



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

VANESSA MIRANDA PEREIRA FAUSTO

**Biomarcadores metabólicos associados ao risco cardiovascular aumentado em
pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico**

Maceió
2023

VANESSA MIRANDA PEREIRA FAUSTO

**Biomarcadores metabólicos associados ao risco cardiovascular aumentado em
pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal de Alagoas, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Doenças autoimunes

Orientador: Prof. Dr. Thiago Sotero Fragoso

Maceió
2023

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

F268b Fausto, Vanessa Miranda Pereira.

Biomarcadores metabólicos associados ao risco cardiovascular aumentado em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico / Vanessa Miranda Pereira

Fausto. – 2023.

61 f. : il.

Orientador: Thiago Sotero Fragoso.

Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Universidade Federal de Alagoas. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas. Maceió, 2023.

Inclui produto educacional.

Bibliografia: f. 45-51.

Apêndices: f. 52-60.

Anexos: f. 61.

1. Lúpus eritematoso sistêmico. 2. Metabólica. 3. Fatores de risco de doenças cardíacas. I. Título.

CDU: 616.51

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me permitido saúde e determinação para este trabalho.

Ao meu esposo, Lucyano, por ser companheiro, me apoiar e estimular em minhas decisões.

Aos meus filhos, Lavínia e Vitor, por serem a razão da minha vida e entenderem meus momentos de ausência.

Aos meus pais, Osmar e Graça, que, mesmo distantes, se fazem presentes em todos os momentos, pelos grandes ensinamentos e por serem a minha base.

Aos meus irmãos, Fernanda, Luísa e Tiago, que sempre acreditaram em mim.

Ao meu orientador, Dr. Thiago Fragoso, que sempre me incentivou a fazer o mestrado e proporcionou essa oportunidade, acreditando no meu crescimento profissional.

A Jeferson, Ana Catarina, Thiago Aquino e Maiara, que fazem parte do Instituto de Química da UFAL e proporcionaram a análise metabolômica de nossos pacientes.

A Jaciel Clementino e Jéssica Mecnas, que tanto me ajudaram nos agendamentos e coletas dos pacientes, além de tornarem nossos dias de pesquisa mais leves.

A Larissa Pinto, pela sua disponibilidade em sempre esclarecer dúvidas sobre o projeto e mestrado.

Ao Hospital Universitário Professor Alberto Antunes e à Universidade Federal de Alagoas, pela oportunidade que tenho de trabalhar como reumatologista em um serviço de alta complexidade do estado e fazer o mestrado nessas instituições.

Aos pacientes, que em seu momento de doença e maior fragilidade se prontificaram a participar da pesquisa, espero fornecer o retorno que eles merecem e precisam.

À agora reumatologista Juliana Leal, residente durante um período do mestrado, e ao residente Rafael Wanderley, que foram bastante compreensivos nas adaptações que precisei fazer durante a realização deste projeto.

Enfim, muito grata a todos que, direta ou indiretamente, ajudaram na minha caminhada em busca do título de mestre.

RESUMO

INTRODUÇÃO: Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença inflamatória crônica, imunomediada, em que a alteração da regulação imune e a presença de autoanticorpos resultam em acometimento de múltiplos órgãos. Além disso, os pacientes com LES apresentam risco cardiovascular (RCV) aumentado, e os métodos existentes de rastreamento do RCV não são suficientes. A metabolômica permite a detecção e a quantificação de moléculas de baixo peso molecular que ocorrem nos sistemas biológicos, que podem se tornar biomarcadores de doenças. **OBJETIVOS:** Avaliar o perfil metabolômico que pode estar associado ao RCV aumentado nessa população. **MÉTODOS:** Estudo transversal em indivíduos com LES com idade maior ou igual a 20 anos do serviço de Reumatologia do Hospital Universitário Professor Alberto Antunes (Hupaa) – Universidade Federal de Alagoas (Ufal). Os controles foram pareados por idade e não tinham doença autoimune. Foram avaliados os fatores de risco para doença cardiovascular (DCV), como hipertensão arterial sistêmica (HAS), diabetes *mellitus* (DM), tabagismo, dislipidemia e, juntamente com exames laboratoriais, foi calculado o RCV pelo escore de Framingham modificado (x2). A análise metabolômica do plasma sanguíneo foi realizada nos pacientes e controles. A discriminação de metabólitos entre os grupos foi feita pelo OPLS-DA (gráfico de mínimos quadrados ortogonais), e várias permutações foram definidas como 2000 para avaliar o modelo. Os metabólitos importantes foram selecionados pelo limiar do VIP baseado no gráfico VIP (gráfico de importância variável) $\geq 1,5$. Foram aplicados o índice de atividade do *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index* (SLEDAI) e o índice de dano do *Systemic Lupus International Collaborating Clinics* (SLICC). **RESULTADOS:** A amostra foi composta de 79 pacientes lúpicos e 45 controles, e 21 pacientes com LES foram classificados como intermediário/alto RCV. O OPLS mostrou que o LES foi discriminado dos controles, com Q^2 0,778, R^2Y 0,901 e $p < 0,05$, porém o OPLS não discriminou pacientes com LES e intermediário/alto RCV dos pacientes com baixo RCV, com Q^2 - 0,00648 e $p = 0,073$, R^2Y 0,266 e $p = 0,055$. A variável A VIP (variável de projeção importante) encontrou os metabólitos glutatona, tirosina, fenilalanina, alanina, metil-histidina, glutamina e histidina, diferentes entre os pacientes com LES e controles, que apresentaram o $VIP \geq 1,5$. **CONCLUSÃO:** Encontramos perfil metabolômico discriminante entre LES e controle, porém não encontramos entre os pacientes com intermediário/alto RCV e baixo RCV, provavelmente devido ao tamanho da amostra. Os metabólitos podem se tornar biomarcadores no futuro, porém mais estudos são necessários para validar esses achados devido aos múltiplos fatores que podem influenciar. Estudos prospectivos também seriam relevantes para analisar o desfecho cardiovascular.

Palavras-chave: lúpus eritematoso sistêmico; metabolômica; risco cardiovascular.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is a chronic, immune-mediated inflammatory disease in which altered immune regulation and the presence of autoantibodies result in the involvement of multiple organs. Furthermore, patients with SLE are at increased cardiovascular risk (CVR) and existing methods of screening for CVR are not sufficient. Metabolomics allows the detection and quantification of low molecular weight manifestations that occur in biological systems, which can become biomarkers of diseases. **OBJECTIVES:** To assess the metabolic profile that may be associated with increased RCV in this population. **METHODS:** Cross-sectional study of individuals with SLE aged 20 years or older at the Rheumatology service of the Professor Alberto Antunes University Hospital (Hupaa) – Federal University of Alagoas (Ufal). Controls were age-matched and had no autoimmune disease. the RCV by the modified Framingham score (x2). Metabolomic analysis of blood plasma was performed in patients and controls. The distinction of metabolites between groups was made by OPLS-DA (orthogonal least squares plot), and various permutations were defined as 2000 to evaluate the model. Important metabolites were selected by VIP threshold based on VIP plot (Importance plot variable) ≥ 1.5 . The Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI) and the Systemic Lupus International Collaboration Clinics (SLICC) damage index were applied. **RESULTS:** The sample consisted of 79 SLE patients and 45 controls, where 21 SLE patients were classified as intermediate/high RCV. OPLS showed that SLE was discriminated from controls, with Q^2 0.778, R^2Y 0.901 and $p < 0.05$, however OPLS does not discriminate patients with SLE and level/high CVR from patients with low CVR, with Q^2 -0.00648 and $p = 0.073$, R^2Y 0.266 and $p = 0.055$. Variable A VIP (important projection variable) found the metabolites glutathione, tyrosine, phenylalanine, alanine, methylhistidine, glutamine and histidine different between patients with SLE and controls, who demonstrated $VIP \geq 1.5$. **CONCLUSION:** We found a discriminating metabolomic profile between SLE and control, however, we did not find it among patients with intermediate/high RCV and low RCV, probably due to the sample size. Metabolites may become biomarkers in the future, but more studies are needed to validate these findings due to multiple factors that may influence. Prospective studies would also be relevant to analyze the cardiovascular outcome.

Keywords: systemic lupus erythematosus; metabolomics; cardiovascular risk.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACR	American College of Rheumatology
<i>Ala</i>	Alanina
DCV	Doença cardiovascular
DM	Diabetes <i>Mellitus</i>
FRS	<i>Score</i> de Framingham
<i>Gln</i>	Glutamina
<i>GSH</i>	Glutationa
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
<i>His</i>	Histidina
Hupaa	Hospital Universitário Professor Alberto Antunes
IMC	Índice de Massa Corporal
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
<i>m-His</i>	Metil-histidina
OPLS-DA	Gráfico de mínimos quadrados ortogonais
<i>Phe</i>	Fenilalanina
RCV	Risco cardiovascular
RNM	Ressonância Magnética Nuclear
SLEDAI	Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index
SLICC	Systemic Lupus International Collaborating Clinics
Ufal	Universidade Federal de Alagoas
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<i>Tyr</i>	Tirosina
VIP	Gráfico de importância variável

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	JUSTIFICATIVA	9
3	OBJETIVOS	10
3.1	Objetivo geral	10
3.2	Objetivos específicos	10
4	REVISÃO DE LITERATURA	11
4.1	Lúpus Eritematoso Sistêmico	11
4.2	Risco cardiovascular e Lúpus Eritematoso Sistêmico	15
4.3	Identificação de biomarcadores através da metabolômica	17
5	METODOLOGIA	20
5.1	Tipo de estudo e amostra	20
5.2	Aspectos éticos	20
5.3	Coleta de dados	20
5.3.1	Dados clínicos e sociodemográficos	20
5.3.2	Exames laboratoriais	21
5.3.3	Avaliação do risco cardiovascular	21
5.3.4	Análise metabolômica	22
5.3.5	Análise de dados	23
6	PRODUTO	24
7	CONCLUSÕES	40
8	LIMITAÇÕES	41
	REFERÊNCIAS	42
	APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	49
	APÊNDICE B – FORMULÁRIO PARA COLETA DE DADOS CLÍNICOS E SOCIODEMOGRÁFICOS	52
	APÊNDICE C – SLEDAI-2K MODIFICADO	54
	APÊNDICE D – SLICC	56
	ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP	57

1 INTRODUÇÃO

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença autoimune complexa, caracterizada por alteração da regulação imune, inflamação crônica e acometimento de múltiplos órgãos (ROBINSON *et al.*, 2021). A produção e eliminação deficiente de anticorpos, com deposição de imunocomplexos, complementos e ativação de citocinas contribuem para as manifestações clínicas, que vão desde fadiga leve e dores articulares até acometimento grave e em órgãos com ameaça à vida (KIRIAKIDOU *et al.*, 2013). As manifestações clínicas mais comuns são: artrite (64-91%), lesão cutânea (64-91%), envolvimento renal (28-73%), fenômeno de Raynaud (24-61%), envolvimento do sistema nervoso central (11-49%) e serosite (12-36%) (CERVERA *et al.*, 1993). Acomete predominantemente mulheres (relação de mulheres para homens de 9:1) (COELEWIJ *et al.*, 2021).

