

Trabalho Académico de Investigação

Papel das células T reguladoras e dos autoanticorpos séricos na fisiopatologia da Síndrome de SJÖGREN

Área de Investigação: Doenças Autoimunes

Curso de Mestrado Integrado em Medicina
ICBAS/UP – HSA/CHP

Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica (DIIC)
Responsável: Prof. Doutora Margarida Lima

Aluna: **CARLA CÂNDIDA COSTA**

Orientador: Prof. Doutor Carlos Vasconcelos
Co-Orientador: Prof. Doutora Berta Martins

Ano Lectivo: 2008 / 2009

ÍNDICE:

FOLHA DE ROSTO DO ESTUDO DE INVESTIGAÇÃO	1
TÍTULO	2
INSTITUIÇÕES, DEPARTAMENTOS E SERVIÇOS INTERVENIENTES	2
EQUIPA DE INVESTIGAÇÃO	2
Constituição	2
Aluna	2
Orientadores	2
Supervisores	2
Outros investigadores	3
Técnicos de Investigação	3
Funções e responsabilidades	3
Tempo afecto ao projecto	3
DESENHO DO ESTUDO	4
CALENDARIZAÇÃO	4
Duração	4
Datas de Início e Conclusão	4
Cronograma de Execução	4
A. PLANO CIENTÍFICO	5
1. INTRODUÇÃO	5
2. ENQUADRAMENTO E MOTIVAÇÕES	6
3. OBJECTIVOS	7
3.1. Geral	7
3.2. Específicos	7
4. DESENHO DO ESTUDO E METODOLOGIA	7
4.1. Tipo de estudo	7
4.2. Participantes e elegibilidade	7
5. PROCEDIMENTOS	9
5.1. Selecção dos participantes	9
5.2. Procedimento na Consulta	10
5.3. Colheita das amostras de sangue	11
5.4. Realização das análises	12
5.5. Tratamento de dados e análise estatística	14
6. RESULTADOS ESPERADOS	14
7. INDICADORES DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA	14
8. BIBLIOGRAFIA	14
B. QUESTÕES ÉTICAS	16
INFORMAÇÃO AO DOENTE PARTICIPANTE NO ESTUDO	17
TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO	17
C. PLANO FINANCEIRO	18
1. ORÇAMENTO	18
1.1. HSA / CHP	18
1.2. ICBAS/UP	20
1.3. OUTROS	20
2. FINANCIAMENTO	21
PEDIDOS DE AUTORIZAÇÃO INSTITUCIONAL	22

HSA/CHP	22
ICBAS/UP	23
PEDIDO DE FINANCIAMENTO	23
BOLSA DE INICIAÇÃO À INVESTIGAÇÃO CLÍNICA.....	23
TERMOS DE RESPONSABILIDADE	24
INVESTIGADOR RESPONSÁVEL.....	24
DECLARAÇÕES.....	25
ALUNO	25
ORIENTADORES / SUPERVISORES	25
TERMOS DE AUTORIZAÇÃO LOCAL.....	26
Serviços e Unidades	26
Departamentos	26



FOLHA DE ROSTO DO ESTUDO DE INVESTIGAÇÃO

PAPEL DAS CÉLULAS T REGULADORAS E DOS AUTOANTICORPOS SÉRICOS NA FISIOPATOLOGIA DA SÍNDROME DE SJÖGREN

INVESTIGADORES

Aluno

Carla Cândida Alves Graça Ribeiro Costa

Aluna do Curso de Mestrado Integrado em Medicina do ICBAS/UP.

E-mail: alvescarla77@hotmail.com

TM: 936 23 95 05

Orientador

Carlos Vasconcelos

Professor Associado Convidado ICBAS/UP, Médico, Especialista de Medicina Interna, Chefe de Serviço, Unidade de Imunologia Clínica, HSA/CHP.

E-mail: carlosvasconcelos@tvtpet.pt

TM: 93 640 38 37

Co-Orientador

Berta Martins

Professora Associada e Investigadora do ICBAS/UP, Departamento de Patologia e Imunologia Molecular, ICBAS/UP.

E-mail: bertams@icbas.up.pt

Supervisor / Responsável pela Disciplina

Margarida Lima

Médica, Especialista de Imunohemoterapia, Assistente Hospitalar Graduada, Serviço de Hematologia Clínica, HSA/CHP; Directora do DEFI do CHP; Professora Responsável pela Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica.

E-mail: mmc.lima@clix.pt

TM: 966 327 115

Outros Investigadores

Esmeralda Neves

Médica, Especialista de Patologia Clínica / Imunologia, Assistente Hospitalar Graduada, Serviço de Imunologia, HSA/CHP.

Técnicos de Investigação

Marlene Santos

Técnica de Diagnóstico e Terapêutica, Serviço de Hematologia Clínica, HSA/CHP.

SERVIÇOS DO CHP ONDE O ESTUDO VAI SER REALIZADO

Serviço de Hematologia Clínica, HSA/CHP.

Serviço de Imunologia, HSA/CHP.

INSTITUIÇÕES INTERVENIENTES, ALÉM DO CHP

ICBAS/UP

DATA LIMITE: Início em Setembro de 2008

VERSÃO do estudo

Novo X

CLASSIFICAÇÃO do estudo

Trabalho Académico de Investigação (Mestrado Integrado) X

DESENHO do estudo

Quanto ao alvo da experimentação

Humanos X

Quanto aos Países / Instituições envolvidas

Nacional X Institucional X

Quanto às características do estudo

Prospectivo X Transversal X

Observacional X Analítico X

Quanto à natureza do estudo

Clínico X Laboratorial X

Quanto à existência de grupo controlo

Controlado X

Quanto à selecção dos indivíduos

Não aleatório X

Quanto ao conhecimento

Aberto (não cego) X

Quanto à fase do estudo (se EC)

Não aplicável X

Outros aspectos

Saída amostras p/ instit. privadas Não

Consentimento informado escrito Sim

Realização de estudos genéticos Não

Realização de inquéritos Não

Recolha de dados clínicos Sim

DATAS previstas

Início: Setembro de 2008.

