in subjects with such disease.

Consequences of the hypothesis

MALDI-TOF MS can contemporaneously detect a set of proteins and peptides within a wide m/z range. It offers the chance to perform proteins and peptides profiling with a single acquisition step and can be therefore be used as a suitable proteomic platform even without previous separation steps [23]. Furthermore, the sensitivity of these platforms is very high, sample volume is reduced and detections at the low femtomole level can be achieved [26,29,53]. This method can also be used to detect bacteria and fungi and to replace the sequencing of unusual isolates, providing a consistent and cost-effective work platform. Additionally, MALDI-TOF MS eliminates the need for complementary biochemical assays that require additional expensive reagents [21].

The identification of salivary biomarkers of SLE could represent a valuable tool to monitor the disease activity by physicians before the development of severe symptoms and, thus, allowing a better follow-up of clinical outcomes. Additionally, the early detection of SLE biomarkers in children patients could alert physicians of the need for closer monitoring, in an attempt to prevent or at least minimize the severity of clinical evolution of the disease.

The use of saliva as a diagnostic fluid by proteomic analysis may also provide advantages over other methods due to its easy and non-invasive collection, which causes no pain or discomfort to the patient [26,41].

Sources of support

The second author (D.P.F.) is supported in part by the CAPES – Brazil – National Council for the Improvement of Higher Education.

Conflict of interest

None.

Acknowledgments

The authors are grateful to Caroline Menezes Santana Dourado, Mariana Branco da Silva and Rafaely Stavale for their great cooperation. The second author (D.P.F.) is also thankful for the financial support CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) – National Council for the Improvement of Higher Education. We are grateful for the technological support of Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). The authors declare that both CAPES and Embrapa have no role in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication.

References

- [1] Tunnicliffe DJ, Singh-Grewal D, Kim S, Craig JC, Tong A. Diagnosis, monitoring and treatment of systemic lupus erythematosus: a systematic review of clinical practice guidelines. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2015;67(10):1440–52.
- [2] Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, Scofield RH, Dennis GJ, James JA, et al. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2003;349(16):1526–33.
- [3] Nath SK, Kilpatrick J, Harley JB. Genetics of human systemic lupus erythematosus: the emerging picture. *Curr Opin Immunol* 2004;16(6):794–800.
- [4] World Health Organization, & Inter-Organization Programme for the Sound Management of Chemicals. (2006). Principles and methods for assessing autoimmunity associated with exposure to chemicals (No. 236). World Health Organization.
- [5] Furst DE, Clarke AE, Fernandes AW, Bancroft T, Greth W, Iorga SR. Incidence and prevalence of adult systemic lupus erythematosus in a large US managed-care population. *Lupus* 2013;22(1):99–105.
- [6] Cervera R, Khamashta MA, Font J, et al. Morbidity and mortality in systemic lupus erythematosus during a 10-year period: a comparison of early and late manifestations in a cohort of 1000 patients. *Medicine (Baltimore)* 2003;82(5):299–308.
- [7] Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997;40(9):1725.
- [8] Danchenko N, Satia JA, Anthony MS. Epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comparison of worldwide disease burden. *Lupus* 2006;15(5):308–18.
- [9] Turchetti G, Yazdany J, Palla I, Yelin E, Mosca M. Systemic lupus erythematosus and the economic perspective: a systematic literature review and points to consider. *Clin Exp Rheumatol* 2012;30(4 Suppl 73):S116–22.
- [10] Wandstrat A, Wakeland E. The genetics of complex autoimmune diseases: non-MHC susceptibility genes. *Nat Immunol* 2001;2(9):802–9.
- [11] Lee PP, Lee TL, Ho MH, Wong WH, Lau YL. Recurrent major infections in juvenile-onset systemic lupus erythematosus—a close link with long-term disease damage. *Rheumatology (Oxford)* 2007;46(8):1290–6.