O prognóstico de pacientes com LES tem melhorado nas últimas décadas, principalmente durante os primeiros anos depois do diagnóstico. Entretanto, em longa perspectiva, a mortalidade é aumentada se comparada à esperada (BJÖRNÅDAL *et al.*, 2004). Desde os anos 1970-1990, houve uma tendência de queda na mortalidade por LES; a sobrevivência em 5 anos dos pacientes com LES foi de 50%, na década de 1950, e de 96% na década de 2000, e os avanços nos protocolos de tratamento têm proporcionado essa mudança. No entanto, dados contemporâneos sugerem que a mortalidade por LES por todas as causas não melhorou nas últimas duas décadas. Houve mudanças na mortalidade ao longo da doença, separando o LES com doença precoce (<7 anos) do tardio (7-14 anos) (OCAMPO-PIRAQUIVE *et al.*, 2018). É sabido que as causas de morte na doença inicial são relacionadas ao envolvimento grave de órgãos, como os rins, e a infecções decorrentes do tratamento com imunossupressão. Todavia, as doenças cardiovasculares (angina, infarto agudo do miocárdio, doença arterial periférica, acidente vascular cerebral e falência cardíaca) têm sido registradas como sendo a mais frequente causa de morte no estágio final da doença (BJÖRNÅDAL *et al.*, 2004).

O LES é associado com aterosclerose acelerada (MASSOM *et al.*, 2019), e o paciente lúpico tem 5 a 10 vezes mais risco de desenvolver doença cardiovascular se comparado a pessoas saudáveis do mesmo sexo e idade (COELEWIJ *et al.*, 2021).

A metabolômica é uma área emergente que utiliza técnicas de bioinformática e analíticas avançadas e, através destas, mede produtos de expressão, denominados metabólitos (BUJAK *et al.*, 2015). O LES é reconhecido como um fator de risco independente para DCV, e os *scores* de risco validados não contemplam a doença (SIVAKUMARAN *et al.*, 2021). Dessa maneira, a metabolômica poderia auxiliar nessa estratificação.

2 JUSTIFICATIVA

O LES está associado a uma maior mortalidade se comparado a outras causas para a população do mesmo sexo e idade, e o avanço no tratamento tem prolongado a vida dos pacientes e modificado a causa de óbito. Há uma distribuição bimodal da mortalidade da doença: de forma prematura, por atividade da doença ou infecção, e tardia, por complicações da DCV. A DCV é a principal etiologia de morte em pacientes com LES de longa duração, e prevenível quando o tratamento é estabelecido em tempo hábil. Por essas razões, é necessária uma metodologia de rastreamento do RCV nessa população específica. Atualmente, as medidas de RCV são adaptadas para pacientes com LES e carecem de maior especificidade para doença. A identificação de biomarcadores a partir da análise metabólica poderia auxiliar no desenvolvimento de novos *scores* de rastreamento, tendo sua aplicabilidade como preditores de RCV em diferentes fases da doença. Dessa maneira, protocolos de intervenção mais precoces, com o uso de tratamento preventivo, reduziriam o risco de óbito por doença cardiovascular, aumentando a sobrevida de pacientes com LES.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Analisar o perfil de metabólitos do plasma de pacientes com LES e comparar aqueles com alto/intermediário com os de baixo RCV.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar o perfil metabólico através da ressonância magnética nuclear de prótons nos pacientes com LES e controles;
- Estimar o RCV dos pacientes com LES e controles;
- Verificar o perfil clínico, epidemiológico e prevalência das comorbidades identificadas.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Lúpus Eritematoso Sistêmico

O LES é uma doença autoimune sistêmica crônica com uma grande variedade de manifestações clínicas e uma complexa patogênese (ZUCCHI *et al.*, 2019). Há fatores genéticos, ambientais, imunológicos, étnicos, hormonais e epigenéticos que interagem para a manifestação da doença, e vários pontos-chave dessas conexões multifatoriais ainda não estão claros (TSOKOS, 2011; ZUCCHI *et al.*, 2022). É uma doença que afeta mais mulheres jovens e populações não brancas (LISNEVSKAIA; MURPHY; ISENBERG, 2014; DURCAN *et al.*, 2019). A média de idade de diagnóstico para mulheres brancas é entre 37 e 50 anos; em homens brancos, entre 50 e 59 anos; em mulheres negras, entre 15 e 44 anos; em homens negros, entre 45 e 64 anos (RUS; MAURY; HOCHBERG, 2002). É uma doença que pode afetar qualquer órgão ou sistema e tem uma ampla variedade de manifestações, que vão desde uma doença leve até uma doença com manifestações catastróficas e que ameaçam a vida (TSOKOS *et al.*, 2016).

Globalmente, estima-se que a prevalência do LES em adultos varia de 30 a 150 por 100.000; a incidência varia de 2,2 a 23,1 por 100.000 (DURCAN; O'DWYER; PETRI, 2019). Não há registros da prevalência de LES no Brasil. Devemos lembrar que se trata de um país de tamanho continental, com variações geográficas que influenciam nas manifestações e também nas notificações desses pacientes.

O LES tem sido reconhecido há muito tempo como tendo um importante componente hereditário (KUO *et al.*, 2015; ALARCÓN-SEGOVIA *et al.*, 2005). Numerosos estudos de associação de genoma têm identificado mais de 100 predisposições em *loci* gênicos como polimorfismos. Os fatores genéticos que conferem maior risco são deficiências de C1q, C4A e B, C2, a presença de um gene TREX1 e STING mutante e HLA-DRB1*0301 E HLA-DRB1*1501 (CROW *et al.*, 2015; LO, 2016; AGGARWAL *et al.*, 2010). No entanto, essa informação genética é responsável por apenas 28% da suscetibilidade ao LES, sugerindo um grande componente de influências ambientais, hormonais e epigenéticas, ou genes ainda não descobertos. Novas evidências sugerem que a prevalência feminina no LES está, provavelmente, relacionada a modificações epigeneticamente induzidas na expressão de genes de imunidade ligados ao X, especialmente na autoimunidade impulsionada por células B (ZUCCHI *et al.*, 2022).

Os fatores hormonais também explicam a predominância feminina e a média de idade de manifestação. A função imunorreguladora do estradiol, da testosterona, da progesterona, da desidroepiandrosterona (DHEA) e dos hormônios hipofisários, incluindo a prolactina, tem

apoiado a hipótese de que eles modulam a incidência e a gravidade do LES (LI; MAY; MCMURRAY, 2005). Pode estimular a via do IFN tipo 1, enquanto a progesterona pode inibi-la, sugerindo que um equilíbrio dos dois pode ser importante.

Um dos principais fatores ambientais envolvidos na doença são infecções virais, que podem estimular células antígeno – específicas na rede imunológica. Além disso, infecções por tripanossomíase, micobactérias ou vírus Epstein-Barr podem induzir anticorpos antiDNA ou mesmo sintomas semelhantes ao lúpus (JOG; JAMES, 2021). Outro fator superimportante é a luz ultravioleta, que pode estimular os queratinócitos a secretar mais citocinas, TNF alfa, estimulando assim as células B a produzirem mais anticorpos. Essa autoimunidade ocorre de forma sistêmica ao interferir no processamento de antígenos e na ativação de macrófagos de todo organismo (CASCIOLA-ROSEN; ANHALT; ROSEN, 1994; YUNG *et al.*, 1996).

O LES é caracterizado pela presença de autoanticorpos nucleares, com a formação e deposição de imunocomplexos e inflamação de múltiplos órgãos (DURCAN; O'DWYER; PETRI, 2019). A patogênese envolve uma desregulação e um desequilíbrio do sistema imune, com aumento da produção de citocinas, anticorpos, imunocomplexos e redução dos mecanismos de autotolerância e clareamento desse estado hiperimune (TSOKOS *et al.*, 2016). Há desregulação tanto da imunidade inata quanto da imunidade adaptativa (PAN *et al.*, 2020).

Na imunidade inata, há a participação do interferon I (IFN I), receptores *Toll like*, em especial 7 e 9, ativação de componentes do complemento. O INF I, que afeta vários componentes do sistema imunológico, é uma das principais citocinas que contribuem para a patogênese do LES. Os neutrófilos têm importante participação, com aumento de NETs (armadilhas extracelulares de neutrófilos) que formam autoantígenos, incluindo cromatina, DNA dupla hélice e proteínas granulares (GARCÍA-ROMO *et al.*, 2011). Esses NETs não são retirados e estimulam as células dendríticas a produzirem IFN I via TLR 9. No baço, os neutrófilos podem induzir mudança de classe de IGG, mutação e ativação de linfócitos B. As células dendríticas também fazem parte da imunidade inata, conectam os sistemas imune e adaptativo e têm um espectro diversificado de respostas imunes por meio do processamento de antígenos, apresentação, produção de citocinas e interações entre receptores coestimulatórios. Elas são ativadas no LES via TLR 7 e TLR 9 e produzem IFN I e TNF α , que contribuem para expressão da doença. Os macrófagos têm sua capacidade de remoção e limpeza reduzida no LES, e a redução de complemento também reduz essa capacidade de depuração (TSOKOS, 2020).

Em relação à imunidade adaptativa, destaca-se a importante função das células B e T autorreativas, com quebra dos mecanismos de tolerância (TSOKOS *et al.*, 2016; PAN *et al.*,

2020). As células B têm a produção de anticorpos aumentada e são ativadas pelo Bly (fator de ativação de células B) e pelas células T. Há um desequilíbrio na relação entre Th1/ Th2, mas a tendência do desequilíbrio ainda é controversa (TSOKOS, 2020). As células B também ajudam a perpetuar o processo produzindo citocinas como IL-6, TNF, IFN e IL-10 (PAN *et al.*, 2020).

A nível celular, o LES apresenta disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, produção diminuída de ATP, aumento de intermediários de oxigênio (ROS), ativação de mTORC 1 e aumento do fluxo de glicose. É importante ressaltar que o estresse oxidativo é um dos fatores-chave no desenvolvimento e progressão do LES, em que há desregulação do sistema imunológico e modificação de autoantígenos (BENGTSSON *et al.*, 2016).

O LES é uma doença multifacetada, com várias manifestações sistêmicas e quadro clínico variável ao longo do tempo. Pode ter manifestações cutâneas, articulares, pulmonares, cardíacas, renais, neurológicas e hematológicas, bem como manifestações menos comuns, como gastrointestinais, hepáticas e oculares (TANI *et al.*, 2022).

A diversidade de manifestações da doença é um desafio para o clínico, e a heterogeneidade da doença levou à criação de critérios para formalizar o diagnóstico de LES. Foram estabelecidos 11 critérios pelo American College of Rheumatology (ACR), que foram revisados em 1997, e o preenchimento de quatro deles seria suficiente para o diagnóstico (HOCHBERG, 1997). Esses foram os critérios utilizados na nossa pesquisa.

Quadro 1 – Atualização de 1997 dos critérios revisados do American College of Rheumatology de 1982 para a Classificação do Lúpus Eritematoso Sistêmico.

CRITÉRIO	DEFINIÇÃO
Eritema malar	Lesão eritematosa fixa em região malar, plana ou em relevo.
Erupção discoide	Lesão eritematosa, infiltrada, com escamas queratóticas aderidas e tampões foliculares, que evolui com cicatriz atrófica e discromia.
Fotossensibilidade	Exantema cutâneo como reação não usual à exposição à luz solar, de acordo com a história do paciente ou observado pelo médico.
Úlceras orais/nasais	Úlceras orais ou nasofaríngeas, usualmente indolores, observadas pelo médico.
Artrite	Não erosiva envolvendo duas ou mais articulações periféricas, caracterizadas por dor e edema ou derrame articular.
Serosite	Pleurite (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).