Conclusão: Junho de 2009.

INDICADORES de avaliação

Artigo de revisão. Relatório final.

Organização do Congresso de Iniciação à Investigação Clínica.

Apresentação do trabalho no Congresso a organizar pelos alunos da DIIC e em Congresso da Especialidade.

ORÇAMENTO do estudo

Total: 4620,00 Euros HGSA: 4320,00

Euros ICBAS: 0,00 Euros Outros: 300,00

Euros

FINANCIAMENTO do estudo

Interno: Não

Externo: Bolsa de Iniciação à Investigação Clínica / Roche Farmacêutica

TÍTULO

PAPEL DAS CÉLULAS T REGULADORAS E DOS AUTOANTICORPOS SÉRICOS NA FISIOPATOLOGIA DA SÍNDROME DE SJÖGREN

INSTITUIÇÕES, DEPARTAMENTOS E SERVIÇOS

INTERVENIENTES

Centro Hospitalar do Porto (CHP), Hospital de Santo António (HSA) (HSA/CHP)

- Departamento de Medicina, Unidade de Imunologia Clínica
- Departamento de Medicina, Serviço de Hematologia Clínica
- Departamento de Patologia Laboratorial, Serviço de Imunologia
- Departamento de Ensino, Formação e Investigação (DEFI), Ensino Médico Pré-Graduado, Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica (DIIC)

Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto (ICBAS/UP)

- Laboratório de Imunogenética, Departamento de Patologia e Imunologia Molecular

EQUIPA DE INVESTIGAÇÃO

Constituição

Aluna

- Carla Cândida Costa: Aluna do Curso de Mestrado Integrado em Medicina, ICBAS/UP e HSA/CHP, Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica.

Orientadores

- Prof. Doutor Carlos Vasconcelos: Médico Especialista em Medicina Interna e Investigador da Unidade de Imunologia Clínica do HSA/CHP; Professor Convidado do ICBAS/UP.
- Prof. Doutora Berta Martins: Professora e Investigadora do ICBAS/UP; Laboratório de Imunogenética, Departamento de Patologia e Imunologia Molecular do ICBAS/UP.

Supervisores

- Prof. Doutora Margarida Lima: Médica Especialista em Imunohemoterapia e Investigadora do Serviço de Hematologia Clínica do HSA/CHP; Professora Convidada do ICBAS/UP, responsável pela Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica.

Outros investigadores

- Dra. Esmeralda Neves: Médica Especialista de Patologia Clínica / Imunologia e Investigadora do Serviço de Imunologia do HSA/CHP.

Técnicos de Investigação

- Técn. Marlene Santos: Técnica de Diagnóstico e Terapêutica do Laboratório de Citometria do Serviço de Hematologia Clínica do HSA/CHP.

Funções e responsabilidades

- Carla Costa: Aluna responsável pela concepção orientada do trabalho, recolha e tratamento dos dados e elaboração do respectivo relatório.
- Prof. Doutor Carlos Vasconcelos: responsável pela orientação do trabalho, nomeadamente no que respeita à sua vertente clínica e a todos os procedimentos realizados no HSA/CHP.
- Prof. Doutora Berta Martins: responsável pela co-orientação do trabalho.
- Prof. Doutora Margarida Lima: responsável pela supervisão global do trabalho e pelo seu enquadramento na Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica; responsável pela supervisão das análises efectuadas no Laboratório de Citometria do Serviço de Hematologia do HSA/CHP.
- Dra. Esmeralda Neves: responsável pela supervisão das análises efectuadas no Serviço de Imunologia do HSA/CHP.
- Técn. Marlene Santos, responsável por efectuar as análises no Laboratório de Citometria do Serviço de Hematologia do HSA/CHP.

Tempo afecto ao projecto

Total: 6,00 pessoas*mês

- Carla Costa: 2 pessoas*mês (20% do tempo completo semanal durante 10 meses)
- Prof. Doutor Carlos Vasconcelos: 1,5 pessoas*mês (15% do tempo completo semanal durante 10 meses)
- Prof. Doutora Berta Martins: 1 pessoas*mês (10% do tempo completo semanal durante 10 meses)
- Prof. Doutora Margarida Lima: 0,25 pessoas*mês (2.5% do tempo completo semanal durante 10 meses).
- Dra. Esmeralda Neves: 0,25 pessoas*mês (2.5% do tempo completo semanal durante 10 meses).
- Técn. Marlene Santos: 1 pessoas*mês (10% do tempo completo semanal durante 10 meses) – Horário extra-laboral.

- ## CALENDARIZAÇÃO

Duração

Datas de Início e Conclusão

Cronograma de Execução

- Setembro de 2008: Preparação para o início do Estudo: apresentação do Estudo em Reunião do Serviço da Unidade de Imunologia Clínica e do Serviço de Hematologia Clínica; implementação dos procedimentos na Consulta de Imunologia Clínica; selecção dos Participantes.
- Outubro de 2008 – Fevereiro de 2009: Execução do Estudo.
- Março 2009 – Abril de 2009: Recolha e tratamento de dados.
- Maio de 2009: Elaboração do Relatório do Estudo e de trabalhos para apresentação / publicação.
- Junho de 2009: Apresentação do trabalho em Congresso a organizar pelos alunos da DIIC.

A. PLANO CIENTÍFICO

1. INTRODUÇÃO

A síndrome de Sjögren é uma doença auto-imune sistémica caracterizada pela diminuição da secreção salivar e lacrimal devido à infiltração glandular de leucócitos, resultando consequentemente em xerostomia e queratoconjuntivite seca¹.

A síndrome pode ocorrer isoladamente, designada síndrome de Sjögren primária, ou em associação a outras doenças auto-imunes, designada síndrome de Sjögren secundária, denominação esta que por ser mais correcta, passaremos a designar por associada.