- [12] Miettunen PML, Ortiz-Alvarez O, Petty RE. Gender and ethnic origin have no effect on longterm outcome of childhood-onset systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2004;31(8):1650–4.
- [13] Lo JT, Tsai MJ, Wang LH, et al. Sex differences in pediatric systemic lupus erythematosus: a retrospective analysis of 135 cases. *J Microbiol Immunol Infect* 1999;32(3):173–8.
- [14] Brunner HI, Silverman ED, To T, Bombardier C, Feldman BM. Risk factors for damage in childhood-onset systemic lupus erythematosus: Cumulative disease activity and medication use predict disease damage. *Arthritis Rheum* 2002;46(2):436–44.
- [15] Brunner HI, Gladman DD, Ibañez D, Urowitz MD, Silverman ED. Difference in disease features between childhood-onset and adult-onset systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2008;58(2):556–62.
- [16] Yu C, Gershwin ME, Chang C. Diagnostic criteria for systemic lupus erythematosus: a critical review. *J Autoimmun* 2014;48–49:10–3.
- [17] Drenkard C, Alarcón-Segovia D. The new prognosis of systemic lupus erythematosus: treatment-free remission and decreased mortality and morbidity. *Isr Med Assoc J* 2000;2(5):382–7.
- [18] Ravelli A, Duarte-Salazar C, Buratti S, et al. Assessment of damage in juvenile-onset systemic lupus erythematosus: a multicenter cohort study. *Arthritis Rheum* 2003;49(4):501–7.
- [19] Fenniche S, Triki S, Benmously R, Marrak H, Ben Ammar F, Mokhtar I. Lupus erythematosus in children: a report of six cases. *Dermatol Online J* 2005;11(2):11.
- [20] Plebani M, Pittoni M, Celadin M, Bernardi D, Mion MM. Recent advances in diagnostic technologies for autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 2009;8(3):238–43.
- [21] Dhiman N, Hall L, Wohlfel SL, Buckwalter SP, Wengenack NL. Performance and cost analysis of matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry for routine identification of yeast. *J Clin Microbiol* 2011;49(4):1614–6.
- [22] Kazempour N, Qazizadeh H, Sepehrimanesh M, Salimi S. Biomarkers identified from serum proteomic analysis for the differential diagnosis of systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2015;24(6):582–7.
- [23] Castagnola M, Cabras T, Iavarone F, et al. The human salivary proteome: a critical overview of the results obtained by different proteomic platforms. *Expert Rev Proteomics* 2012;9(1):33–46.
- [24] Caporossi L, Santoro A, Papaleo B. Saliva as an analytical matrix: state of the art and application for biomonitoring. *Biomarkers* 2010;15(6):475–87.
- [25] Good DM, Thongboonkerd V, Novak J, et al. Body fluid proteomics for biomarker discovery: lessons from the past hold the key to success in the future. *J Proteome Res* 2007;6(12):4549–55.
- [26] Al-Tarawneh SK, Border MB, Dibble CF, Bencharit S. Defining salivary biomarkers using mass spectrometry-based proteomics: a systematic review. *OMICS* 2011;15(6):353–61.
- [27] Croxatto A, Prod'homme G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev* 2012;36(2):380–407.
- [28] Marvin LF, Roberts MA, Fay LB. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. *Clin Chim Acta* 2003;337(1–2):11–21.
- [29] Ng EW, Wong MY, Poon TC. Advances in MALDI mass spectrometry in clinical diagnostic applications. *Top Curr Chem* 2014;336:139–75.
- [30] Kařka AP, Kleffmann T, Rades T, McDowell A. The application of MALDI TOF MS in biopharmaceutical research. *Int J Pharm* 2011;417(1–2):70–82.
- [31] Huang Z, Shi Y, Cai B, et al. MALDI-TOF MS combined with magnetic beads for detecting serum protein biomarkers and establishment of boosting decision tree model for diagnosis of systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 2009;48(6):626–31.
- [32] Pitashny M, Schwartz N, Qing X, Højaili B, Aranow C, Mackay M, et al. Urinary lipocalin-2 is associated with renal disease activity in human lupus nephritis. *Arthritis Rheum* 2007;56(6):1894–903.
- [33] Brunner HI, Mueller M, Rutherford C, et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a biomarker of nephritis in childhood-onset systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2006;54(8):2577–84.
- [34] Kiani AN, Johnson K, Chen C, et al. Urine osteoprotegerin and monocyte chemoattractant protein-1 in lupus nephritis. *J Rheumatol* 2009;36(10):2224–30.
- [35] Abd-Elkareem MI, Al Tamimy HM, Khamis OA, Abdellatif SS, Hussein MR. Increased urinary levels of the leukocyte adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 in human lupus nephritis with advanced renal histological changes: preliminary findings. *Clin Exp Nephrol* 2010;14(6):548–57.
- [36] Wu T, Du Y, Han J, et al. Urinary angiotensin-a novel putative marker of renal pathology chronicity in lupus nephritis. *Mol Cell Proteomics* 2013;12(5):1170–9.
- [37] Arriens C, Mohan C. Systemic lupus erythematosus diagnostics in the 'omics' era. *Int J Clin Rheumatol* 2013;8(6):671–87.
- [38] Pfäffle T, Cooper-White J, Beyerlein P, Kostner K, Pundydeera C. Diagnostic potential of saliva: current state and future applications. *Clin Chem* 2011;57(5):675–87.
- [39] Bassim CW, Redman RS, DeNucci DJ, Becker KL, Nysten ES. Salivary procalcitonin and periodontitis in diabetes. *J Dent Res* 2008;87(7):630–4.
- [40] Schipper RG, Silletti E, Vingerhoeds MH. Saliva as research material: biochemical, physicochemical and practical aspects. *Arch Oral Biol* 2007;52(12):1114–35.
- [41] Chiappin S, Antonelli G, Gatti R, De Palo EF. Saliva specimen: a new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clin Chim Acta* 2007;383(1–2):30–40.
- [42] Zhang A, Sun H, Wang P, Wang X. Salivary proteomics in biomedical research. *Clin Chim Acta* 2013;415:261–5.
- [43] Wu ZZ, Wang JG, Zhang XL. Diagnostic model of saliva protein finger print analysis of patients with gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2009;15(7):865–70.
- [44] Hirtz C, Chevalier F, Sommerer N, Raingeard I, Bringe J, Rossignol M, Périere DD. Salivary protein profiling in type I diabetes using two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Clin Proteomics* 2006;2(1–2):117–27.
- [45] Rao PV, Reddy AP, Lu X, et al. Proteomic identification of salivary biomarkers of type-2 diabetes. *J Proteome Res* 2009;8(1):239–45.
- [46] Hu S, Arellano M, Boontheung P, et al. Salivary proteomics for oral cancer biomarker discovery. *Clin Cancer Res* 2008;14:6246.
- [47] Streckfus CF, Bigler LR, Zwick M. The use of surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry to detect putative breast cancer markers in saliva: a feasibility study. *J Oral Pathol Med* 2006;35(5):292–300.
- [48] Rudney JD, Stalkov RK, Johnson JD. Potential biomarkers of human salivary function: a modified proteomic approach. *Arch Oral Biol* 2009;54(1):91–100.
- [49] Haigh BJ, Stewart KW, Whelan JR, Barnett MP, Smolenski GA, Wheeler TT. Alterations in the salivary proteome associated with periodontitis. *J Clin Periodontol* 2010;37(3):241–7.
- [50] Nicholas BL, Skipp P, Barton S, et al. Identification of lipocalin and apolipoprotein A1 as biomarkers of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;181(10):1049–60.
- [51] Ngounou Wetie AG, Wormwood KL, Russell S, Ryan JP, Darie CC, Woods AG. A pilot proteomic analysis of salivary biomarkers in autism spectrum disorder. *Autism Res* 2015;8(3):338–50.
- [52] Amado FM, Ferreira RP, Vitorino R. One decade of salivary proteomics: current approaches and outstanding challenges. *Clin Biochem* 2013;46(6):506–17.
- [53] Cho YT, Su H, Huang TL, et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization/time-of-flight mass spectrometry for clinical diagnosis. *Clin Chim Acta* 2013;415:266–75.

APÊNDICE D- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE

A senhora está sendo convidada a participar do projeto: **“Análise do Proteoma Salivar de Pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico, com e sem Nefrite Lúpica.”**

O objetivo desta pesquisa é avaliar e comparar algumas características da saliva, sangue, urina, condição periodontal (gengiva, ossos dos dentes e dentes) e dos tecidos moles da boca (região externa ou interna do lábio, na parte externa das bochechas, língua, assoalho de boca, céu da boca e gengiva) e do hálito de mulheres com lúpus eritematoso sistêmico com nefrite lúpica (problemas nos rins) com as mulheres com lúpus, mas que não possuem nefrite lúpica.

A senhora receberá todos os esclarecimentos necessários antes e no decorrer da pesquisa e lhe asseguramos que seu nome não aparecerá, sendo mantido o mais rigoroso sigilo através da omissão total de quaisquer informações que permitam identificá-la.