Comprometimento renal	Proteinúria persistente (> 0,5 g/dia ou 3+) ou cilindrúria anormal.
Alterações neurológicas	Convulsões (na ausência de outras causas) Psicose (na ausência de outras causas)
Alterações hematológicas	Anemia hemolítica ou leucopenia (menor que 4.000/mm ³ em duas ou mais ocasiões) ou linfopenia (menor que 1.500/mm ³ em duas ou mais ocasiões) ou plaquetopenia (menor que 100.000/mm ³ na ausência de outra causa).
Alterações imunológicas	Anticorpo antiDNA nativo ou antiSm 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.
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.

Fonte: Adaptado de Hochberg (1997).

Desde então, a compreensão da doença avançou. Foram descritas novas lesões cutâneas, novas manifestações clínicas foram compreendidas e novos testes imunológicos entraram na prática clínica. Em 2019, o EULAR/ACR estabeleceu novos critérios diagnósticos. Houve algumas mudanças: o FAN é critério de entrada para diagnóstico; febre não explicada por outros motivos e alopecia não cicatricial tornaram-se critérios; *delirium*, psicose e pericardite foram redefinidos, e a biópsia renal com nefrite classe III ou IV passou a ter maior peso e, na presença de FAN positivo, já é suficiente para classificar o paciente como LES. Além disso, o antiβ₂glicoproteína1 e a queda de complemento (C3 e C4) tornaram-se, também, critérios imunológicos para diagnóstico. É importante ressaltar que os critérios devem ser utilizados para facilitar, mas nunca devem excluir os pacientes que não atendem a eles e necessitam de terapias urgentes e apropriadas. Os critérios são extremamente úteis para classificar os pacientes com LES, principalmente no contexto de pesquisa (ARINGER *et al.*, 2019).

O tratamento do LES deve ser individualizado e depende das manifestações clínicas, da atividade e gravidade da doença, bem como da presença de comorbidades. Hidroxicloroquina e imunossuppressores, como glicocorticóides, azatioprina, metotrexato, inibidores da calcineurina, micofenolato de mofetil e ciclofosfamida são os principais medicamentos utilizados (FANOURLAKIS *et al.*, 2021). Durante as últimas décadas, os estudos sobre a fisiopatologia do LES estão evoluindo e elucidando ainda mais as vias envolvidas na doença, o que tem levado à identificação de novas possibilidades terapêuticas e incentivado novos ensaios clínicos (TSANG-A-SJOE; BULTINK, 2021). Dentre as novas ferramentas terapêuticas

destacam-se: o belimumabe, um anticorpo monoclonal contra Blys aprovado para tratamento de LES; o anifrolumabe, anticorpo monoclonal contra INF já aprovado pelo *US Food and Drug Administration* (FDA); e o rituximabe, que também é um anticorpo monoclonal que depleta células B e tem mostrado, em estudos observacionais, benefício no tratamento de lúpus refratário (RAMOS-CASALS *et al.*, 2009). A combinação de terapia tem tornado os tratamentos mais promissores e com bom perfil de segurança para o paciente lúpico (ZUCCHI *et al.*, 2022).

O LES é uma doença bastante heterogênea, e o diagnóstico é um desafio, principalmente nos estágios iniciais. Os critérios diagnósticos e exames sorológicos disponíveis propiciam a realização de mais diagnósticos (BERTSIAS *et al.*, 2013). Além disso, o tratamento também evoluiu, com novas drogas como biológicos e novos protocolos que estão sendo utilizados (TSANG-A-SJOE; BULTINK, 2021). Como consequência, o prognóstico dos pacientes com LES tem melhorado durante as últimas décadas, prolongando a expectativa de vida dos mesmos, e a DCV tornou-se a principal causa de óbito pela doença (BJÖRNÅDAL *et al.*, 2004).

4.2 Risco cardiovascular e Lúpus Eritematoso Sistêmico

O LES é associado com aterosclerose acelerada (ANDRADES *et al.*, 2017) e tem 5 a 10 vezes risco aumentado de DCV quando comparado com pessoas saudáveis da mesma idade e sexo (MANZI *et al.*, 1997). Mulheres com LES entre 35 e 44 anos têm 52 vezes mais chance de infarto agudo do miocárdio do que aquelas sem LES da mesma faixa etária, de acordo com o importante estudo *Framingham Offspring* (MANZI *et al.*, 1997). Essa associação não é explicada totalmente pelos fatores de risco tradicionais, como HAS, DM, obesidade e dislipidemia (BRUCE, 2005), que são aumentados no LES (MEDEIROS *et al.*, 2016). Fatores adicionais, como autoanticorpos, inflamação sistêmica, lesão endotelial pela doença autoimune e alteração da função renal ou doença renal em estágio final, têm sido sugeridos com função importante na patogênese da aterosclerose prematura do LES (WESTERWEEL *et al.*, 2007). McMahon e colaboradores têm demonstrado a existência de uma subpopulação de HDL pró-inflamatório em pacientes com LES que promove a aterosclerose (MCMAHON *et al.*, 2009). Em um estudo do mesmo grupo, foi encontrado aumento de leptina em pacientes com LES na placa da carótida. Foi observada, também, associação entre os níveis de leptina e os lipídios inflamatórios HDL, Lp(a) e OxPL/apoB100, evidenciando um elo entre o sistema imune, o metabolismo e a aterosclerose (MCMAHON *et al.*, 2011).

Em 2002, foi evidenciado que pacientes com LES apresentam disfunção endotelial, mesmo na ausência de fatores de risco tradicionais, e essa disfunção não apresentava associação com tempo de doença, dose cumulativa de prednisona, uso de antimalárico, anticorpos anticardiolipina, HAS, fenômeno de Raynaud, escore de atividade de doença ou presença de vasculite (LIMA *et al.*, 2002). Sella e colaboradores encontraram alterações em cintilografia miocárdica em 28% de 82 pacientes entre 18 e 55 anos, com LES e que eram assintomáticos do ponto de vista cardiovascular (SELLA *et al.*, 2003).

Como exposto acima, todas as evidências demonstram a existência de aterosclerose subclínica e alto RCV. Apesar disso, os tradicionais fatores de risco, como idade, HAS, DM e tabagismo, que são monitorados nas ferramentas para cálculo de RCV, falham em prever eventos cardiovasculares no LES (ESDAILE *et al.*, 2001). O LES é reconhecido como um fator independente de risco para doença cardiovascular (ZELLER; APPENZELLER, 2008). Os modelos tradicionais, como os escores de Framingham, *Systematic Coronary Risk Evaluation* (SCORE) e o escore global de risco cardiovascular da Sociedade Americana de Cardiologia, não contemplam as doenças reumáticas imunomediadas (SIVAKUMARAN *et al.*, 2021). As escalas de risco subestimam o RCV em pacientes com LES. Uma grande proporção de pacientes com LES poderia ser reclassificada como alto risco usando fórmula que incorporasse LES como parâmetro (BOULOS *et al.*, 2017).

Em 2016, Urowitz e colaboradores demonstraram que o Framingham modificado, em que cada item é multiplicado por 2, prediz mais acuradamente doença cardiovascular em pacientes com LES (UROWITZ *et al.*, 2016). Recentemente, o QRISK3 incorporou o LES no seu modelo de risco. Ele examina os mesmos fatores do QRISK2 (com idade, sexo, etnia, tabagismo, DM, história familiar de DCV, doença renal crônica, fibrilação atrial, tratamento para HAS, artrite reumatoide, HDL, colesterol total, pressão sistólica sanguínea, peso e altura) e acrescenta enxaqueca, LES, doença mental severa, uso de antipsicótico, uso de corticoide, HIV/AIDS, diagnóstico e tratamento de disfunção erétil (HIPPISEY-COX; COUPLAND; BRINDLE, 2017). Apesar de o QRISK3 ser capaz de identificar mais pacientes com risco elevado de doença cardiovascular em 10 anos, em comparação com os escores de Framingham, SCORE e escore global de risco cardiovascular da Sociedade Americana de Cardiologia (BATTISTA *et al.*, 2020), ele não é validado no Brasil.

O ultrassom de carótidas pode ser realizado para estratificação e rastreamento de doença aterosclerótica precoce em pacientes com risco intermediário, permitindo reclassificar esses pacientes para alto RCV; entretanto, é examinador dependente (MASSOM *et al.*, 2020).

A aterosclerose é uma doença inflamatória (ROSS, 1999) e é a causa subjacente mais comum de doença cardíaca, doença arterial coronariana, doença arterial periférica e acidente vascular cerebral (GALLINO *et al.*, 2014). O conceito de que a aterosclerose é uma doença inflamatória ganhou forte respaldo nos estudos da família da pentraxina de proteínas reagentes de fase aguda clássicas, como a PCR. Essa pentraxina pode ser produzida e secretada pelas células em resposta à IL-6. Níveis elevados de PCR foram reconhecidos com o fator de risco independente que poderia prever eventos cardiovasculares (TONG *et al.*, 2007). A inflamação é iniciada pelo acúmulo de LDL, que estimula a resposta autoimune. Há envolvimento do sistema imune inato adaptativo. Como resultado de sinais coestimulatórios e citocinas secretadas pela célula apresentadora de antígeno (APC), fatores de transcrição das células T favorecem a diferenciação dos tipos de linfócitos Th. Quando a expressão de linfócitos Th1 é aumentada, ela tem um efeito pró-aterogênico, com aumento de INF γ e TNF α . As células B também são detectadas nas placas ateroscleróticas, porém em menor quantidade, evidenciando a presença da imunidade humoral na aterosclerose (GISTERÅ; HANSSON, 2017; WOLF; LEY, 2019).

Nos últimos anos, está havendo a redescoberta do metabolismo pelos imunologistas e o surgimento de um novo campo, o imunometabolismo, que tem emergido como principal mecanismo para regulação do sistema imune inato e adaptativo (O'NEILL; KISHTON; RATHMELL, 2016; MAKOWSKI; CHAIB; RATHMELL, 2020). Está claro que o metabolismo e o estado imunológico estão ligados de maneira intrínseca. Cada população de células imunes tem um metabolismo e nutriente diferente utilizado. As citocinas e vias de sinalização que guiam diferentes respostas imunes também promovem específicos programas que suportam a bioenergética e a biossíntese. Múltiplos mecanismos de sinalização coordenam-se após as células imunes serem estimuladas para mediar a reprogramação metabólica e as diferenças específicas de cada tipo e subconjunto de células (MAKOWSKI; CHAIB; RATHMELL, 2020).

4.3 Identificação de biomarcadores através da metabolômica

No contexto da imunidade, alterações específicas com vias metabólicas se ligam a funções imunes efetoras, mais notadamente na produção de diferentes tipos de citocinas. Além disso, o estresse oxidativo que ocorre no LES envolve várias vias importantes, com a liberação de enzimas proteolíticas e intermediários reativos para o processo imunológico e inflamatório (BENGTSSON *et al.*, 2016). Existem seis principais vias metabólicas, que são: a glicolítica, o ciclo de Krebs, a fosfato pentose, a oxidação de ácido graxo, a síntese de ácido graxo e a via de

aminoácidos. Cada uma dessas vias tem um propósito único na célula e é regulada por vias de sinalização celular para ligar a atividade às suas necessidades celulares (O'NEILL; KISHTON; RATHMELL, 2016).