A prevalência da Síndrome de Sjögren na população não ultrapassa os 0.6%, afectando de modo predominante as mulheres na terceira ou quarta década de vida². Estima-se que a síndrome de Sjögren seja a segunda doença reumatológica mais comum nos Estados Unidos³, tendo sido relatada a presença da síndrome de Sjögren associada em 30% dos doentes com Artrite Reumatóide, em 10% dos doentes com Lúpus Eritmatoso Sistémico e em 1% dos doentes com Esclerodermia.

Apesar dos inumeros estudos que se têm vindo a desenvolver, a patogénese da síndrome de Sjögren permanece pouco clara.

A predisposição imunogenética parece desempenhar um papel importante na sua incidência, tendo-se demonstrado frequência de antigénios de histocompatibilidade HLA-B8, HLA-DRw3 e MT-2 significativamente aumentada nos doentes com síndrome de Sjögren primária⁴. No entanto, estão implicados outros factores, nomeadamente hormonais (idade e o género) e ambientais relacionados com as infecções pelos vírus Epstein Barr (EBV), da Imunodeficiência Humana (HIV), da hepatite C (VHC) e da leucemia / linfoma de células T do adulto (HTLV1)⁵.

Sabe-se que na etiopatogenia da síndrome de Sjögren está implicada a infiltração linfocítica glandular (em agregados focais) que leva a lesões linfo-epiteliais que se tornam progressivamente mais extensas e originam a destruição das estruturas glandulares, com atrofia dos ácinos, dilatação dos ductos glandulares e perda da função secretória pelas estruturas glandulares.

Os linfócitos T do tipo $\alpha/\beta+$, maioritariamente de tipo CD4, constituem a população predominante de células linfóides que infiltram as glândulas. Expressam marcadores de activação celular e muitos são citotóxicos. Produzem citocinas do tipo Th1 como o

IFN γ , IL-2 e são capazes de estimular a capacidade fagocítica dos macrófagos locais, induzir a expressão de moléculas envolvidas na apresentação de antígenos, estimular a actividade citotóxica dos linfócitos T e das células NK e promover a diferenciação dos linfócitos B e a síntese de anticorpos.

No sangue periférico salienta-se a linfopenia T CD4 em doentes com síndrome de Sjögren^{6,7,8}. As células T reguladoras parecem ter um papel importante na etiopatogenia de doenças algumas auto-imunes, nomeadamente no Lúpus Eritematoso Sistémico e foi descrita uma diminuição destas células no sangue periférico de doentes com síndrome de Sjögren⁹. No entanto, o papel destas células na síndrome de Sjögren é desconhecido.

Estudos recentes evidenciam o papel crucial dos linfócitos B na etiopatogenia da síndrome de Sjögren. Além de produzirem anticorpos os linfócitos B são capazes de produzir citocinas e actuar como células apresentadoras de antígenos¹⁰.

Existem diferentes tipos de autoanticorpos produzidos pelos linfócitos B de doentes com a síndrome de Sjögren. Salientam-se, pela sua frequência e implicação na etiopatogenia da doença, os anticorpos anti-ribonucleoproteínas como SSA (Ro) e SSB (La), os anticorpos anti-alfa-fodrina (proteína do citoesqueleto) e os anticorpos anti-receptores da acetilcolina (receptores muscarínicos de tipo M3). Também são relativamente frequentes o factor reumatóide e os anticorpos anti-nucleares. Ocasionalmente podem ser observados anticorpos contra a tiroglobulina, microssomas, histonas, plaquetas, eritrocitos, ADN cadeia simples, citoplasma de neutrófilo (ANCA).

O estudo que se propõe pretende analisar o papel dos linfócitos T e dos autoanticorpos na etiopatogenia da síndrome de Sjögren, avaliando os vários parâmetros que possam de forma mais completa contribuir para o conhecimento de fisiopatogenia desta síndrome.

2. ENQUADRAMENTO E MOTIVAÇÕES

A Unidade de Imunologia Clínica é um dos maiores centros de acompanhamento de doentes com doenças auto-imunes do País, e mantém um estímulo constante na investigação clínica e básica, em articulação com outros grupos.

A realização deste estudo poderá constituir uma mais valia significativa para o conhecimento científico e permitirá uma melhor compreensão da etiopatogenia da síndrome de Sjögren.

Como premissas de fundo pretendemos que o nosso estudo seja exequível (tendo por base os conhecimentos, recursos humanos e tecnológicos que permitam atingir os nossos objectivos), relevante (de forma a contribuir para um melhor conhecimento da etiopatogenia desta síndrome), e publicável (promovendo o conhecimento dos resultados e conclusões na forma de artigos científicos).

3. OBJECTIVOS

3.1. Geral

Contribuir para o conhecimento da fisiopatologia da Síndrome de Sjogren primária e secundária, usando biomarcadores de imunidade celular e humoral.

3.2. Específicos

- Avaliar o papel das células T reguladoras ($CD3^+$, $CD4^+$, $CD25^+$ e $CD127^{-/+}$ fraco) na síndrome de Sjögren primária e associada;
- Comparar a frequência de auto – anticorpos SSA, SSb, anti- α -fodrina, anti-músculo liso, anti-nucleares (ANA), anti-citoplasma do neutrófilo (ANCA) e factor reumatóide na síndrome de Sjögren primária e associada;
- Correlacionar os marcadores séricos de activação imune com valores de linfócitos T, B e NK no sangue periférico, com os valores de células T $CD4$ reguladoras no sangue periférico e com biomarcadores da inflamação, nomeadamente proteína C reactiva;
- Correlacionar com os dados laboratoriais com parâmetros epidemiológico-clínicos: sexo, idade, duração da doença, manifestações clínicas e evolução da doença.

4. DESENHO DO ESTUDO E METODOLOGIA

4.1. Tipo de estudo

Estudo nacional, institucional, observacional, analítico, transversal, clínico e laboratorial, do tipo caso-controlo, feito em seres humanos.