A sua participação será através da respostas aos questionários de avaliação da sua saúde, exame odontológico e coleta de sangue e urina em um jejum de 08 (oito) horas, e de saliva sob jejum de 01 (uma) hora. Após as coletas, a participante receberá gratuitamente um lanche. A coleta de saliva se dará por meio de papel absorvente dentro do lábio superior que irá absorver a saliva durante 1 minuto e depois será removida e pesada. Em seguida, este procedimento será repetido para o lábio inferior. Depois será coletada a saliva sem estímulo quando a senhora deverá permanecer sentada, sem conversar, com o celular desligado, com os olhos abertos e com o pescoço inclinado para frente e para baixo para que a saliva escorra em um copo descartável sem a senhora precisar cuspir, durante os 5 minutos. Para a coleta da saliva estimulada, a senhora terá que mastigar um objeto pequeno (1 centímetro) de silicone e cuspir a saliva produzida em um frasco durante 5 minutos.

Somente nos casos em que a paciente possuir nefrite lúpica (comprometimento dos rins) e a equipe médica considerar necessária a realização de biópsia do rim (procedimento onde um pequeno fragmento do rim, de aproximadamente 1 a 2 cm de comprimento com largura de um grão de arroz é obtido) a paciente será submetida à realização deste procedimento em sala cirúrgica do Hospital Universitário da Brasília – HUB. Neste caso, a paciente deverá ficar internada por aproximadamente 24 horas. Com a análise desse fragmento do rim, pode-se verificar o comprometimento renal e estabelecer diagnósticos, prognósticos e indicações para iniciar ou não tratamentos específicos dos rins.

Riscos esperados: A biópsia será feita em ambiente hospitalar e sob efeito de anestesia. Após o procedimento, a paciente deverá ficar internada para permanecer pelo menos 12 horas em repouso absoluto, devido ao risco de sangramento e dor.

Benefícios esperados: Como benefício direto da pesquisa, quando for diagnosticada doença periodontal (inflamação/infecção da gengiva e/ou osso e ligamentos de sustentação dos dentes) secura bucal e halitose (mau hálito), você receberá tratamento gratuito pelas dentistas desta equipe de pesquisa. Caso seja encontrada alguma lesão na região externa ou interna do lábio, na parte interna das bochechas, língua, assoalho de boca, céu da boca e gengiva, as mesmas serão diagnosticadas e tratadas. Além disso, todas as voluntárias receberão orientações sobre prevenção de doenças bucais. Como benefício indireto da

pesquisa, os resultados obtidos poderão permitir que os profissionais de saúde passem a adotar um novo método indolor de diagnóstico e monitoramento do Lúpus Eritematoso Sistêmico.

O local de atendimento clínico será aqui, ou seja, a senhora será atendida no Serviço de Reumatologia / Ambulatório de Colagenose do Hospital Universitário de Brasília (HUB) na data combinada. Caso a senhora não possua problemas de saúde em seus rins e sua avaliação bucal (gengiva, e tecidos moles, como língua e mucosa) não acuse necessidade de tratamento gengival, de mau hálito e nem de boca seca, a senhora precisará vir apenas mais uma vez e permanecer em atendimento durante uma manhã. Caso contrário, a senhora precisará voltar para receber tratamentos específicos e cada sessão de atendimento terá aproximadamente 1 hora de duração. Solicitamos que a senhora compareça no dia, local e horário marcado sob as condições solicitadas pelo responsável do estudo. No caso de falta no horário marcado, o mesmo será remarcado. Contudo, solicitamos se empenhar para não faltar.

Informamos que a senhora pode se recusar a responder (ou participar de qualquer procedimento) qualquer questão que lhe traga constrangimento, podendo desistir de participar da pesquisa em qualquer momento sem nenhum prejuízo no seu atendimento médico junto aos profissionais do Hospital Universitário de Brasília - HUB. Sua participação é voluntária, isto é, não há pagamento por sua colaboração.

Os resultados da pesquisa serão divulgados na Universidade de Brasília, no Hospital Universitário, em reuniões científicas no Brasil e em outros países podendo ser publicados, veiculados no jornal, televisão e rádio posteriormente. Contudo, em nenhum momento seu nome será divulgado, pois garantimos que sua identificação não será divulgada para outras pessoas que não estiverem envolvidas na pesquisa.

Os dados e materiais utilizados na pesquisa, bem como as imagens e sons de voz registrados são de responsabilidade da pesquisadora Dra. Denise Pinheiro Falcão da Rocha. Os mesmos ficarão sob a guarda da pesquisadora por um período de no mínimo cinco anos, após isso serão destruídos ou mantidos na instituição. Se a senhora tiver qualquer dúvida em relação à pesquisa, por favor telefone para: Dra. Denise Pinheiro Falcão da Rocha, no telefone: 9971-2900 em horário comercial.

Informamos que este projeto foi Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. As dúvidas com relação à assinatura do TCLE ou os direitos do sujeito da pesquisa podem ser obtidos através do telefone: (61) 3107-1918 ou do e-mail cepfm@unb.br.

Ao assinar este documento em duas vias e rubricar cada página, a senhora estará também autorizando a utilização da sua imagem e som de voz, na qualidade de participante/entrevistada neste projeto de pesquisa, desde que sejam utilizadas apenas para análise por parte da equipe de pesquisa, apresentações em conferências profissionais e/ou atividades educacionais. Ou seja, a senhora não estará autorizando a divulgação da sua imagem nem o som da sua voz por qualquer meio de comunicação, sejam elas televisão, rádio ou internet, exceto nas atividades vinculadas ao ensino e a pesquisa explicitadas acima.

Assim, a senhora declara que compreendeu todos os itens deste convite e que os mesmos foram falados de forma muito clara e de fácil entendimento.

Portanto, eu _____ (participante) e responsável pela menor (quando a filha for convidada a participar e a mãe aceitar) _____ deixo claro que após a leitura deste documento estou de acordo e aceito o convite de participar deste estudo conforme os dados acima descritos e autorizo a avaliação da minha filha, caso ela concorde em participar do estudo após receber explicações contidas

no Termos de Assentimento. Este documento foi elaborado em duas vias, uma ficará com a pesquisadora responsável pela pesquisa e a outra comigo.

Brasília, ____ de _____ de _____

Assinatura da Participante

Denise Pinheiro Falcão da Rocha
Pesquisadora Responsável e Professora Colaboradora
do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da UnB
Matrícula FUB: 01052080

APÊNDICE E- TERMO DE ASSENTIMENTO



1– Convite

Você está sendo convidada a participar da pesquisa *Análise do Proteoma Salivar de Pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico, com e sem Nefrite Lúpica*. Antes de decidir se quer ou não participar desta pesquisa, vamos explicar para você alguns detalhes, pois é importante você entender porque o estudo está sendo feito e o que ele envolverá. Já conversamos com sua mãe e ela já concordou com sua participação, mas queremos saber se você também concorda. Queremos que você saiba que apesar da sua mãe ter aceitado que você participe da pesquisa, você não é obrigada a participar. Caso você queira trocar algumas ideias sobre este documento com seu pai, amigos ou qualquer outra pessoa da sua confiança, fique bem à vontade. Você pode decidir se quer participar ou não depois de ter conversado sobre a pesquisa e não é preciso decidir agora. Eu vou ler para você o que está escrito aqui, mas sua mãe já leu tudo, esclareceu as dúvidas dela e concordou. Pode haver algumas palavras que você não entenda ou outras coisas que você possa precisar que eu lhe explique melhor. Assim, por favor, pode me pedir para eu explicar com mais detalhes para que você possa realmente entender.