A metabolômica inclui a detecção e a quantificação de moléculas de baixo peso molecular (metabólitos), que avaliam perturbações do sistema biológico e podem ser usadas como biomarcadores para detectar doenças. Em alguns casos, como alterações metabólicas congênitas, pode ser possível identificar somente um metabólito, mas na maioria dos casos, devido às múltiplas vias enzimáticas, será possível identificar grupos de metabólitos (BENGTSSON *et al.*, 2016).

Os metabólitos podem ser avaliados pela metabolômica através da espectrometria de massa, que pode ser combinada com uma cromatografia preliminar, ou pela espectroscopia com Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Metabolômica de isótopos estáveis e outros ensaios *in vivo* e em tecidos são, agora, cada vez mais acessíveis e permitem diretrizes inovadoras em abordagens atuais para entender o imunometabolismo (MAKOWSKI; CHAIB; RATHMELL, 2020). O perfil metabolômico é uma ferramenta do sistema biológico que mede um grande número de metabólitos com diferentes propriedades bioquímicas. A metaboloma difere do genoma, do transcriptoma e do proteoma. A metaboloma é um *status* biológico: enquanto o genoma define o que pode acontecer, a metaboloma define o que tem acontecido (KOH; KOVALIK, 2021). Eles são influenciados pela exposição ambiental e pelo estado dinâmico da doença (BARBA; ANDRÉS; GARCIA-DORADO, 2019).

As abordagens clínicas atuais são comumente baseadas em moléculas de biomarcadores com uma concentração limite no sangue para o diagnóstico de certas patologias ou para avaliação de risco. Entretanto, é importante reconhecer que existe um *continuum* no perfil metabólito entre o estado saudável e os vários níveis de doença. Algumas alterações de metabólitos podem ser identificadas antes de os sintomas clínicos aparecerem (BARBA; ANDRÉS; GARCIA-DORADO, 2019). Essas alterações podem ajudar a identificar doenças precocemente ou auxiliar na predição de *scores* de risco como RCV, principalmente quando o risco é intermediário e há a dúvida em prosseguir a investigação com exames mais invasivos, arriscados e caros.

Existem poucos estudos com metabolômica e risco cardiovascular em pacientes com LES. Há um estudo, no Reino Unido, em que a metabolômica foi avaliada com uma plataforma focando nas lipoproteínas e na sua associação com aterosclerose subclínica (COELEWIJ *et al.*, 2021). Em outro estudo, foram avaliados por metabolômica os metabólitos das homocisteínas intra e extracelular, que foram associadas à lesão vascular (STOJAN *et al.*, 2021). Foram

avaliações mais direcionadas e não amplas da metabolômica, focando em determinados metabólitos, o que poderia ter prejudicado o encontro de outros metabólitos importantes.

5 METODOLOGIA

5.1 Tipo de estudo e amostra

Trata-se de um estudo observacional e transversal, em que a amostra foi selecionada por conveniência, tendo sido incluídos os pacientes com diagnóstico de LES de acordo com os critérios do Colégio Americano de Reumatologia (ACR 1997) (HOCHBERG, 1997), com idade maior ou igual a 20 anos, acompanhados no Hupaa/Ufal, e que concordaram em participar do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Os controles foram pareados por sexo e idade e foram constituídos por acompanhantes de pacientes do Hupaa e funcionários do hospital. A coleta de dados ocorreu no período de maio de 2021 a outubro de 2022. Foram excluídos do estudo: gestantes; pacientes com evento cardiovascular prévio; paciente com sobreposição com outra doença autoimune.

5.2 Aspectos éticos

Durante as consultas ambulatoriais, os pacientes e seus responsáveis eram convidados a participar, sendo informados quanto aos objetivos e procedimentos da pesquisa, bem como esclarecidos em suas dúvidas. Havendo aceitação, ocorria a leitura e a assinatura do TCLE (apêndice A), estando a proposta de acordo com os princípios constantes na Declaração de Helsinki (1964). Os pacientes eram conduzidos a uma sala para a entrevista.

O estudo aqui apresentado foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Alagoas (Ufal) sob o número do parecer 4.472.515 e Certificado de Apresentação de Apreciação Ética 39956520.2.0000.5013 (anexo A).

5.3 Coleta de dados

5.3.1 Dados clínicos e sociodemográficos

Os indivíduos incluídos na pesquisa foram submetidos a uma entrevista estruturada, complementada através de informações obtidas a partir do prontuário do paciente (apêndice B), onde foram coletados dados sociodemográficos (nome, idade, sexo, escolaridade e procedência) e clínicos (uso de medicamentos, atividade de doença, tempo de doença, dano orgânico cumulativo, comorbidades). Foi também realizado o exame físico completo, com as medidas da pressão arterial, altura, peso e IMC.

Para medir aspectos relacionados à atividade do LES, foi utilizado o escore SLEDAI-2k modificado (apêndice C) sem critérios sorológicos (antiDNA e C4), cuja pontuação varia de zero a 101. Esse instrumento abrange vinte e dois itens, sendo dezesseis itens sobre

manifestações clínicas e os demais sobre variáveis laboratoriais (URIBE *et al.*, 2004). Para avaliar atividade de doença, o SLEDAI foi considerado como uma variável dicotômica em que se estabeleceu como doença ativa escores maiores ou iguais a 4 (TOUMA *et al.*, 2011).

Para avaliar dano orgânico, foi utilizado o SLICC (apêndice D), que é a ferramenta validada para avaliar dano permanente. O SLICC contém itens que representam, em um paciente lúpico, danos irreversíveis e permanentes que ocorreram em consequência da doença e/ou do seu tratamento (SUTTON; DAVIDSON; BRUCE, 2013). Ele foi utilizado, também, como variável dicotômica, com ou sem dano orgânico, em que a presença de um dano orgânico já era suficiente para tal definição.

Quanto à avaliação das comorbidades, o diagnóstico de hipertensão arterial sistêmica foi feito de acordo com as diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia, e o indivíduo foi considerado hipertenso quando tinha PA sistólica (PAS) maior ou igual a 140 mmHg e/ou PA diastólica (PAD) maior ou igual a 90 mmHg, medida com a técnica correta, em pelo menos duas ocasiões diferentes, na ausência de medicação anti-hipertensiva (BARROSO *et al.*, 2021). A doença DM foi diagnosticada de acordo as diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, com a medida da glicemia plasmática de jejum maior ou igual a 126 em duas medidas (COBAS *et al.*, 2022).

O diagnóstico de obesidade foi procedido através do Índice de Massa Corporal (IMC), calculado pela razão entre a massa corporal em quilogramas e a altura em metros ao quadrado, e é um dos índices de peso relativo mais comumente utilizados em estudos. O paciente foi classificado como obeso quando teve IMC maior ou igual 30 kg/m^2 (FRANKENFIELD *et al.*, 2001).

5.3.2 Exames laboratoriais

Os indivíduos participantes do estudo foram orientados previamente a fazerem jejum de 12 horas e, no dia da coleta, encaminhados para o laboratório de análises clínicas do Hupaa, onde eram coletados e analisados os exames bioquímicos (TGO, TGP, fosfatase alcalina, GGT, colesterol total, HDL, LDL, glicemia jejum, ureia, creatinina), hemograma, Proteína C reativa, dosagem de complementos, sumário de urina e proteinúria 24 horas.

Uma amostra em tubo seco foi enviada para o Laboratório do Instituto de Química e Biotecnologia da Ufal, com o qual foi feita a parceria para a análise metabólica.

5.3.3 Avaliação do risco cardiovascular

O RCV foi realizado através do *Score* de Framingham (FRS) (WILSON *et al.*, 1998), que avalia as variáveis idade, sexo, pressão arterial sistólica, diagnóstico de HAS, DM, tabagismo, colesterol total e HDL. Para os pacientes com LES, foi utilizado o FRS modificado, que multiplica o padrão por 2 para melhorar a acurácia do exame, uma vez que este subestima o risco cardiovascular no paciente com LES. Urowitz e colaboradores testaram diferentes fatores de multiplicação (1,5, 2, 3 e 4), e sua análise confirmou que o fator 2 forneceu a mais apropriada classificação de moderado/alto risco cardiovascular com suficiente sensibilidade e especificidade, que foi confirmada com a melhora da acurácia (UROWITZ *et al.*, 2016). Para o grupo controle não foi utilizado fator de multiplicação. Os pacientes com LES e controles foram classificados como baixo risco FRS <10%, intermediário FRS 10-19% e alto risco FRS \geq 20%.

5.3.4 Análise metabólica

Foi realizada através de Ressonância Nuclear Magnética (RNM), com a triagem das vias de todos os metabólitos, e, ao surgir a via mais prevalente, esta foi avaliada para uso na análise estatística.

Para análise de RNM, a amostra de plasma (500 μ L) foi centrifugada a 14.000 rpm por 15 min a 4°C e 350 μ L, e pipetada para um tubo de NMR (5 mm) com 350 μ L de tampão fosfato (contendo ácido trimetilsililpropionico-d4 sal de sódio 0,1 mM em D2O).

Os espectros de RMN foram adquiridos utilizando um espectrômetro Bruker 600 MHz Ascend (Bruker BioSpin, Alemanha), operando a 600,13 MHz e equipado com sonda PABBO 600S3 BBF-H-D-05 Z SP. Antes de iniciar os experimentos, o espectrômetro de RMN foi calibrado diariamente, seguindo rigorosos procedimentos de operação padrão para garantir a mais alta qualidade espectral e reprodutibilidade preparada, de acordo com o procedimento padrão. Todas as manhãs, a amostra de referência padrão de RMN (sonda de 5 mm) metanol-d4 (MeOD) e sacarose 2 mM foi adquirida para verificar as condições ideais do espectrômetro. Primeiro, uma temperatura estável na sonda de RMN foi verificada para evitar variações de deslocamentos químicos, especialmente o pico de água para supressão de água. Para isso, um tubo selado de calibração contendo uma amostra padrão MeOD 99,8% foi usado para garantir que as amostras de plasma fossem executadas a 310K. A estabilidade da temperatura ao longo do tempo na sonda de RMN foi controlada com o comando "*edte*". O segundo tubo de calibração foi uma amostra de sacarose para otimizar a supressão de água e a sensibilidade do espectrômetro. Uma sintonia e correspondência automáticas foram realizadas, bloqueadas (90%H₂O+10%D₂O₂_salt) e automaticamente ajustadas (topshim 3D 1H ordmax=8). Os

espectros de ^1H NMR foram registrados usando a sequência de pulso Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) com pré-saturação de água (programa de pulso: `cpmgpr1d`), implementando um filtro T2 para suprimir os amplos sinais de proteínas e outras macromoléculas. Essa sequência de RMN permite a detecção seletiva de sinais provenientes apenas de metabólitos de baixo peso molecular. Para todos os experimentos, 128 varreduras foram registradas após 16 varreduras fictícias, 64k pontos de dados, uma largura espectral de 20,0290 ppm, atraso de relaxamento de 4s, tempo de aquisição de 2,73s e alargamento de linha de 0,3Hz. Antes de aplicar a transformada de Fourier, os decaimentos de indução livres foram multiplicados por uma função exponencial equivalente a um fator de alargamento de linha de 0,3Hz. O processamento espectral foi realizado automaticamente, corrigindo fase e linha de base, e calibrado para o TSP em δ 0,00 ppm, utilizando TopSpin 3.5 (Bruker BioSpin). Os espectros unidimensionais identificam os picos usando The Human Metabolome Database (HMDB) Versão 4.0 e o ChenomX NMR Suite (Chenomx Inc., Edmonton, Canadá).