4.2. Participantes e elegibilidade

4.2.1. *População*

- Casos

Doentes com diagnóstico de síndrome de Sjögren primária ou associada, seguidos na Consulta de Imunologia Clínica do HSA/CHP.

- Controlos

Dadores benévolos de sangue no Serviço de Hematologia Clínica do HSA/CHP.

4.2.2. Amostra

Dimensão: 60 indivíduos.

- Casos

Tamanho da amostra: 40 indivíduos.

Critérios de inclusão: doentes com diagnóstico de síndrome de Sjögren primária ou associada, que verifiquem a "Revised Version of Classification Criteria for Sjögren's syndrome by the American-European Consensus Group (AECC) – 2002" e que voluntariamente aceitem participar neste estudo.

Critérios de exclusão: Doentes que apresentem: irradiação da cabeça ou pescoço; infecção por hepatite C; infecção por HIV; linfoma; sarcoidose; doença do enxerto contra hospedeiro; uso de anticolinérgicos.

- Controlos

Tamanho da amostra: 20 indivíduos.

Critérios de inclusão: Dadores benévolos de sangue, do mesmo sexo e faixa etária que os casos e que voluntariamente aceitem participar neste estudo.

Critérios de exclusão: Primeiras dádivas; Dadores de sangue que apresentem qualquer patologia associada.

4.2.3. Grupos de estudo

2 grupos experimentais e 1 grupo de controlo

- Casos

Grupo experimental 1: doentes com síndrome de Sjögren primária.

Grupo experimental 2: doentes com síndrome de Sjögren associada a outras doenças auto-imunes.

- Controlos

Grupo de controlo: constituído por dadores benévolos de sangue.

5. PROCEDIMENTOS

5.1. Seleccção dos participantes

- Casos

Seleccção dos doentes com diagnóstico de síndrome de Sjögren primária e associada tendo por base o American-European Consensus Classification Critéria for Sjögren's syndrome (AECC) – 2002:

- Grupo 1

Doentes com síndrome Sjögren primária: A presença de 4 dos 6 itens é indicativa de Síndrome de Sjögren primária, desde que o item IV (histopatologia) e/ou o item VI (serologia) sejam positivos; presença de 3 dos 4 itens de critérios objectivos (III, IV, V e VI).

- Grupo 2

Doentes com síndrome de Sjögren associada: Em doentes com outra doença associada (ex: outra doença do tecido conjuntivo), a presença do item I ou do item II mais algum dos itens III, IV ou V, é indicativo de síndrome de Sjögren associada.

Critérios de Classificação Internacional para a Síndrome de Sjögren

- I. Sintomas oculares: resposta positiva a pelo menos uma das seguintes questões:
 - a. Tem tido olhos secos diariamente, de forma persistente há mais de 3 meses?
 - b. Tem uma sensação recorrente de areia nos olhos?
 - c. Utiliza lágrimas artificiais mais de 3 vezes por dia?
- II. Sintomas orais: resposta positiva a pelo menos uma das seguintes questões:
 - a. Tem tido a sensação de boca seca diariamente há mais de 3 meses?

- b. Tem tido de forma recorrente ou persistente, as glândulas salivares aumentadas, em adulto?
- c. Bebe frequentemente líquidos para ajudar na deglutição de alimentos secos?
- III. Sinais oculares: evidência objectiva de envolvimento ocular definida por resultado positivo em pelo menos um dos seguintes testes:
 - a. Teste de Schirmer, realizado sem anestesia (< 5 mm em 5 min).
 - b. Score Rosa Bengala ou outro score ocular com corante (≥ 4 de acordo com o sistema de Bijsterveld).
- IV. Histopatologia: Biópsia das glândulas salivares menor (obtidas a partir de uma mucosa de aspecto normal) sialoadenite linfocítica focal, avaliada por histopatologista experiente, com score focal ≥ 1 , definido como o nº de focos linfocitários (que estão adjacentes aos ácinos da mucosa normal e contêm mais de 50 linfócitos) em cada 4 mm³ de tecido glandular.
- V. Envolvimento da glândula salivar: evidência objectiva de envolvimento glandular definida por resultado positivo em pelo menos um dos seguintes testes diagnósticos:
 - a. Fluxo salivar total não estimulado ($\leq 1,5$ ml em 15 min).
 - b. Silalografia das parótidas que revele a presença de sialectasias difusas (padrão destrutivo, cavitário ou punctiforme), sem evidência de obstrução nos principais ductos.
 - c. Cintigrafia salivar evidenciando captação tardia, concentração reduzida e/ou excreção lenta do contraste.
- VI. Auto-anticorpos: presença dos seguintes auto-anticorpos no soro:
 - a. Anticorpos para os antígenos Ro (SSA) ou La (SSB), ou ambos.

- Controlos

Seleccção de dadores benévolos de sangue, de acordo com o sexo e faixa etária dos casos.

5.2. Procedimento na Consulta

- Casos

No dia de consulta, o médico assistente explicará aos doentes seleccionados os objectivos do estudo, dar-lhes-há um documento informativo e pedirá a sua colaboração.

Os doentes que concordarem e quiserem participar, assinarão um termo de consentimento informado.

Os doentes serão informados que não terão de pagar taxas moderadoras de análises efectuadas no âmbito do estudo de investigação e que devem entregar as respectivas guias de pagamento ao Investigador Responsável.

No final da consulta e após passarem no Secretariado, os doentes participantes serão encaminhados para o Laboratório de Citometria do Serviço de Hematologia Clínica, levando consigo as requisições de análises (com identificação do estudo de investigação) e autocolantes com número de episódio.

- Controlos

No dia da dádiva de sangue e durante a Consulta pré-dádiva, o médico de serviço nos Dadores de Sangue explicará aos dadores os objectivos do estudo e pedirá a sua colaboração, devendo estes assinar um consentimento informado se concordarem e quiserem participar no estudo.