2 – O que é o estudo?

Nós queremos descobrir se algumas proteínas que encontramos no xixi e no sangue estão presentes também na saliva. Assim, nós vamos precisar que você dê umas cuspidinhas num copinho. Depois nós vamos examinar sua boquinha para ver como está a saúde dos seus dentes, da gengiva, da língua e da parte de dentro da sua bochecha. Este exame é bem simples não terá nenhuma picadinha, ou seja, não vai doer nada.

3 – O que este estudo quer descobrir? Ou seja, qual é o objetivo do estudo?

O estudo quer conhecer as proteínas da saliva de crianças e adolescentes que tenham uma doença chamada lúpus eritematoso sistêmico. Esta doença faz com que algumas partes do corpo não funcionem direito.

4 – Por que você foi escolhido(a)?

Porque talvez na sua saliva possam ter informações importantes sobre o lúpus.

5 – Você tem que participar da pesquisa?

Não. Você não é obrigada a participar. Queremos que você saiba que ninguém ficará chateado ou bravo

com você, caso não queira participar, e que e isso não afetará os cuidados que você recebe no hospital e nem prejudicará o tratamento da sua mamãe. Você é quem decide.

6 – O que acontecerá com você se participar?

Se decidir participar, você receberá esta folha de informações para guardar e deverá assinar um termo de assentimento, que é um documento que afirma que você entendeu nossas explicações e irá ser examinada pela nossa equipe e fornecerá um pouquinho da sua saliva.

7 – O que é exigido nesse estudo, além da prática de rotina?

Nada.

8 – O que você tem que fazer?

Para a coleta da saliva você terá que ficar somente 1 hora sem comer.

9 – Quais são as alternativas de diagnóstico ou tratamento?

Atualmente para se descobrir se uma pessoa tem ou não tem o lúpus, os médicos pedem inicialmente exame de sangue e urina.

10 – Quais são os efeitos adversos (que não são esperados) ao participar do estudo?

Nenhum.

11 – Quais são os possíveis benefícios de participar?

Caso seu exame saliva apresente alterações, você já poderá receber logo um tratamento médico, antes mesmo de você perceber que está doente.

12 – E se novas informações ficarem disponíveis?

A sua participação será importante para ajudar a descobrir se só o exame de saliva poderá ser usado para diagnosticar o lúpus. Se ficar provado que a saliva consegue mostrar que a doença existe, não será mais necessário a pessoa ficar levando picadinhas de agulha para tirar sangue para saber se tem ou não tem a doença.

13 – O que acontece quando o estudo termina?

Todas as informações e exames que coletamos de você ficarão nas suas fichas de atendimento e você será avaliada a cada ano para que possamos acompanhar sua saúde.

14 – A sua participação neste estudo será mantida em sigilo?

Nós não iremos ficar mostrando seu nome para outras pessoas que não estão participando da pesquisa

15 – O que acontecerá com os resultados do estudo clínico?

Os resultados são apresentados em congresso de saúde e publicados em revistas científicas para que muitos profissionais de saúde possam saber que a doença pode ser ou não pode ser descoberta com o exame de saliva.

16 – Quem revisou o estudo?

Este estudo foi revisado pelo seguinte Comitê de Ética em Pesquisa, formado por um grupo de pessoas que se reúne para avaliar os projetos e garantir que a pesquisa que estamos fazendo e convidando você para participar não traz nenhum dano aos participantes.

Nome: Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Endereço: Campus Universitário Darcy Ribeiro (CEP da Faculdade de Ciências da Saúde)

Cep: 70910-900- Brasília- DF- Brasil

Tel: +55 (61) 3107-1947

Horário de Funcionamento: 2ª a 6ª feira de 10 às 12 horas e de 14 às 17 horas.

17 – Contato para informações adicionais

Se você precisar de mais informações sobre a participação no estudo, sobre os seus direitos ou qualquer outra dúvida, ligue para a pesquisadora responsável: Dra. Denise Pinheiro Falcão da Rocha, no telefone: (61) 9971-2900.

Obrigado por ler e ouvir atentamente estas informações. Se quiser participar deste estudo, assine este Termo e devolva-o à pesquisadora do estudo. Por favor, guarde com você uma cópia destas informações.

Termo de Assentimento

Título do projeto *Análise do Proteoma Salivar de Pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico, com e sem Nefrite Lúpica*

Nome da pesquisadora responsável: Dra. Denise Pinheiro Falcão da Rocha

• Nome dos pais/responsáveis legais: _____

Assinatura: _____

Data: ____/____/____

• Nome da criança/adolescente : _____

Assinatura: _____

Data: ____/____/____

• Nome da pesquisadora que obteve o consentimento _____

Assinatura: _____

Data: ____/____/____

APÊNDICE F- FICHA CLÍNICA



Data: ____/____/____ Nº. Criotubo: _____

Nome: _____

Telefones: (____) _____ / (____) _____ / (____) _____

Data de Nascimento: _____ Idade: _____ Sexo: _____

Cor declarada: **0-** Não informou; **1-**Branca; **2-** Preta; **3-** Parda; **4-** Amarela; **5-**Vermelha

Nome da mãe: _____ Nº prontuário da mãe: _____

Grupos: **1-** Sem doenças autoimunes

2- Filhos de mulheres com LES

3- Lupus Eritematoso Sistêmico Juvenil

4- Artrite Idiopática Juvenil

5- Outra doença: _____

Ano do início dos sintomas: _____ Tempo de diagnóstico (meses): _____

Condição do LES :