5.3.5 Análise de dados

Os dados obtidos após coleta foram digitados em planilha no programa Microsoft Excel® 2013. Foi utilizado o software JASP® versão 0.16.1. O teste de Shapiro-Wilk determinou a normalidade da distribuição das variáveis numéricas. Os dados foram descritos como frequência para variáveis categóricas e média \pm SD para variáveis contínuas.

Os conjuntos de dados espectrais foram analisados usando a plataforma online MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>) (CHONG; WISHART; XIA, 2019). Inicialmente, foi realizada a análise não supervisionada (PCA), no intuito de se obter uma perspectiva preliminar dos dados e facilitar uma visão geral de ambos os grupos (LES, controles; LES com intermediário/alto RCV e baixo RCV) por meio dos componentes principais (PC1 vs. PC2), revelar tendências e potenciais *outliers*, bem como fornecer uma visão sobre os pesos das variáveis em cada componente. O mapa de calor foi construído utilizando um método de agrupamento euclidiano. O formalismo OPLS-DA foi realizado para avaliar a capacidade dos dados metabolômicos de distinguir os grupos analisados. A região de confiança foi de 95%, e 2000 permutações foram realizadas para avaliar o modelo. Os metabólitos importantes foram selecionados pelo limiar do VIP baseado no gráfico VIP (gráfico de importância variável) $\geq 1,5$.

6 PRODUTO (Segundo as normas da “LUPUS na international jornal”)

Systemic lupus erythematosus and cardiovascular risk: a study of metabolomic profile in
brazilian patients

Vanessa Miranda Pereira Fausto¹, Jeferson Santana Ursulino², Larissa da Silva Pinto³, Jaciel
de Oliveira Clementino⁴, Patrícia Lúcia Silva Sampaio Leite⁵, Thiago Sotero Fragoso⁶

¹ Master's student in Medical Sciences, Faculty of Medicine, Federal University of Alagoas, Brazil.

<https://orcid.org/0000-0001-9913-2684>

² Nucleus of Analysis and Research in Nuclear Magnetic Resonance - NAPRMN, Institute of Chemistry and
Biotechnology, Federal University of Alagoas, Maceió, Brazil <https://orcid.org/0000-0002-6292-4546>

³ MD; Rheumatology division; Professor Alberto Antunes Hospital, Federal University of Alagoas, Brazil.
<https://orcid.org/0000-0001-8987-9565>

⁴ Nurse; Professor Alberto Antunes Hospital; Federal University of Alagoas, Brazil. <https://orcid.org/0000-0002-8293-2930>

⁵ Graduate student in medicine, Faculty of Medicine, Federal University of Alagoas, Brazil.
<https://orcid.org/0000-0001-5534-0203>

⁶ PhD; Rheumatology division; Faculty of Medicine; Federal University of Alagoas, Brazil.
<https://orcid.org/0000-0002-0192-0760>

Corresponding author: Thiago Sotero Fragoso.

E-mail: thiago.reumato@gmail.com

Abstract

Background: Systemic Lupus Erythematosus is a chronic and inflammatory autoimmune disease with atherosclerosis accelerate. Metabolomics is a relatively new field in autoimmunity that could be applied in the discovery of novel biomarkers for SLE and its comorbidities and

providing key insights into SLE pathophysiology and events before the traditional exams and onset of the clinic symptoms. **Methods:** This was a cross-sectional study, where we analyzed the profile of plasma metabolites in SLE and compare them with controls by proton nuclear magnetic resonance ($^1\text{H NMR}$) and compare the metabolites of SLE with high/intermediary and low cardiovascular risk (CVR). **Results:** The result of OPLS-DA (Orthogonal Partial Least-Squares Discriminant Analysis) revealed clear separation between SLE and control groups, showing excellent performance demonstrated by permutation test. Important metabolites for discriminating between the groups, were selected for by the VIP-plot (Variable Importance Plot) based on VIP threshold ≥ 1.5 . Glutathione, tyrosine, phenylalanine, alanine, m-histidine, glutamine and histamine were increased in plasma of SLE patients compared to controls, but we did not distinguish high/intermediary from low CVR subgroups by OPLS-DA model. **Conclusion:** The increased level of amino acids probably occurred in response to immunologic alterations linked to oxidative stress. More longitudinal research with large sample size in different populations are necessary.

Keywords: Systemic Lupus Erythematosus; metabolomics; cardiovascular risk.

Introduction

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is a complex and heterogeneous autoimmune disease with chronic inflammation and damaged of almost organ or system.¹ The prognostic of SLE has been modified in the last decades with early detection and treatment improvement. So, the patients have experimented the consequences of an inflammatory and chronic disease, and, because of the atherosclerosis accelerate, the cardiovascular diseases have become the main cause of mortality.^{2,3} Thus, it is important to detect the high cardiovascular risk (CVR) individuals to prevent premature deaths in SLE.

In the last years is coming a rediscovery of immunometabolism, where each immune cell has its own metabolism.^{4,5} Metabolomics is the analysis of concentration profiles of low molecular weight metabolites present in biological fluids, which is a relatively new field including autoimmunity.^{6,7} One important application could be the discovery of novel biomarkers for SLE and its comorbidities. In addition, with the ability to measure changes in circulating and tissue concentrations of metabolites, metabolomics can provide key insights into SLE pathophysiology and events before the traditional exams and onset of the clinic symptoms. So, the better understanding of metabolic profile of SLE patients could be applied in the clinical field, with development of new diagnostic methods and treatments, improvement of patient's follow-up and early identification of comorbidities, such as cardiovascular diseases.

Therefore, the aim of this study was to analyze the profile of plasma metabolites in SLE patients and compare them with controls without systemic autoimmune diseases by proton nuclear magnetic resonance ($^1\text{H-NMR}$). We also compare the plasma metabolites profile of SLE patients with high/intermediary and low CVR.

Materials and methods

Study design and population

This was a cross-sectional study with patients who fulfilled the classification criteria for SLE made by the American College of Rheumatology (ACR) from May 2021 to October 2022.⁸ A consecutive sample of seventy-nine (79) patients aged over 20 years old was included from the Lupus Outpatient Clinic at the Professor Alberto Antunes University Hospital (HUPAA), Federal University of Alagoas (UFAL), Brazil. This SLE outpatient clinic is a reference unit for lupus care in the state of Alagoas, northeast of Brazil. It was not included pregnant or patients with another immune rheumatic disease. The Control group was composed for individuals matched for age and genre and without autoimmune or inflammatory chronic diseases.

Ethical aspects and procedures

This study was approved by local Ethics Committee for Research of the Federal University of Alagoas (No. 4.472.515; CAAE: 39956520.2.0000.5013) and complied with the Helsinki Declaration. Written informed consent was obtained from each participant.

Clinical and sociodemographic data

Sociodemographic information, life habits, clinical aspects/disease characteristics and organ or system involvement data were obtained from electronic medical records and clinical consultation. We evaluated the following clinical aspects: medication, comorbidities (obesity, systemic arterial hypertension, diabetes mellitus and dyslipidemia), cardiovascular risk, disease activity and organ damage.

We considered the individuals with systolic blood pressure ≥ 140 mmHg and/or diastolic pressure ≥ 90 mmHg, or treatment;⁹ diabetes mellitus when the fasting blood glucose was ≥ 126 mg/dl in two measurements or treatment;¹⁰ and dyslipidemia the fasting blood cholesterol was ≥ 190 mg/ dl , LDL ≥ 130 mg/dl and triglycerides was ≥ 150 mg dl or treatment.¹¹ Individuals with BMI (weigh/ height square) ≥ 30 kg/m² were classified as obesity.¹²

To identify cardiovascular risk, we used the Framingham Score (FRS) which utilizes the variables age, gender, systolic blood pressure, diagnosis of systemic hypertension, diabetes mellitus, smoking, total cholesterol and HDL. For patients with SLE, the modified FRS was used, which multiplies by 2 to improve the accuracy of the score.¹³ We classified as low-risk FRS < 10 %, intermediate FRS 10 – 19 %, and high risk FRS \geq 20 %.¹⁴

The Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI), in its 2K modified version, was used to assess disease activity.¹⁵ We consider active SLE when SLEDAI-2K \geq 4.¹⁶ The Systemic Lupus International Collaborating Clinics/ American College of Rheumatology – Damage Index (SLICC-ACR) was performed to verify organ damage. It was considered irreversible organ damage when SLICC \geq 1.¹⁷

Laboratorial tests and plasma samples preparation

Two blood samples were obtained from a peripheral venous access after 12 hours fast for biochemical and metabolomics analysis, in the same day of clinical data collection. The samples were collected in tubes with EDTA-K3 6 mL, 13x100 mm (FL5-1306M) and the plasma was separated by centrifugation at 1400 rpm for 10 min and was stored at -80°C until metabolomics analysis was performed. The serum was also separated by centrifugation and the biochemical tests were performed in the same day with analytical procedures Blood glucose was determined using a bedside glucose analyzer (glucose-oxidase method; YSI, Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, OH) and all other blood parameters on an ADVIA 1800 clinical chemistry system (Siemens Healthcare systems, Erlangen, Germany).

Plasma measurements NMR

The plasma samples (1500 μ L) were centrifuged at 14.000 rpm for 15 min, and 350 μ L pipetted to an NMR tube (5 mm) with 350 μ L phosphate buffer (containing trimethylsilylpropionic acid-d4 sodium salt, TSP 0.1 mM, and 100% D₂O).

NMR spectral were acquired using a Bruker 600 MHz spectrometer Ascend (Bruker BioSpin, Germany) operating at 600.13 MHz and equipped with probe PA BBO 600S3 BBF-H-D-05 Z SP. ¹H NMR spectra were recorded using pulse sequence Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) with water presaturation (pulse program: cpmgpr1d), implementing a T2 filter to suppress the broad signals of proteins and other macromolecules. This NMR sequence allows the selective detection of signals arising only from low molecular weight metabolites. For all experiments, 128 scans were recorded after 16 dummy scans, 64k data points, a spectral width of 20.0290 ppm, relaxation delay of 4 s, 2.73 s acquisition time. The processing spectral was

realized automatically correcting phase and baseline and calibrated to the TSP at δ 0.00 ppm, using TopSpin 3.6.5 (Bruker BioSpin). The one-dimensional spectra identified the peaks using The Human Metabolome Database (HMDB) Version 5.0, and the ChenomX NMR Suite (Chenomx Inc., Edmonton, Canada).

Processing data and statistical analysis

Shapiro-Wilk test was used to determine the normality of the distribution of numeric variables. All of them were normally or approximately normally distributed. Data were described as number (frequency) for categorical variables and mean \pm SD for continuous variables.

Statistical analysis of the metabolic was performed using R software version 4.1.0 (<http://cran.rproject.org/>) with R packages mrbin (version 1.6.5), ggplot2 (version 3.4.0), and online platformed MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>).

In we data metabolomics, all metabolites were normalized by a median to minimize the effect of different concentrations. Unsupervised heatmap was used as the first exploratory analysis to obtain a preliminary data outlook and facilitate a general overview of both groups, thus heatmap built using a distance measure Euclidean clustering method. The statistical method used was supervised analysis using Orthogonal Partial Least Squares-Discriminant Analysis (OPLS-DA). OPLS-DA is a multivariate statistical method that is commonly used to analyze complex data sets, such as metabolomics data. This supervised method aims to find a model that can separate the samples into groups based on the variables (metabolites) that are most important in distinguishing the groups. In this study, OPLS-DA was used to identify the metabolites that were differentially abundant between the experimental groups, allowing the key metabolites responsible for the observed differences in the metabolic profiles to be identified. The model performance was showed by permutation test ($n = 2000$).