Os doentes serão informados que não terão de pagar taxas moderadoras de análises efectuadas no âmbito do estudo de investigação e que devem entregar as respectivas guias de pagamento ao Investigador Responsável.

No final da consulta e após passarem no Secretariado, os doentes participantes serão encaminhados para a Sala de Colheitas de Dádivas de Sangue, levando consigo as requisições de análises (com identificação do estudo de investigação) e autocolantes com número de episódio.

5.3. Colheita das amostras de sangue

- Casos

As colheitas de sangue dos doentes serão efectuadas por um dos Técnicos do Laboratório de Citometria do Serviço de Hematologia Clínica.

Serão colhidas duas amostras de sangue, uma para um tubo com EDTA k3 com 4,5 ml e outra para um tubo sem anticoagulante com 7,5 ml. Ambas as amostras serão devidamente identificadas com o autocolante do doente e será anotada a data e a hora da colheita.

A amostra em tubo com EDTA-K3 ficará no Laboratório de Citometria.

A amostra sem anticoagulante será enviada ao Serviço de Imunologia.

Serão mantidas todas as condições necessárias para a conservação da amostra até à sua análise, caso esta não se possa realizar de imediato.

- Controlos

As colheitas de sangue dos Dadores serão efectuadas por um dos Enfermeiros de Serviço na Sala de Colheitas de Dádivas de Sangue do Serviço de Hematologia Clínica.

Será colhida uma amostra de sangue para um tubo com EDTA K3 com 4,5 ml. A amostra será devidamente identificada com o autocolante do Dador e será anotada a data e a hora da colheita.

A amostra será enviada ao Laboratório de Citometria.

5.4. Realização das análises

- Locais

- Laboratório de Citometria do Serviço de Hematologia Clínica.
- Laboratório de Imunologia do Serviço de Imunologia.

- Tarefas

- No Laboratório de Citometria do Serviço de Hematologia Clínica serão efectuados os estudos celulares, por Citometria de Fluxo.
 - As amostras serão processadas primeiramente pelo contador hematológico automático onde se irá realizar o hemograma.
 - De seguida será efectuada a quantificação de populações linfocitárias e o estudo fenotípico das células T CD4 reguladoras por citometria de fluxo usando anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos:
 - Populações linfocitárias T (CD4 e CD8), B e NK: anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD19, anti-CD16+anti-CD56.

- Células T reguladoras: anti-CD3, anti-CD4, anti-CD25 e anti-CD127.
 - Os estudos laboratoriais serão efectuados com a colaboração da Técnica Marlene Santos, em horário pós-laboral.
- No Laboratório do Serviço de Imunologia serão efectuados os estudos imunológicos séricos.
 - As amostras serão centrifugadas e os soros serão utilizados para efectuar as seguintes análises:
 - Autoanticorpos: anticorpos anti-SSa, anti-SSb, anti-alfa-fodrina, anti-músculo liso, anti-nucleares (ANA), anti-citoplasma do neutrófilo (ANCA) e factor reumatóide.
 - Proteína C reactiva.
- Equipamento a utilizar
 - Citómetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson);
 - Contador hematológico automático GENs (Coulter);
 - Centrifugas;
 - Agitadores de tubos de ensaio;
 - Micropipetas.
- Reagentes
 - Anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos com diferentes especificidades (anti - CD3, CD4, CD25 e CD127);
 - Reagente de lise e fixação de células (FACSlysing, Becton Dickinson);
 - Kits para determinação de autoanticorpos séricos e de proteína C reactiva.
- Outro material consumível
 - Tubos de colheita (EDTA-K3, heparina);
 - Tubos de ensaio;
 - Pipetas e micropipetas;
 - Agulhas.

5.5. Tratamento de dados e análise estatística

Os dados obtidos através da citometria de fluxo serão analisados no programa Paint-a-Gate. A análise estatística será feita em SPSS (*Statistical Program for the Social Sciences*).

6. RESULTADOS ESPERADOS

Espera-se contribuir para o conhecimento da fisiopatologia da Síndrome de Sjogren primária e associada, nomeadamente no que respeita ao papel dos autoanticorpos e das células T reguladoras.

7. INDICADORES DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA

A divulgação dos resultados será efectuada através de apresentação de poster ou comunicação oral no Congresso de Iniciação à Investigação Clínica, a organizar no HSA/CHP, pelos alunos da DIIC. Está também prevista a apresentação dos resultados em Congresso da Especialidade, bem como a elaboração de um artigo de revisão sobre a matéria.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Soliotis FC, Moutsopoulos HM (2004). Sjögren's syndrome. *Autoimmunity*. **37**:305-7.
2. Jonsson R, Haga H-J, Gordon T. (2001). Sjögren's syndrome. In: Koopman WJ, ed. *Arthritis and Allied Conditions – a Textbook of Rheumatology*, 14th edn. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, pp.1736–1759.
3. Pillemer S.R, Matterson EL, Jacobsson LT, et al (2001). Incidence of physician-diagnosed primary Sjögren syndrome in residents of Olmsted County, Minnesota. *Mayo Clin Proc*. **50**:882-91.
4. Pascale L, Virginia L, Fairouz D. (2001). HLA class I and class II are both associated with the genetic predisposition to primary Sjögren syndrome. *Human Immunology*. **62**:725-731.
5. Roland J, Ketil M, Didrik V, Peter S. (2002). Current issues in Sjögren's syndrome. Salivary glands and saliva. *Oral Diseases*. **8**:130-140.
6. Henriksson G, Manthorpe and Bredberg A. (2004). Antibodies to CD4 in primary Sjogren's syndrome. *British Society for Rheumatology*. **39**:142-147.
7. Liu MF, Lin LH, Weng MY (2008). Decreased CD4 CD25 T cells in peripheral blood of patients with primary Sjögren's syndrome. *Lupus*. **17**:34-39.
8. Mandl T, Bredberg A, Jacobsson L, Manthorpe R, Henriksson G (2004). CD4 T Lymphocytopenia – a frequent finding in anti-SSA antibody seropositive patients with primary Sjögren's syndrome. *The Journal of Rheumatology*. **31**:4.
9. Costantino CM, Baecher-Allan CM, Hafler DA (2008). Human regulatory T cells and autoimmunity. *Eur J Immunol*. **38**:921-4.