1- LES em fase inativa e ausência de histórico de NL

2- LES em fase ativa e ausência de histórico de NL

3- LES e NL em fase inativa

4- LES em fase inativa e com NL em fase ativa

5- LES e NL em fase ativa

6- LES em fase ativa NL em fase inativa

Medicamentos: 0 - Não 1- Sim

NOME	mg	ADMINISTRAÇÃO	FINALIDADE (DOENÇAS)
() Adalimumabe			
() Arava			Artrite
() Atorvastatina			Redução do colesterol.
() Azatioprina			Imunossupressor.
() Ácido Fólico			Vitamina B9.
() Cálcio			Construção e manutenção dos ossos.
() Ciclobenzaprina			Espasmos musculares associados à dor aguda e fibromialgia.
() Ciclofosfamida			Doenças autoimunes e câncer.
() Clonazepam			Ansiedade – Rivotril.
() Cloroquina			Malária.
() Dapsona			Hanseníase e dermatite herpetiforme.
() Enalapril			Hipertensão arterial e

			insuficiência cardíaca congestiva.
<input type="checkbox"/> Etanercept			
<input type="checkbox"/> Furozemida			Gastrite e pacientes refratários a outros tratamentos.
<input type="checkbox"/> Infliximabe			
<input type="checkbox"/> Leflunomida			
<input type="checkbox"/> Losartana			Hipertensão arterial
<input type="checkbox"/> Hidroxicloroquina			Malária e artrite reumatoide.
<input type="checkbox"/> Metotrexato			Artrite reumatoide grave.
<input type="checkbox"/> Micofenolato			Imunossupressor.
<input type="checkbox"/> Omeprazol (Losec)			Fibromialgia.
<input type="checkbox"/> Prednisona			Corticoide.
<input type="checkbox"/> Rituximab			Artrite reumatoide.
<input type="checkbox"/> Sulfato Ferroso			Anemia ferropriva.
<input type="checkbox"/> Tocilizumab			Artrite reumatoide.
<input type="checkbox"/> Vitamina B12			
<input type="checkbox"/> Vitamina D			

Outras Doenças sistêmicas (assinalar os domínios abaixo e especificar a doença):

Circulação sanguínea; Coração; Diabetes; Estômago; Fígado; Intestino; Pulmão; Tireoide;

Frequência cardíaca: _____ bpm; Pressão arterial: ___ ___ x ___ ___ mmHg; Peso: _____ Altura: _____

DEFINIÇÃO DOS ESCORES DO SLICC/ACR-DI^(16, 17)

ESCORE	DEFINIÇÃO
	Ocular
1	Catarata em qualquer olho, primária ou secundária à corticoterapia, documentada por oftalmoscopia.
1	Alteração retinal documentada por oftalmoscopia ou
1	Atrofia óptica documentada por exame oftalmoscópico.
	Neuropsiquiátrico
1	Disfunção cognitiva (por exemplo, prejuízo de memória, dificuldade de cálculo, prejuízo da concentração, dificuldade de linguagem falada ou escrita) documentada por exame clínico ou teste neurocognitivo ou
1	Psicose maior definida por distúrbios graves da percepção da realidade caracterizados por delírios, alucinações auditivas ou visuais, incoerência, perda de associação de idéias, empobrecimento de idéias, pensamento ilógico, comportamento bizarro, desorganizado ou catatônico.
1	Convulsões caracterizadas por movimentos tônicos e clônicos, requerendo terapia anticonvulsivante por mais de seis meses.
1 (2)	Acidente vascular cerebral que resulte em achados focais como paresia e fraqueza ou ressecção cirúrgica por outras causas, exceto malignidade (escore 2 se mais de um evento).
1	Neuropatia craniana ou periférica, excluindo-se neuropatia óptica, resultando em distúrbio motor ou sensitivo.
1	Mielite transversa (fraqueza de membros inferiores ou perda sensitiva com perda do controle esfinteriano retal e urinário).
	Renal
1	Taxa de filtração glomerular < 50%,
1	Proteinúria ≥ 3,5 g/24 horas ou
3	Insuficiência renal terminal (mesmo em diálise ou transplante).
	Pulmonar
1	Hipertensão pulmonar (proeminência de ventrículo direito ou ausculta em foco pulmonar).
1	Fibrose pulmonar (exame físico e radiografia).
1	<i>Shrinking lung syndrome</i> (radiografia).
1	Fibrose pleural (radiografia).
1	Infarto pulmonar (radiografia), ressecção por outra causa que não malignidade.
	Cardiovascular
1	Angina <i>pectoris</i> ou angioplastia.
1 (2)	Infarto agudo do miocárdio documentado por eletrocardiograma e perfil enzimático (escore 2 se mais de um evento).
1	Miocardiopatia (disfunção ventricular documentada clinicamente).
1	Doença valvular (murmúrio diastólico ou sistólico > 3/6).
1	Pericardite por seis meses ou pericardiectomia.
	Vascular periférico
1	Claudicação persistente por seis meses.
1	Perda tecidual menor (perda de polpa tecidual).
1 (2)	Perda tecidual significativa (por exemplo, perda digital ou de membro) (escore 2 se mais de um sítio).
1	Trombose venosa com edema, ulceração ou evidência clínica de estase venosa.
	Gastrointestinal
1 (2)	Infarto ou ressecção intestinal abaixo do duodeno, baço, fígado ou vesícula biliar por qualquer causa (escore 2 se mais de um sítio).
1	Insuficiência mesentérica com dor abdominal difusa ao exame clínico.
1	Peritonite crônica com dor abdominal persistente e irritação peritoneal.
1	Constricção esofágica observada por endoscopia ou cirurgia de trato gastrointestinal superior como correção da constrição, cirurgia de úlcera, etc., ou por história de insuficiência pancreática requerendo reposição enzimática ou por pseudocisto.
	Musculoesquelético
1	Atrofia muscular ou fraqueza muscular, demonstradas pelo exame físico.
1	Artrite deformante ou erosiva (incluindo-se deformidades redutíveis e excluindo-se osteonecrose) no exame físico.
1	Osteoporose com fratura ou colapso vertebral (excluindo-se osteonecrose) demonstrada radiograficamente.
1 (2)	Osteonecrose demonstrada por qualquer técnica de imagem (escore 2 se mais de um evento).
1	Osteomielite documentada clinicamente e confirmada por cultura ou ruptura tendínea.
	Dermatológico
1	Alopecia cicatricial crônica documentada clinicamente.
1	Cicatriz extensa ou paniculite em localização diferente do couro cabeludo ou polpa tecidual, documentada clinicamente.
1	Ulceração cutânea (excluindo-se trombose) por mais de seis meses.
	Falência Gonadal Prematura
1	Amenorréia secundária antes dos 40 anos de idade.
	Diabetes
1	Requerendo tratamento e independente deste.
	Malignidade
1 (2)	Documentada por exame patológico, excluindo displasia (escore 2 se mais de um sítio).

OBSERVAÇÃO - Considera-se dano a alteração não reversível e não relacionada com a inflamação ativa ocorrida desde o início do LES. A avaliação é feita por médico e a alteração deve estar presente por pelo menos seis meses. Episódios repetidos devem ocorrer em intervalo de pelo menos seis meses para obterem escore 2. A mesma lesão não pode ser considerada duas vezes. O dano global do SLICC/ACR-DI descreve o escore total resultante do próprio LES ou de qualquer outro processo patológico como aterosclerose, hipercoagulabilidade, HAS, terapêutica do LES e outras co-morbidades.