The Variable Importance in the Projection (VIP) plot is a statistical method used to rank the variables (metabolites) in the OPLS-DA model based on their importance in discriminating between the two groups. The VIP score measures the contribution of each variable to the model and is calculated by considering both the explained variation of the variable and its covariance with the response variable (experimental group). In the VIP plot, the metabolites are ranked according to their VIP scores, and those with VIP scores greater than 1.5 are considered important for the classification of the groups. To identify the cardiovascular risk effect in the metabolome of different subgroups of SLE patients, a model was built based on intermediary or high CVR subgroups and Low risk.

Results

Clinical characteristics of patients and controls are shown in Table 1.

Table 1 – Clinical data of subjects.

	SLE (N=79)	Controls (N = 45)
Gender , n (%)		
Female	75 (94.94)	43(95.56)
Age (Years) Mean ± DP	38.55 ± 12	37 ± 10.86
Disease duration (Years) Mean ± DP	8.70 ± 6.57	NA
SLICC ≥ 1, n (%)	35 (44.30)	NA
SLEDAI ≥ 4, n (%)	25 (31.65)	NA
Medications, n (%)		
Steroid	41 (51.90)	NA
Hydroxychloroquine	75 (94.94)	NA
Immunobiological	6 (7.59)	NA
Cyclophosphamide	2 (2.53)	NA
Methotrexate	5 (6.33)	NA
Azathioprine	41 (51.90)	NA
Mycophenolato de mofetila	8 (10.12)	NA
Cholecalciferol	23 (20.11)	0
Comorbidities, n (%)		
Hypertension	37 (46.84)	5 (11.11)
Diabetes Mellitus	12 (15.19)	2 (4.45)
Dyslipidemia	29 (36.70)	15 (33.3)
Smoking	6 (7.59)	0
Alcohol consumption	2 (2.53)	0
Obesity	44 (55.70)	10 (22.22)
Cardiovascular risk, n (%)		
Low	58 (73.42)	43 (95.56)

Intermediate/high

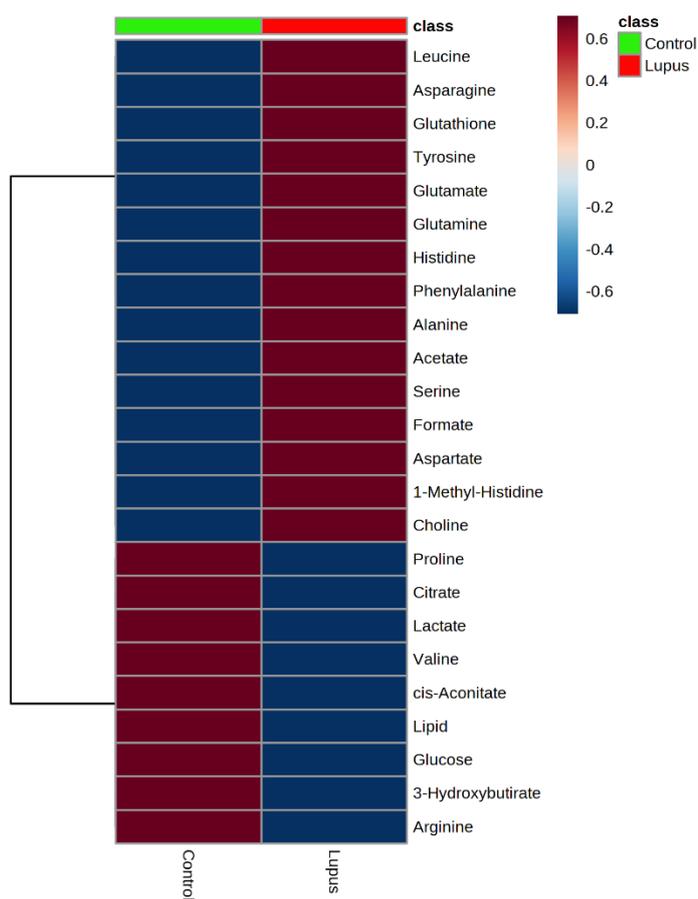
21(26.58)

2 (4.45)

NA = Not applicable, n = number

The heatmap demonstrated one trend and patterns changes in the metabolic profile of SLE and controls. Thus, two clusters of blood metabolites were observed, and two clusters, lupus patients (red) and controls (green).

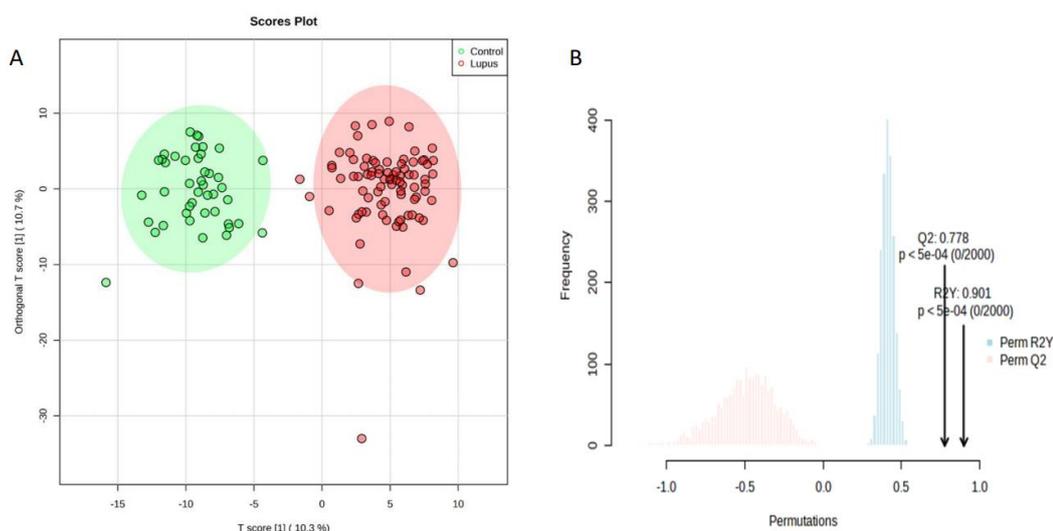
Figure 1 – Cluster heatmap diagram for the Control (green) and Lupus groups (red). For each metabolites cluster, the color corresponds to the expression for each group. Red, upregulated for group; blue, downregulated for group.



The result of analysis supervised showed clear separation, in the model built by OPLS-DA (Figure 2A), between SLE and control groups, and presented excellent performance demonstrated by the 2000 x permutation test (Q2 0.778, R2Y 0.901, and $p < 0.0005$) (Figure 2B). The OPLS-DA model was used to filter out the signals irrelevant to the model

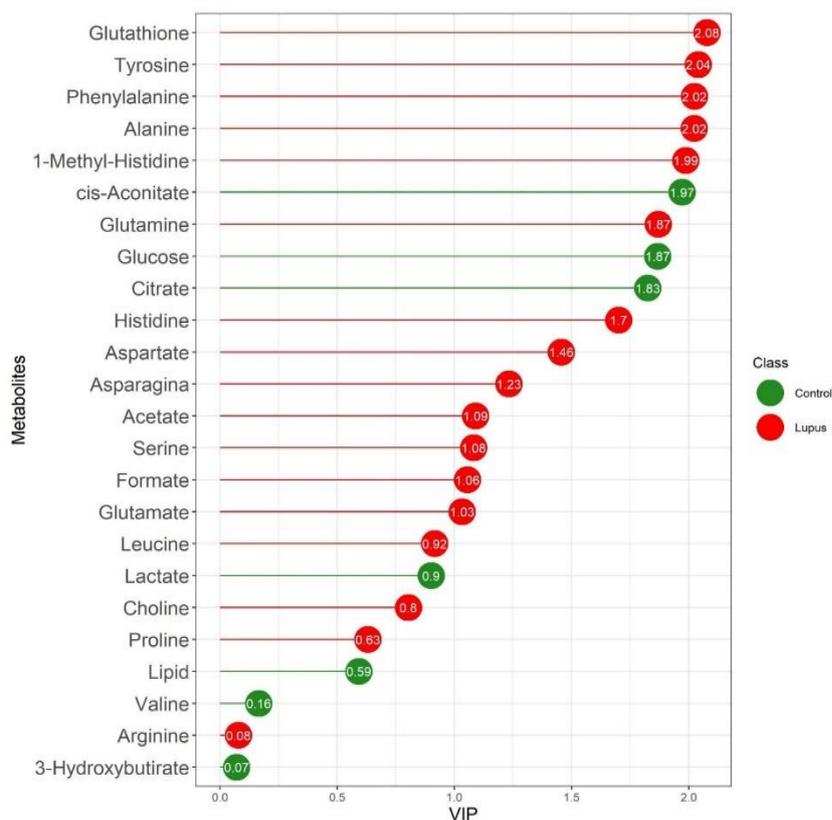
classification and, thus, to reveal the important metabolites. That way, the model ranked the metabolites effectively based on their importance in discriminating between the groups, as shown in the VIP plot.

Figure 2 – Supervised Analysis of the ^1H NMR Spectral Dataset. (A) The OPLS-DA assessment plot between controls (green) and Lupus (red) shows the predictive component and the orthogonal component. (B) 2000x permutation test.



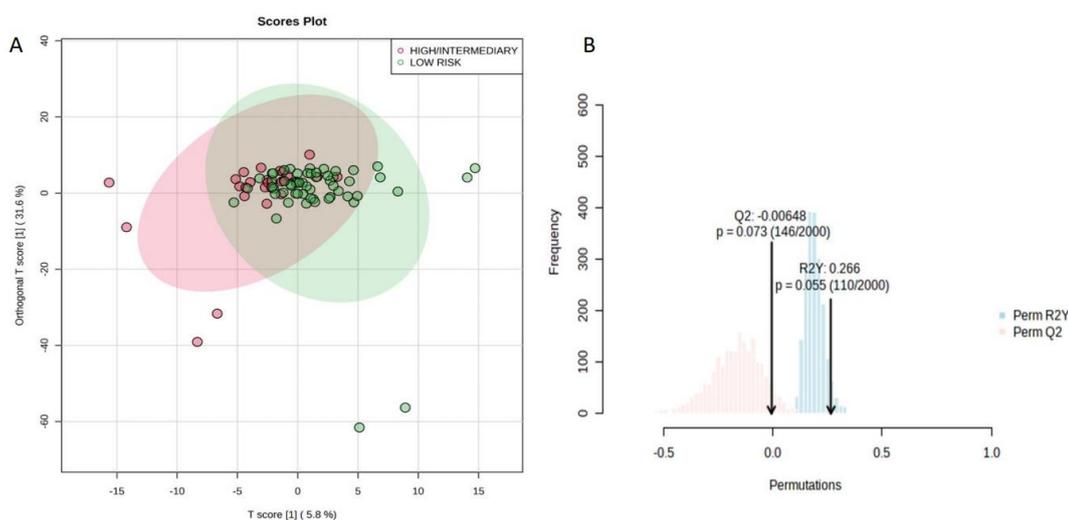
We used the VIP plot to reveal the important metabolites and effectively rank them based on their significance in discriminating between the groups. Metabolites with a VIP score ≥ 1.5 were deemed important for group classification. A total of 7 characteristic metabolites were found to be increased in SLE group.