10. Youinou P, Devauchelle V, Hutin P, Berre R, Saraux A, Pers J (2007). A conspicuous role for B Cells in Sjögren' Syndrome. *Clinic Rev Allerg Immunol*. **32**:231-237.

B. QUESTÕES ÉTICAS

Os Doentes serão informados pelo Investigador Responsável no HSA/CHP (Dr. Carlos Vasconcelos) ou por quem o substitua (médico assistente da Consulta), sobre a natureza e os objectivos da investigação e sobre os seus riscos e benefícios. Será fornecido aos doentes um Documento com Informação e solicitada a sua participação no Estudo de Investigação.

Só serão incluídos neste estudo Doentes capazes de compreender a informação dada e tendo assinado e datado o Termo de Consentimento Informado, de forma livre e esclarecida.

Não existem riscos inerentes à participação no Estudo de Investigação, para além dos associados à colheita de sangue, procedimento que já é habitual na Consulta de Imunologia Clínica.

Todos os procedimentos serão efectuados no âmbito das Consultas programadas, pelo que não haverá convocação de doentes para Consultas, Exames ou Análises no âmbito do Estudo de Investigação.

Também não existem benefícios imediatos para os Doentes. Os benefícios do estudo serão benefícios a longo prazo, decorrentes de uma melhor compreensão da fisiopatologia da síndrome de Sjogren.

No plano financeiro do estudo está previsto o pagamento de eventuais despesas relativas a análises efectuadas para fins de investigação, nomeadamente das taxas moderadoras.

INFORMAÇÃO AO DOENTE PARTICIPANTE NO ESTUDO

A síndrome de Sjogren é uma doença que afecta as glândulas e condiciona secura das mucosas (olhos, boca, etc.), podendo também manifestar-se noutros órgãos (rins, fígado, etc.).

Embora possa afectar qualquer indivíduo e qualquer idade, é mais frequente nas mulheres em idade fértil.

As suas causas ainda não estão bem esclarecidas.

Gostaríamos de contar com a sua colaboração para participar neste Estudo, projecto da Aluna Carla Costa, do Curso de Mestrado Integrado em Medicina do ICBAS/UP e que tem como Investigador Responsável o Prof. Dr. Carlos Vasconcelos, da Unidade de Imunologia Clínica.

Este estudo tem como objectivos compreender melhor a doença e as suas causas, possibilitando a obtenção de informação que poderá vir a ser útil para os doentes.

Se concordar, terá que efectuar algumas análises ao sangue, ficando dispensado do pagamento das respectivas taxas moderadoras.

A participação neste estudo não acarretará riscos para si. Também não haverá benefícios imediatos, embora a longo prazo possam existir benefícios indirectos resultantes de uma melhor compreensão da sua doença.

Se não desejar participar não haverá qualquer prejuízo para si.

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

Eu, abaixo-assinado fui informado de que este Estudo de Investigação se destina a estudar a Síndrome de Sjogren.

Sei que neste estudo está prevista a realização de análises ao meu sangue, que vão ser efectuadas no Hospital de Santo António.

Foi-me garantido que todos os dados relativos à identificação dos participantes neste estudo são confidenciais e que será mantido o anonimato.

Sei que posso recusar-me a participar no estudo, sem nenhum tipo de penalização por este facto.

Compreendi a informação que me foi dada, tive oportunidade de fazer perguntas e as minhas dúvidas foram esclarecidas.

Aceito participar de livre vontade no estudo acima mencionado e concordo que sejam efectuados os exames e a colheita de amostras de sangue para realizar as análises que fazem parte deste estudo.

Também autorizo a divulgação dos resultados obtidos no meio científico, garantindo o anonimato.

Nome completo do participante no estudo:

Assinatura

Data

Nome do médico:

Assinatura

Data

C. PLANO FINANCEIRO

1. ORÇAMENTO

TOTAL: 4620,00 Euros

HSA/CHP: 4320,00 Euros

ICBAS/UP: 0 Euros

OUTROS: 300,00 Euros

1.1. HSA / CHP

Total: 4320,00 Euros

1.1.1. Consultas

Não aplicável (estudo realizado em consultas de rotina)

1.1.2. Análises

Análises efectuadas no Serviço de Hematologia Clínica

Total: 3960,00 Euros (1.336,00 + 2.500,00 + 124,00 Euros)

a) Custo das análises

a1) Quantificação de populações linfocitárias: 1336,00 Euros

O custo destas análises, segundo a Tabela Nacional de preços em vigor, é o seguinte:

Populações linfocitárias T (CD4 e CD8), B e NK, quantificação, citometria de fluxo (código 25333): 66,80 Euros / participante.

Doentes: Os custos relativos à quantificação de populações linfocitárias em Doentes não serão suportados pelo Estudo de Investigação, uma vez que esta análise é de rotina e seria feita mesmo que os doentes não participassem no Estudo: 0,00 Euros.

Controlos: Os custos relativos à quantificação de populações linfocitárias em Controlos serão suportados pelo Estudo de

Investigação, uma vez que não são análises habitualmente realizadas aos Dadores de Sangue: $66,80 \text{ Euros} \times 20 = 1336,0$ Euros.

a2) Quantificação de células T reguladoras: 2500,00 Euros

Doentes e controlos: Os custos relativos a esta análise serão suportados pelo Estudo de Investigação, uma vez que estas não são efectuadas por rotina nos doentes com Síndrome de Sjogren: 2500 Euros.

Para esta análise, serão comprados os reagentes necessários e o trabalho técnico será efectuado pela Técnica do Laboratório que foi integrada na Equipa de Investigação, com a colaboração da Aluna, em horário pós-laboral e sem honorários.