SLEDAI:**Índice de Atividade de Doença do LES (SLEDAI-2K)**

Manifestações clínicas	Descrições de sinais e sintomas	Pts
Convulsão	Início recente, excluídas causas metabólicas infecciosas e secundárias ao uso de drogas	8
Psicose	Distúrbio severo da percepção da realidade, excluídas causas metabólicas e drogas. Inclui alucinações, incoerência, perda marcada das associações de ideias, pensamento pobre, ilógico; comportamento bizarro, desorganizado ou catatônico.	8
Delirium (síndrome cerebral orgânica)	Alteração abrupta e flutuante das funções mentais, atingindo a orientação, a atenção, a memória e outras funções intelectuais. Inclui a redução da vigília, com diminuição da atenção, acompanhada de pelo menos dois sintomas descritos a seguir – perturbação da percepção, discurso incoerente, insônia ou hipersonia diurna, aumento ou redução da atividade psicomotora. Exclui causas metabólicas, infecciosas ou secundárias ao uso de drogas.	8
Distúrbios visuais	Alteração da retina caracterizada por corpos cistoídes, hemorragias retinianas, exsudatos serosos ou hemorragias do plexo coroide ou neurite óptica. Excluir HTA, infecções e drogas.	8
Comprometimento de pares cranianos	Neuropatia sensorial ou motora, de início ou reinício recente.	8
Cefaleia lúpica	Severa e persistente, do tipo enxaqueca que não responde a analgésicos convencionais.	8
Acidente vascular encefálico	Presença de AVE. Excluir causa aterosclerótica.	8
Vasculite	Úlcerações, gangrenas, infartos periungueais, nódulos digitais dolorosos, áreas hemorrágicas subungueais, biópsia ou angiografia de qualquer área do corpo apresentando vasculite	8
Artrites	Envolvimento de duas ou mais articulações com sinais e sintomas de inflamação (palpação dolorosa, tumefação ou derrame articular)	4
Miosites	Dor ou fraqueza muscular proximal acompanhada de aumento de CPK/aldolase, eletromiografia alterada, biópsia compatível com miosite	4
Cilindros urinários	Hemáticos, granulosos ou eritrocitários	4
Hematuria	Mais de 5 eritrócitos/campo. Excluir outras causas tais como litíase renal, infecções.	4
Proteinúria	Concentração > a 0,5 g/24 horas	4
Piúria	Mais de 5 leucócitos/campo na ausência de infecção	4
Rash cutâneo	Início recente ou recorrente, caráter inflamatório	2
Alopecia	Início recente ou recorrente, excessiva, difusa ou localizada	2
Úlceras de mucosa	Início recente ou recorrente, nasais ou orais	2
Pleurisia	Dor pleurítica com atrito, derrame ou espessamento pleural	2
Pericardite	Dor no peito, com atrito ou derrame pericárdico, confirmado por ECG ou Ecocardiograma	2
Complemento baixo	CH50; C3 ou C4 abaixo dos valores de referência	2
Anti-DNAs	Acima dos valores de referência do laboratório	2
Febre	Temperatura axilar >38°, na ausência de processo infeccioso	1
Trombocitopenia	Concentração de plaquetas inferior a 100 000/mm ³ (excluídas causas farmacológicas)	1
Leucopenia	Concentração de leucócitos inferior a 3 000/mm ³ , excluídas causas farmacológicas	1

- Avaliação**

SLEDAI:

EXAME ODONTOLÓGICO (AO IDENTIFICAR UMA ALTERAÇÃO TECIDUAL, FAVOR FOTOGRAFAR)

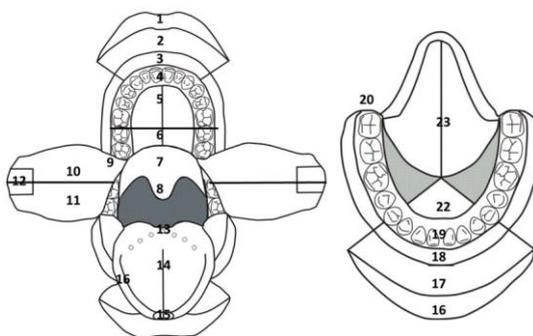
SECURA BUCAL: () NÃO () SIM: contínua – intermitente – esporádica;

() acorda à noite para tomar água e urinar _____ vezes/noite

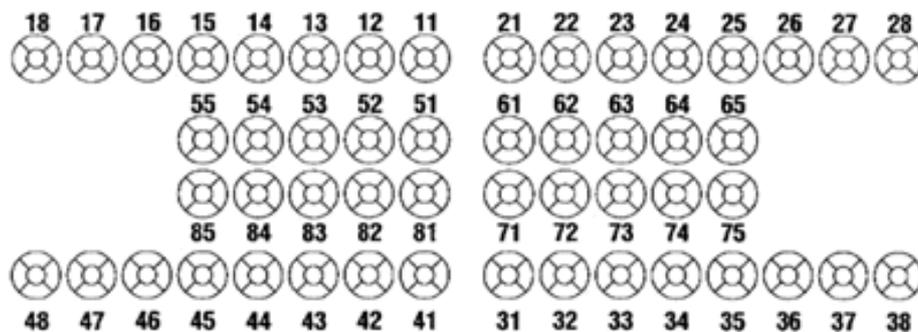
PESO DO FLUXO DA SALIVA SEM ESTÍMULO EM 5 MINUTOS: _____

PRESENÇA DE LESÃO EM TECIDO MOLE: () NÃO () SIM

LOCALIZAÇÃO ANATÔMICA DE LESÕES:



Observações: _____



Legenda:

Extração indicada: X
 Lesão de cárie: vermelho- pintar
 Fístula: FIS
 Selante: verde- pintar
 Hipocalcificação: Hipoc
 Dente perdido: círculo

Restaurado: azul- pintar
 Fraturado: Fr
 Hipoplasia: Hipop
 Fluorose: Fl

CPOD _____

ANEXO A- EXAMES LABORATORIAIS PARA DIAGNÓSTICO INICIAL DE LES**Quadro 1- Exames Laboratoriais (1)**

Hemograma completo

Perfil metabólico abrangente

Urina de 24 horas para a proteína e creatinina

Exame de urina

Taxa de sedimentação de eritrócitos

Proteína C-reativa

Anticorpo antinuclear

Anti-DNA nativo (dupla-hélice) e Anti-DNA desnaturado (hélice simples) -

Anticorpo Anti-Sm e anti-RNP

Anticorpo anti-SSA / Ro

Anticorpo Anti-SSB / La

Anticorpos anticardiolipina (IgG, IgM, IgA)

Anticorpos anti-beta-2 glicoproteína I

Tempo de protrombina / INR

Tempo de tromboplastina parcial

Anticoagulante lúpico

C3, C4, CH50

Estudos de tireoide

Perfil de lipídios em jejum

Homocisteína

Fibrinogênio

Teste de Coombs

ANEXO B- CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO DO LES- ACR 1997

Quadro 2- Critérios de classificação de LES do *American College of Rheumatology* revisados em 1997 (38, 43)

1. Eritema malar: lesão eritematosa fixa em região malar, plana ou em relevo.

2. Lesão discoide: lesão eritematosa, infiltrada, com escamas queratóticas aderidas e tampões foliculares, que evolui com cicatriz atrófica e discromia.