Figure 3 - Variable Importance in Projection (VIP) plot showing the contribution of each metabolite to the classification of the studied groups. The VIP values were calculated using the OPLS-DA model, and metabolites with VIP values above 1.5 are considered important for the classification.



When we compared two subgroups of SLE patients, high/intermediary and low cardiovascular risk, the results didn't provide clear evidence of the presence of metabolic disturbances. The OPLS-DA formalism wasn't able to separate of the subgroups (Figure 4A), and presenting bad performance demonstrated by the 2000 x permutation test ($Q^2 = 0.00648$ and $p = 0.073$, $R^2Y = 0.266$ and $p = 0.055$), as show figure 4B.

Figure 4 - Supervised Analysis of the ^1H NMR Spectral Dataset. (A) The OPLS-DA assessment plot between low cardiovascular risk (green) and intermediate/high cardiovascular risk (red) shows the predictive component and the orthogonal component. (B) 2000x permutation test.



Discussion

Metabolomics has received increasing attention in recent years because of its assistant role in helping to identify biomarkers. Unfortunately, it has been studied less extensively for use in detecting SLE patients, especially those with high/intermediary cardiovascular risk.^{20,6} This is the first study to evaluate SLE metabolomic profile in Brazilian patients analyzing the six mainly metabolomic pathways in plasma.

We observed different metabolic profile between patients and controls, with increased levels of glutathione (*GSH*), tyrosine (*Tyr*), phenylalanine (*Phe*), alanine (*Ala*), methyl-histidine (*m-His*), glutamine (*Gln*) and histidine (*His*) in SLE group. All of them are included in amino acid pathway. Amino acids display wide-ranging metabolic and regulatory roles, including intracellular protein turnover, gene expression, synthesis and secretion of hormones, nutrient metabolism, oxidative defense, and immune function.²¹

SLE is a chronic inflammation disease that presents mitochondrial dysfunction, oxidative stress, decreased ATP production, increased reactive oxygen intermediates (ROS), activation of mTORC1 and increased glucose flux.^{22,23} These processes are metabolically demanding, requiring not only an increased uptake of nutrients (mostly glucose, fatty acids and *Gln*), but also a switch to specialized metabolic pathways corresponding to specific effector functions.²⁴ In our research all metabolites increased in SLE were amino acids. During their catabolism, the carbon and the amino groups are channeled into separate but interconnected pathways, namely the Krebs cycle and urea cycle, respectively.⁶ Amino acids entering the Krebs cycle may contribute to energy generation, but in humans, the oxidative energy derived from the catabolism of amino acids comprise only a minor fraction.²⁵

Gln is the most abundant amino acid in the blood. The *Gln* is a precursor of glutamate (*Glu*) and during these conversion release ammonium ions. The cytosolic *Glu* then participates in the biosynthesis of *GSH* and not essential amino acids (*Ala*, proline, aspartate, asparagine, and arginine). We found in SLE group higher levels of *GSH* and *Ala* possible originated from glutamine pathway, demonstrating the correlation of these metabolites. Cytosolic *Gln* supports nucleotide biosynthesis, which is essential for rapidly proliferating cells.^{26,27} Glutaminolysis has a vital role in energy production in proliferating cells including T cells, with indispensable roles in the generation of proinflammatory effector T cells Th1 and Th17 cells, that are involved in SLE pathogenesis.²⁸ Apart from glucose, *Gln* is one of the most common energy sources in human cells,²⁹ because *Gln*-derived carbon is an important substrate that supports the Krebs cycle and is so important to maintaining mitochondrial function in human, mainly when there is dysfunction mitochondrial.³⁰ Beyond, the *Gln* produces *GSH* for redox homeostasis, maintaining nitrogen balance, or other functions in immune cells.^{31,32} *Ala* is also important in T cell activation and it is transported through SLC38A1 in CD4+ T cells and TCR stimulation induces its expression.³³

In human *Phe* is an essential amino acid which must be supplied in the dietary proteins. Once in the body, *Phe* may follow any of three paths. It may be (1) incorporated into cellular proteins, (2) converted to phenylpyruvic acid, or (3) converted to *Tyr*. This last can be converted into L-DOPA, which is further converted into dopamine (DA), noradrenaline, and adrenaline.³⁴ The *Tyr* can be converted in melanin. This last reaction necessity of *GSH*.³⁵ The elevated *Phe* levels in SLE patients are indicative of oxidative stress.³⁶ The decomposition of *Tyr* can end up as fumarate or acetoacetate, and both molecules may enter the TCA cycle.³⁴ Beyond, DA is a neuroregulatory and immunoregulatory molecule that has significant effects on cells that are involved in the immune response.³⁷

His is a semi-essential amino acid that exerts anti-inflammatory action through its imidazole ring that scavenges ROS. It serves as a precursor for *His* that is an inflammatory peptide stored in the secretory granules of leucocytes and plays an important role in acute inflammation.^{34,38} Both clinical and preclinical data suggest that *His* has strong anti-oxidative and anti-inflammatory effects.³⁹ Another study has also established the coordination between histidine transporter SLC15A4 and mTOR-dependent inflammatory responses.⁴⁰

Cardiovascular disease is the mainly cause of death in SLE,³ however there are lack of studies for biomarkers that helping identify SLE patients with high cardiovascular risk. We found, in the scientific literature, only one study of metabolomic profile in adult patients with SLE and cardiovascular disease/risk.⁴¹ It evaluated lipidomic profile and atherosclerotic

plaques, but neither cardiovascular risk nor the others metabolic pathways were studied. We observed in SLE group high levels of metabolites that could be implicated in ROS response when compared with controls. ROS is involved in the pathogenesis of both: cardiovascular disease and SLE.⁴² We also verified a high prevalence of individuals with high/intermediary cardiovascular risk than in controls, but we could not discriminate the high/intermediary and low risk cardiovascular groups by the OPLS-DA model. Possibly the sample size was the main determinant for this finding.

When interpreting the results of metabolomics studies, it is important to keep in mind that metabolites are extensively influenced by various coexisting factors other than the disease per se. We did not evaluate the association of metabolites with disease activity, medications, or other environmental factors. For instance, the sample size is relatively small, so it was also challenging for us to classify subgroups according to their clinical data.

Conclusions

We did not distinguish high/intermediary from low CVR subgroups by OPLS model probably because of the limited sample size. Our findings showed clear separation, in the model built by OPLS-DA between SLE and control groups with increased levels of *GSH*, *Tyr*, *Phe*, *Ala*, *m-His*, *Gln* and *His* in plasma of SLE patients. These amino acids probably occurred in response to immunologic alterations linked to mitochondrial dysfunction and oxidative stress. So, metabolites involved in this process should be more studied to become possible biomarkers for SLE diagnostics and its complications.

Our study had some limitations and more longitudinal research with large sample size in different populations are necessary.

References

1. Kaul A, Gordon C, Crow MK, Touma Z, Urowitz MB, Van Vollenhoven R, et al. Systemic lupus erythematosus. *Nat Rev DisPrimers* 2016; 2: 16039.
2. Björnådal L, Yin L, Granath F, Klareskog L, Ekbom A. Cardiovascular disease a hazard despite improved prognosis in patients with systemic lupus erythematosus: results from a Swedish population based study 1964-95. *J Rheumatol*. 2004; 31: 713-719.

3. Andrades C, Fuego C, Manrique-Arija S, Fernández-Nebro A. Management of cardiovascular risk in systemic lupus erythematosus: a systematic review. *Lupus* 2017; 26: 1407-1419.
4. O'Neill LAJ, Kishton RJ, Rathmell J. A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat Rev Immunol.* 2016; 16: 553-565.
5. Makowski L, Chaib M, Rathmell JC. Immunometabolism: from basic mechanisms to translation. *Immunological Reviews* 2020; 295: 5-14.
6. Zhang T, Mohan C. Caution in studying and interpreting the lupus metabolome. *Arthritis Res Ther* 2020; 22: 172.
7. Koh AS, Kovalik JP. Metabolomics and cardiovascular imaging: a combined approach for cardiovascular ageing. *ESC Heart Fail* 2021; 8: 1738-1750.
8. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic Lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997; 40: 1725.
9. Barroso WKS, Rodrigues CIS, Bortolotto LA, et al. Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial – 2020. *Arq. Bras. Cardiol.* 2021; 116: 516-658.
10. Cobas R, Rodacki M, Giacaglia L, et al. Diagnóstico do diabetes e rastreamento do diabetes tipo 2. *Diretriz Oficial da Sociedade Brasileira de Diabetes*, 2022.
11. Faludi AA, Izar MCO, Saraiva JFK, et al. Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose – 2017. *Arq Bras Cardiol.* 2017; 109: 1-76.
12. Frankenfield DC, Rowe WA, Cooney RN, Smith JS, Becker D. Limits of body mass index to detect obesity and predict body composition. *Nutrition* 2001; 17: 26-30.
13. Urowitz MB, Ibañez D, Su J, Gladman DD. Modified Framingham Risk Factor Score for Systemic Lupus Erythematosus. *The Journal of Rheumatology* 2016; 43: 875-879.

14. Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of Coronary Heart Disease Using Risk Factor Categories. *Circulation* 1998; 97: 1837-1847.
15. Uribe AG, Vilá LM, McGwin G Jr, Sanchez ML, Reveille JD, Alarcón GS. The Systemic Lupus Activity Measure-Revised, the Mexican Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI), and a Modified SLEDAI-2K Are Adequate Instruments to Measure Disease Activity in Systemic Lupus Erythematosus. *The Journal of Rheumatology* 2004; 31: 1934-1940.
16. Touma Z, Urowitz MB, Ibañez D, Gladman DD. SLEDAI-2K 10 days versus SLEDAI-2K 30 days in a longitudinal evaluation. *Lupus* 2011; 20: 67-70.
17. Sutton EJ, Davidson JE, Bruce IN. The Systemic Lupus International Collaborating Clinics (SLICC) damage index: a systematic literature review. *Semin Arthritis Rheum.* 2013; 43: 352-361.
18. Findeisen M, Brand T, Berger S. A ¹H-NMR thermometer suitable for cryoprobes. *Magn Reson Chem* 2007; 45: 175-178.
19. Bruzzone C. SARS-CoV-2 Infection Dysregulates the Metabolomic and Lipidomic Profiles of Serum. *iScience* 2020; 23: 101645.
20. Barba I, Andrés M, Garcia-Dorado B. Metabolomics and heart diseases: from basic to clinical approach. *Current Medicinal Chemistry* 2019; 26: 46-59.
21. Wu G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids* 2009; 37: 1-17.
22. Gergely P Jr, Grossman C, Niland B, et al. Mitochondrial hyperpolarization and ATP depletion in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2002; 46: 175-90.
23. Zhao L, Hu X, Xiao F, Zhang X, Zhao L, Wang M. Mitochondrial impairment and repair in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Front Immunol.* 2022; 25: 929520.