Anticorpos monoclonais anti-CD4, anti-CD3, anti-CD25, anti-CD127 (1 frasco de cada): 2000 Euros

Reagentes para lise e fixação de células: 500 Euros

O custo destas análises, se praticado segundo a Tabela Nacional de preços em vigor, seria o seguinte:

Cada marcador adicional (código 25336): 15,00 Euros

Cada participante (4 marcadores adicionais): 60,00 Euros

Total: $60,00 \text{ Euros} \times 60 \text{ participantes} = 3.600,00 \text{ Euros}$

Solicita-se dispensa dos custos relativos a material consumível (tubos de colheita, luvas, pipetas plásticas, ponteiras para micropipetas): inferior a 200 Euros.

b) Taxas moderadoras: 124,00 Euros

Análises por Citometria: 1,55 Euros / cada análise

Total: $1,55 \text{ Euros} \times 2 = 3,10 \text{ Euros}$ / doente participante

Total: $3,10 \times 40 \text{ doentes participantes} = 124,00 \text{ Euros}$

Análises efectuadas no Serviço de Imunologia

Total: 360,00 Euros

a) Custo das análises: 00,00 Euros

Doentes: Os custos relativos ao estudo imunológico (autoanticorpos e proteína C reactiva) não são incluídos, uma vez que essas análises são de rotina e seriam feitas mesmo que os doentes não participassem no estudo de investigação.

O custo dessas análises, segundo a Tabela Nacional de preços em vigor, é o seguinte:

- *Anticorpos anti-nucleares e citoplasmáticos (anti-SSa, anti-SSb) (código 25520): 15,90 Euros*
- *Anti-alfa-fodrina (código não existente)*
- *Anti-músculo liso (código 25054): 13,30 Euros*
- *Anti-nucleares (ANA) (código 25057): 13,50 Euros*
- *ANCA (código: 25019): 17,00 Euros*
- *Factor reumatóide (código 25185): 4,50 Euros*
- *Proteína C reactiva (código 2669): 4,30 Euros*

Controlos: Estas análises não serão efectuadas aos Dadores de Sangue.

b) Taxas moderadoras: 360,00 Euros

Factor reumatóide: 1,00 Euros

Outras análises Imunologia: 1,05 Euros / cada análise

Total: 9,40 Euros / doente participante

Total: 9,40 X 40 doentes participantes = 360, 00 Euros

1.2. ICBAS/UP

Total: 0,00 Euros

Não haverá custos para o ICBAS.

1.3. OUTROS

Total: 300,00 Euros

Apresentação de resultados: 300 Euros, distribuídos da seguinte forma:

- Inscrição da Aluna em Congresso da Especialidade: 200 Euros
- Elaboração de Poster: 50 Euros
- Contribuição para as despesas de organização do Congresso de Iniciação à Investigação Clínica 2008: 50 Euros

2. FINANCIAMENTO

Este estudo será financiado pela Roche Farmacêutica: Bolsa de Iniciação à Investigação Clínica ICBAS/HSA.

PEDIDOS DE AUTORIZAÇÃO INSTITUCIONAL

HSA/CHP

Carta ao Presidente do Conselho de Administração

Exmo. Senhor Presidente do Conselho de Administração do Centro Hospitalar do Porto
Dr. Sollari Allegro

CARLA CÂNDIDA ALVES GRAÇA RIBEIRO COSTA, na qualidade de Aluna da Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica do Curso de Mestrado Integrado em Medicina do ICBAS/HSA, vem por este meio, solicitar a Vossa Exa. autorização para realizar no Centro Hospitalar do Porto o Estudo de Investigação / Trabalho Académico acima mencionado, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Data

Assinatura

Carta à Presidente da Comissão de Ética

Exma. Senhora Presidente da Comissão de Ética para a Saúde do Centro Hospitalar do Porto
Dra. Luísa Bernardo

CARLA CÂNDIDA ALVES GRAÇA RIBEIRO COSTA, na qualidade de Aluna da Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica do Curso de Mestrado Integrado em Medicina do ICBAS/HSA, vem por este meio, solicitar a Vossa Exa. autorização para realizar no Centro Hospitalar do Porto o Estudo de Investigação / Trabalho Académico acima mencionado, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Data

Assinatura

Carta ao Director do Departamento de Ensino, Formação e Investigação

Exma. Senhora Directora do Departamento de Ensino, Formação e Investigação do Centro Hospitalar do Porto
Prof. Doutora Margarida Lima

CARLA CÂNDIDA ALVES GRAÇA RIBEIRO COSTA, na qualidade de Aluna da Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica do Curso de Mestrado Integrado em Medicina do ICBAS/HSA, vem por este meio, solicitar a Vossa Exa. autorização para realizar no Centro Hospitalar do Porto o Estudo de Investigação / Trabalho Académico acima mencionado, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Data

Assinatura

ICBAS/UP

Carta ao Presidente do Conselho Directivo

Exmo. Senhor Presidente do Conselho de Directivo do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto

Prof. Doutor António Sousa Pereira

CARLA CÂNDIDA ALVES GRAÇA RIBEIRO COSTA, na qualidade de Aluna da Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica do Curso de Mestrado Integrado em Medicina do ICBAS/HSA, vem por este meio, solicitar a Vossa Exa. autorização para realizar no Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar o Estudo de Investigação / Trabalho Académico acima mencionado, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Data

Assinatura

PEDIDO DE FINANCIAMENTO

BOLSA DE INICIAÇÃO À INVESTIGAÇÃO CLÍNICA

Carta ao Presidente do Conselho Directivo

Exmo. Senhor Presidente do Conselho de Directivo do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto

Prof. Doutor António Sousa Pereira

CARLA CÂNDIDA ALVES GRAÇA RIBEIRO COSTA, na qualidade de Aluna da Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica do Curso de Mestrado Integrado em Medicina do ICBAS/HSA, vem por este meio, solicitar a Vossa Exa. a atribuição de 4620,00 € (quatro mil seiscientos e vinte euros) da Bolsa de Iniciação à Investigação Clínica da Roche Farmacêutica, SA, para financiamento do Estudo de Investigação / Trabalho Académico acima mencionado, de acordo com orçamento apresentado.