3. Fotossensibilidade: exantema cutâneo como reação não-usual à exposição à luz solar, de acordo com a história do paciente ou observado pelo médico.

4. Úlceras orais/nasais: úlceras orais ou nasofaríngeas, usualmente indolores, observadas pelo médico.

5. Artrite: não-erosiva envolvendo duas ou mais articulações periféricas, caracterizadas por dor e edema ou derrame articular.

6. Serosite: pleuris (caracterizada por história convincente de dor pleurítica, atrito auscultado pelo médico ou evidência de derrame pleural) ou pericardite (documentado por eletrocardiograma, atrito ou evidência de derrame pericárdico).

7. Comprometimento renal: proteinúria persistente (> 0,5 g/dia ou 3+) ou cilindrúria anormal.

8. Alterações neurológicas: convulsão (na ausência de outra causa) ou psicose (na ausência de outra causa).

9. Alterações hematológicas: anemia hemolítica ou leucopenia (menor que $4.000/\text{mm}^3$ em duas ou mais ocasiões) ou linfopenia (menor que $1.500/\text{mm}^3$ em duas ou mais ocasiões) ou plaquetopenia (menor que $100.000/\text{mm}^3$ na ausência de outra causa).

10. Alterações imunológicas: anticorpo anti-DNA nativo ou anti-Sm ou presença de anticorpo antifosfolípide com base em:

- a) níveis anormais de IgG ou IgM anticardiolipina;
- b) teste positivo para anticoagulante lúpico; ou
- c) teste falso-positivo para sífilis, por, no mínimo, seis meses.

11. Anticorpos antinucleares: título anormal de anticorpo antinuclear por imunofluorescência indireta ou método equivalente, em qualquer época, e na ausência de drogas conhecidas por estarem associadas à síndrome do lúpus induzido por drogas.

ANEXO C- CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO DO LES- SLICC 2012

Quadro 3- Critérios do *Systemic Lupus International Collaborating Clinics* (SLICC) para classificação do Lúpus Eritematoso Sistêmico, 2012 (42)

Manifestação Clínica
<ol style="list-style-type: none"> 1. Lúpus cutâneo agudo, incluindo: eritema malar (não discoide), lúpus bolhoso, necrólise epidérmica tóxica - variante lúpus, eritema maculopapular, eritema fotossensível do lúpus ou lúpus cutâneo subagudo (psoriasiforme/anular) 2. Lúpus cutâneo crônico: lúpus discoide, lúpus hipertrófico/verrucoso, /upus profundus (paniculite), lúpus tímido, lúpus mucoso, sobreposição líquen plano/lúpus discoide 3. Úlcera mucosa: palato, cavidade oral, língua ou úlcera nasal (na ausência de outras causas) 4. Alopecia não cicatricial 5. Artrite/ Artralgia Sinovite (edema/derrame articular) > 2 articulações Artralgia (dor) em 2 ou + articulações com rigidez matinal > 30 min 6. Serosite Pleurite (dor > 1 dia/derrame pleural/atrito pleural) Pericardite (dor > 1 dia/derrame/atrito/alteração ECG) 7. Nefrite: proteinúria 24h > 500mg ou relação pro/creat > 500 mcg/mg (mg/g), cilindro eritrocitário 8. Neurológica: convulsão, psicose, mononeurite múltipla, mielite, neuropatia periférica/craniana, estado confusional agudo (na ausência de outras causas) 9. Anemia hemolítica 10. Leucopenia (< 4.000/mm³, em pelo menos uma ocasião) ou linfopenia (< 1000/mm³, em pelo menos uma ocasião) 11. Plaquetopenia (< 100000/mm³, em pelo menos uma ocasião)
Alteração Imunológica
<ol style="list-style-type: none"> 1. FAN Hep2 positivo 2. Anti-DNA positivo 3. Anti-Sm positivo 4. Anticorpo antifosfolípide positivo: anticoagulante lúpico positivo, anticardiolipina positivo (título moderado/alto - IgA/IgM/IgG), VDRL falso-positiva, anti- α²glicoproteína 1 positivo 5. Complemento baixo: C3, C4, CH50 6. Coombs direto positivo (na ausência de anemia hemolítica)
<p>O paciente deverá preencher pelo menos 4 critérios (incluindo 1 clínico e 1 imunológico) OU ter nefrite lúpica comprovada por biópsia renal com presença de FAN positivo ou anti-DNA positivo.</p>

ECG: eletrocardiograma; Ig : imunoglobulina; VDRL: pesquisa laboratorial de sífilis.