Data

Assinatura

TERMOS DE RESPONSABILIDADE

INVESTIGADOR RESPONSÁVEL

Termo de Responsabilidade do Investigador Principal e Responsável no CHP

Eu, abaixo assinado, CARLOS ALBERTO S VASCONCELOS, médico especialista de Medicina Interna da Unidade de Imunologia Clínica do HSA/CHP, na qualidade de Investigador Principal e Responsável no HSA/CHP, declaro assumir a liderança científica do Estudo de Investigação acima mencionado, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados e com as normas internas da Instituição.

Data

Assinatura

DECLARAÇÕES

ALUNO

Declaração do Aluno

Eu, abaixo assinado, CARLA CÂNDIDA ALVES GRAÇA RIBEIRO COSTA, na qualidade de Aluna da Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica do Curso de Mestrado Integrado em Medicina do ICBAS / HSA, declaro que durante a realização do Estudo de Investigação / Trabalho Académico acima mencionado, respeitarei as normas éticas e deontológicas, que a identificação dos doentes não será revelada e que os dados necessários para a realização do trabalho serão mantidos anónimos e não serão utilizados para qualquer outro fim.

Data

Assinatura

ORIENTADORES / SUPERVISORES

Declaração do Orientador

Eu, abaixo assinado, CARLOS ALBERTO SILVA VASCONCELOS, Médico, Especialista de Medicina Interna da Unidade de Imunologia Clínica do HSA/CHP, na qualidade de Orientador de CARLA CÂNDIDA ALVES GRAÇA RIBEIRO COSTA, Aluna da Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica do Curso de Mestrado Integrado em Medicina do ICBAS/HSA, declaro que me comprometo a acompanhar a aluna nas diferentes fases da sua realização Estudo de Investigação / Trabalho Académico acima mencionado, responsabilizando-me por supervisionar a recolha e utilização dos dados necessários para a realização, bem como zelar pelo cumprimento das normas éticas e deontológicas, nomeadamente para que os dados utilizados na realização do referido trabalho sejam mantidos anónimos e não sejam utilizados para qualquer outro fim.

Data

Assinatura

Declaração do Co-Orientador

Eu, abaixo assinado, MARIA BERTA DE JESUS DUARTE DA SILVA, Professora e Investigadora do ICBAS/UP, na qualidade de Co-Orientadora de CARLA CÂNDIDA ALVES GRAÇA RIBEIRO COSTA, Aluna da Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica do Curso de Mestrado Integrado em Medicina do ICBAS/HSA, declaro que me comprometo a acompanhar a aluna nas diferentes fases da sua realização do Estudo de Investigação / Trabalho Académico acima mencionado, bem como zelar pelo cumprimento das normas éticas e deontológicas, nomeadamente para que os dados utilizados na realização do referido trabalho sejam mantidos anónimos e não sejam utilizados para qualquer outro fim.

Data

Assinatura

Declaração do Supervisor / Responsável pela Disciplina

Eu, abaixo assinado, MARGARIDA MARIA DE CARVALHO LIMA, Médica, Especialista de Imunohemoterapia do HSA/CHP, na qualidade de Professora Responsável pela Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica do Curso de Mestrado Integrado em Medicina do ICBAS/HSA, declaro que me comprometo a acompanhar a aluna CARLA CÂNDIDA COSTA, Aluna da Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica do Curso de Mestrado Integrado em Medicina do ICBAS/HSA nas diferentes fases da sua realização do Estudo de Investigação / Trabalho Académico acima mencionado.

Data

Assinatura

TERMOS DE AUTORIZAÇÃO LOCAL

Serviços e Unidades

Autorização do Responsável pela Unidade de Imunologia Clínica

CARLOS ALBERTO DA SILVA VASCONCELOS, na qualidade de Responsável pela Unidade de IMUNOLOGIA CLÍNICA do HSA/CHP, declaro que autorizo a execução do Estudo de Investigação / Trabalho Académico acima mencionado e comprometo-me a prestar as condições necessárias para a boa execução do mesmo, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Data

Assinatura e carimbo

Autorização do Director do Serviço de Hematologia Clínica

MANUEL CÉSAR S ARAÚJO CAMPOS, na qualidade de Director do Serviço de HEMATOLOGIA CLÍNICA do HSA/CHP, declaro que autorizo a execução do Estudo de Investigação / Trabalho Académico acima mencionado e comprometo-me a prestar as condições necessárias para a boa execução do mesmo, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Data

Assinatura e carimbo

Autorização da Directora do Serviço de Imunologia

MARIA CONCEIÇÃO R M CERVEIRA, na qualidade de Directora do Serviço de IMUNOLOGIA do HSA/CHP, declaro que autorizo a execução do Estudo de Investigação / Trabalho Académico acima mencionado e comprometo-me a prestar as condições necessárias para a boa execução do mesmo, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Data

Assinatura e carimbo

Departamentos

Autorização do Director do Departamento de Medicina

JOÃO JOSÉ LOPES GOMES, na qualidade de Director do Departamento de MEDICINA do HSA/CHP, declaro que autorizo a execução do Estudo de Investigação / Trabalho Académico acima mencionado e comprometo-me a prestar as condições necessárias para a boa execução do mesmo, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Data

Assinatura e carimbo

Autorização do Director do Departamento de Patologia Laboratorial

MARIA HELENA S SANTOS RAMOS, na qualidade de Directora do Departamento de PATOLOGIA LABORATORIAL do HSA/CHP, declaro que autorizo a execução do Estudo de Investigação / Trabalho Académico acima mencionado e comprometo-me a prestar as condições necessárias para a boa execução do mesmo, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Data

Assinatura e carimbo