ANEXO D- CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO DA AIJ

Quadro 4- Classificação da ILAR (60), critérios de inclusão e exclusão, características da AIJ					
Classificação	Critério de inclusão	Critério de exclusão*	Frequência (%)	Idade de início	Distribuição por sexo
Artrite Sistêmica	- Número de articulações afetadas: variável. - Características sistêmicas: febre de no mínimo 2 semanas de duração, sendo diária em pelo menos 3 dias e acompanhada por um ou mais dos seguintes sintomas: exantema evanescente, Linfadenopatia generalizada, alargamento do fígado ou baço ou serosite.	a, b, c, d	4-17	Toda a infância	F=M
Artrite poliarticular com FR negativo	- Número de articulações afetadas: ≥ 5 - Teste sorológico: FR IgM ausente	a, b, c, d, e	11-28	Bifásico: 2- 4 anos e 6- 12 anos	Duas vezes maior em F do que em M
Artrite poliarticular com FR positivo	- Número de articulações afetadas: ≥ 5 - Teste sorológico: FR IgM em pelo menos 2 ocasiões com no mínimo 3 meses de intervalo	a, b, c, e	2-7	Pré-adolescência e adolescência	Duas vezes maior em F do que em M
Artrite Oligoarticular	- Número de articulações afetadas: persistentes: < 4; estendido: ≥ 4 articulações após os primeiros 6 meses	a, b, c, d, e	27- 56	Pico entre 2 e 4 anos	Três vezes maior em F do que em M
Artrite relacionada à entesite	- Número de articulações afetadas: variável, geralmente ≤ 4 - Outros diagnósticos: entesite	a, d, e	3-11	Pré-adolescência e adolescência	Duas vezes maior em F do que em M Duas vezes maior em F do que em M
Artrite psoriásica	- Número de articulações afetadas: variável, geralmente ≤ 4 - Outros diagnósticos: erupções cutâneas psoriática, história familiar de psoríase em parente de 1º grau, dactilite, onocólise ou <i>nail pitting</i>	b, c, d, e	2- 11	Bifásico: 2- 4 anos e 9- 11 anos	F > M
Artrite Indiferenciada	- Os pacientes que não satisfazem os critérios de inclusão para qualquer outra categoria ou se encaixam em 2 ou mais categorias acima	N/A	11- 21	N/A	Não há conhecimento sobre predileção em relação ao sexo
* EXCLUSÕES:					
a. Psoríase ou história de psoríase no paciente ou em parente de primeiro grau b. Artrite em menino HLA-B27 iniciada após os 6 anos de idade Espondilite anquilosante, artrite relacionada à entesite, sacroileíte com doença inflamatória intestinal, síndrome de Reiter, uveíte anterior aguda ou história de alguma dessas doenças em parente de primeiro grau d. Presença de fator reumatoide IgM em pelo menos duas ocasiões com no mínimo 3 meses de intervalo e. Presença de artrite sistêmica					
F= feminino, M= masculino, N/A= não aplicável.					

Adaptado de Barr (61), Lotito (52) e Ravelli & Martini (67)

ANEXO E- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA- PLATAFORMA BRASIL

UNB - FACULDADE DE
MEDICINA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Análise do Proteoma Salivar de Pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico, com e sem Nefrite Lúpica

Pesquisador: Denise Pinheiro Falcão da Rocha

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 25085114.6.0000.5558

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília - UNB

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.708.406

Apresentação do Projeto:

Trata-se de pedido emenda de projeto aprovado por este CEP que consiste em inclusão de um novo membro na equipe e a inclusão de mais um local para a inclusão de pacientes. A emenda é apresentada pela pesquisadora responsável.

Objetivo da Pesquisa:

Sem modificações.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Sem alterações

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A emenda não implica em modificação da relação risco-benefício da pesquisa e conta com a autorização da nova instituição onde será praticada a inclusão de pacientes. O novo membro da equipe proposto tem qualificação adequada para participar da pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Completos.

Recomendações:

Nenhuma.

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina
 Bairro: Asa Norte CEP: 70910-900
 UF: DF Município: BRASÍLIA
 Telefone: (61)3107-1918 E-mail: fmd@unb.br

(continuação)

UNB - FACULDADE DE
MEDICINA

Continuação do Parecer: 1.708.406

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pesquisa adequada em termos éticos e científicos para execução de acordo com a regulamentação vigente.

Considerações Finais a critério do CEP:

Emenda de Projeto apreciado na Reunião Ordinária do CEP-FM-UnB. Após apresentação do parecer do Relator(a), aberta a discussão para os membros do Colegiado, foi Aprovada por unanimidade.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_740792 E1.pdf	15/06/2016 15:08:51		Aceito
Outros	Curriculo_AlineIstabao.pdf	15/06/2016 15:07:28	Denise Pinheiro Falcão da Rocha	Aceito
Outros	TermoConcordancia.pdf	15/06/2016 15:07:05	Denise Pinheiro Falcão da Rocha	Aceito
Outros	TERMO DE ASSENTIMENTO.pdf	16/07/2014 19:13:52		Aceito
Outros	TCLE_pais.pdf	16/07/2014 19:13:14		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	16/07/2014 19:11:43		Aceito
Outros	Carta_resposta_pendências.pdf	16/07/2014 19:10:59		Aceito
Outros	Lattes_Aline Lauria.pdf	20/03/2014 21:23:42		Aceito
Outros	Lattes_Licia_Mota.pdf	20/03/2014 21:22:22		Aceito
Outros	Lattes_Denise_Falcão.pdf	20/03/2014 21:21:30		Aceito
Outros	Termo de concordância_Diretor HUB Orientadora Pesquisadora.pdf	07/03/2014 18:31:49		Aceito
Outros	Termo de ciência_Diretor_HUB.pdf	07/03/2014 18:31:07		Aceito
Outros	Apoio técnico análise proteomica_Dr. Luciano.pdf	07/03/2014 18:30:17		Aceito
Outros	Anuência_Ambulatório Reumato_HUB.pdf	07/03/2014 18:29:21		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	PROJETO_Análise do Proteoma Salivar.doc	07/03/2014 18:28:12		Aceito

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina
 Bairro: Asa Norte CEP: 70.910-900
 UF: DF Município: BRASÍLIA
 Telefone: (61)3107-1918 E-mail: fmd@unb.br

(continuação)

UNB - FACULDADE DE
MEDICINA

Continuação do Parecer: 1.708.406

Investigador	PROJETO_Análise do Proteoma Salivar.doc	07/03/2014 18:28:12		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLERECIDO (APÊNDICE A).pdf	07/03/2014 18:27:33		Aceito
Folha de Rosto	Folha de rosto_FM.pdf	07/03/2014 18:26:41		Aceito
Outros	FICHA DE REGISTRO DE LESÕES BUCAIS (ANEXO 4).pdf	11/02/2014 23:45:54		Aceito
Outros	QUESTIONÁRIO VALIDADO PARA AVALIAÇÃO DO HÁLITO (ANEXO 3).pdf	11/02/2014 23:45:15		Aceito
Outros	Questionário (Escala Visual Análoga - VAS)(ANEXO 2).pdf	11/02/2014 23:43:00		Aceito
Outros	PRONTUÁRIOS DE AVALIAÇÃO DE PORTADORES DE LES_NL (ANEXO 1).pdf	11/02/2014 23:36:47		Aceito
Outros	ORIENTAÇÕES PRÉVIAS ÀS COLETAS (APÊNDICE C).pdf	11/02/2014 23:35:34		Aceito
Outros	TERMO DE ASSENTIMENTO (APÊNDICE B).pdf	11/02/2014 23:34:32		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BRASILIA, 01 de Setembro de 2016

Assinado por:
Florêncio Figueiredo Cavalcanti Neto
 (Coordenador)

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina
 Bairro: Asa Norte CEP: 70.910-900
 UF: DF Município: BRASÍLIA
 Telefone: (61)3107-1918 E-mail: fmd@unb.br