24. Kono M, Yoshida N, Tsokos GC. Amino Acid Metabolism in Lupus. *Front Immunol.* 2021; 22: 623844.
25. Cox MM, Nelson DL. Amino acid oxidation and the production of urea. In: Cox MM, Nelson DL. *Lehninger principles of biochemistry*. New York, 2013, 695-730.
26. Tong X, Zhao F, Thompson CB. The molecular determinants of de novo nucleotide biosynthesis in cancer cells. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2009; 19: 32-37.
27. Yoo HC, Yu YC, Sung Y, Han JM. Glutamine reliance in cell metabolism. *Exp Mol Med.* 2020; 52: 1496-1516.
28. Lee HT, Lin CS, Pan SC, et al. Alterations of oxygen consumption and extracellular acidification rates by glutamine in PBMCs of SLE patients. *Mitochondrion* 2019; 44: 65-74.
29. DeBerardinis R, Cheng T. Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene* 2010; 29: 313–324.
30. Cheng S, Rhee EP, Larson MG, et al. Metabolite profiling identifies pathways associated with metabolic risk in humans. *Circulation* 2012; 125: 2222-2231.
31. Shah D, Sah S, Nath SK. Interaction between glutathione and apoptosis in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev.* 2013; 12: 741-51.
32. Murata Y, Shimamura T, Hamuro J. The polarization of T(h)1/T(h)2 balance is dependent on the intracellular thiol redox status of macrophages due to the distinctive cytokine production. *Int Immunol.* 2002; 14: 201–212.
33. Wang W, Zou W. Amino Acids and Their Transporters in T Cell Immunity and Cancer Therapy. *Mol Cell.* 2020; 80: 384-395.
34. Matthews DE. An overview of phenylalanine and tyrosine kinetics in humans. *J Nutr.* 2007; 137: 1549S-1555S.

35. D'Mello SA, Finlay GJ, Baguley BC, Askarian-Amiri ME. Signaling Pathways in Melanogenesis. *Int J Mol Sci.* 2016; 17: 1144.
36. Kumar U, Mehta P, Kumar S, et al. Circulatory histidine levels as predictive indicators of disease activity in takayasu arteritis. *Analytical Science Advances* 2021; 2: 527-535.
37. Arreola R, Alvarez-Herrera S, Pérez-Sánchez G, et al. Immunomodulatory effects mediated by dopamine. *J Immunol Res.* 2016; 2016: 3160486.
38. Holeček M. Histidine in health and disease: metabolism, physiological importance, and use as a supplement. *Nutrients* 2020; 12: 848.
39. Hasegawa S, Ichiyama T, Sonaka I, et al. Cysteine, histidine and glycine exhibit anti-inflammatory effects in human coronary arterial endothelial cells. *Clin Exp Immunol.* 2012; 167: 269-274.
40. Kobayashi T, Shimabukuro-Demoto S, Yoshida-Sugitani R, et al. The histidine transporter SLC15A4 coordinates mTOR-dependent inflammatory responses and pathogenic antibody production. *Immunity* 2014; 41: 375-388.
41. Coelewijn L, Waddington KE, Robinson GA, et al. Serum metabolomic signatures can predict sub-clinical atherosclerosis in patients with SLE. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2021; 41: 1446-1458.
42. Senoner T, Dichtl W. Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases: Still a Therapeutic Target? *Nutrients* 2019; 11: 2090.

7 CONCLUSÕES

- Os modelos metabolômicos criados não foram capazes de discriminar o grupo de LES com intermediário/alto RCV do grupo com baixo RCV, porém foi capaz de discriminar pacientes com LES dos controles;
- Foi verificado que os indivíduos com LES apresentaram alterações na via metabólica dos aminoácidos em relação ao grupo controle, com níveis plasmáticos aumentados de: *GSH, Tyr, Phe, Ala, m-His, Gln e His*.
- Os pacientes com LES apresentaram maior prevalência de RCV intermediário e alto em relação ao controle, conforme o esperado, porém esse subgrupo para análise metabolômica foi pequeno, o que, provavelmente, influenciou nos resultados do modelo metabolômico.

8 LIMITAÇÕES

Ao interpretar os resultados dos estudos de metabolômica, é importante ter em mente que os metabólitos são amplamente influenciados por vários fatores coexistentes além da doença em si. Não avaliamos a associação de metabólitos com atividade da doença, medicamentos ou outros fatores ambientais. Além disso, trata-se de um estudo transversal com tamanho da amostra relativamente pequeno, então também foi um desafio classificar os subgrupos de acordo com seus dados clínicos, sobretudo o RCV.

REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, R. *et al.* Complete complement deficiency in a large cohort of familial systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 19, n. 1, p. 52-57, jan. 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19910391/>. Acesso em: 13 fev. 2023.
- ALARCÓN-SEGOVIA, D. *et al.* Familial aggregation of systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and other autoimmune diseases in 1177 lupus patients from the GLADEL cohort. **Arthritis Rheum**, v. 52, n. 4, p. 1138-1147, abr. 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15818688/>. Acesso em: 13 fev. 2023.
- ANDRADES, C. *et al.* Management of cardiovascular risk in systemic lupus erythematosus: a systematic review. **Lupus**, London, v. 26, n. 13, p. 1407-1419, nov. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28457197/>. Acesso em: 16 nov. 2022.
- ARINGER, M. *et al.* 2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology classification criteria for systemic lupus erythematosus. **Ann Rheum Dis**, v. 78, n. 9, p. 1151-1159, set. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31383717/>. Acesso em: 13 fev. 2023.
- BARBA, I.; ANDRÉS, M.; GARCIA-DORADO, B. Metabolomics and heart diseases: from basic to clinical approach. **Current Medicinal Chemistry**, Cambridge, v. 26, n. 1, p. 46-59, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28990507/>. Acesso em: 16 nov. 2022.
- BARROSO, W. K. S. *et al.* Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial – 2020. **Arq. Bras. Cardiol.**, Rio de Janeiro, v. 116, n. 3, p. 516-658, 2021. Disponível em: <https://abccardiol.org/article/diretrizes-brasileiras-de-hipertensao-arterial-2020/>. Acesso em: 16 nov. 2022.
- BATTISTA, M. *et al.* Framingham, ACC/AHA or QRISK3: which is the best in systemic lupus erythematosus cardiovascular risk estimation? **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 38, n. 4, p. 602-608, jul./ago. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31694741/>. Acesso em: 16 nov. 2022.
- BENGTSSON, A. A. *et al.* Metabolic Profiling of Systemic Lupus Erythematosus and Comparison with Primary Sjögren's Syndrome and Systemic Sclerosis. **PLoS One**, v. 11, n. 7, e0159384, jul. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27441838/>. Acesso em: 13 fev. 2023.
- BERTSIAS, G. K. *et al.* Diagnostic criteria for systemic lupus erythematosus: has the time come? **Nat Rev Rheumatol.**, v. 9, n. 11, p. 687-694, nov. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23838616/>. Acesso em: 16 nov. 2022.
- BJÖRNÅDAL, L. *et al.* Cardiovascular disease a hazard despite improved prognosis in patients with systemic lupus erythematosus: results from a Swedish population based study 1964-95. **J Rheumatol.**, v. 31, n. 4, p. 713-719, abr. 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15088296/>. Acesso em: 16 nov. 2022.

BOULOS, D. *et al.* Cardiovascular risk profiles in a lupus cohort: what do different calculators tell us? **Lupus Science & Medicine**, v. 4, n. 1, e000212, jul. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29214035/>. Acesso em: 16 nov. 2022.

BRUCE, I. N. 'Not only...but also': factors that contribute to accelerated atherosclerosis and premature coronary heart disease in systemic lupus erythematosus. **Rheumatology**, v. 44, n. 12, p. 1492-1502, dez. 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16234277/>. Acesso em: 16 nov. 2022.

BUJAK, R. *et al.* Metabolomics for laboratory diagnostics. **J Pharm Biomed Anal.**, v. 113, p. 108-120, set. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25577715/>. Acesso em: 16 nov. 2022.

CASCIOLA-ROSEN, L. A.; ANHALT, G.; ROSEN, A. Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. **J Exp Med.**, v. 179, n. 4, p. 1317-1330, abr. 1994. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7511686/>. Acesso em: 13 fev. 2023.

CERVERA, R. *et al.* Systemic lupus erythematosus: clinical and immunologic patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. The European Working Party on Systemic Lupus Erythematosus. **Medicine (Baltimore)**, v. 72, n. 2, p. 113-124, mar. 1993. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8479324/>. Acesso em: 16 nov. 2022.

CHONG, J.; WISHART, D. S.; XIA, J. Using MetaboAnalyst 4.0 for comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis. **Current Protocols Bioinformatics**, v. 68, n. 1, e86, dez. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31756036/>. Acesso em: 13 fev. 2023.

COBAS, R. *et al.* Diagnóstico do diabetes e rastreamento do diabetes tipo 2. **Diretriz Oficial da Sociedade Brasileira de Diabetes**, 2022. Disponível em: <https://diretriz.diabetes.org.br/diagnostico-e-rastreamento-do-diabetes-tipo-2/>. Acesso em: 16 nov. 2022.

COELEWIJ, L. *et al.* Serum metabolomic signatures can predict sub-clinical atherosclerosis in patients with SLE. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v. 41, n. 4, p. 1446-1458, abr. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33535791/>. Acesso em: 16 nov. 2022.

CROW, Y. J. *et al.* Characterization of human disease phenotypes associated with mutations in TREX1, RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C, SAMHD1, ADAR, and IFIH1. **Am J Med Genet A**, v. 167A, n. 2, p. 296-312, fev. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25604658/>. Acesso em: 13 fev. 2023.

DURCAN, L.; O'DWYER, T.; PETRI, M. Management strategies and future directions for systemic lupus erythematosus in adults. **Lancet**, v. 393, n. 10188, p. 2332-2343, jun. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31180030/>. Acesso em: 13 fev. 2023.

ESDAILE, J. M. *et al.* Traditional Framingham Risk Factors Fail to Fully Account for Accelerated Atherosclerosis in Systemic Lupus Erythematosus. **Arthritis & Rheumatism**, v. 44, n. 10, p. 2331-2337, out. 2001. Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/1529-0131%28200110%2944%3A10%3C2331%3A%3AAID-ART395%3E3.0.CO%3B2-I>. Acesso em: 16 nov. 2022.

FANOURIAKIS, A. *et al.* Update on the diagnosis and management of systemic lupus erythematosus. **Ann Rheum Dis**, v. 80, n. 1, p. 14-25, jan. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33051219/>. Acesso em: 13 fev. 2023.

FRANKENFIELD, D. C. *et al.* Limits of body mass index to detect obesity and predict body composition. **Nutrition**, v. 17, n. 1, p. 26-30, jan. 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11165884/>. Acesso em: 16 nov. 2022.

GALLINO, A. *et al.* Non-coronary atherosclerosis. **Eur Heart J.**, v. 35, n. 17, p. 1112-1119, maio 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24595865/>. Acesso em: 16 nov. 2022.

GARCIA-ROMO, G. S. *et al.* Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. **Sci. Transl. Med.**, v. 3, n. 73, 73ra20, mar. 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21389264/>. Acesso em: 13 fev. 2023.

GISTERÅ, A.; HANSSON, G. The immunology of atherosclerosis. **Nat Rev Nephrol.**, v. 13, n. 6, p. 368-380, jun. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28392564/>. Acesso em: 16 nov. 2022.

HIPPISLEY-COX, J.; COUPLAND, C.; BRINDLE, P. Development and validation of QRISK3 risk prediction algorithms to estimate future risk of cardiovascular disease: prospective cohort study. **BMJ**, Nottingham, v. 357, j2099, 2017. Disponível em: <https://www.bmj.com/content/357/bmj.j2099>. Acesso em: 16 nov. 2022.

HOCHBERG, M. C. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic Lupus erythematosus. **Arthritis Rheum.**, v. 40, n. 9, p. 1725, set. 1997. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9324032/>. Acesso em: 16 nov. 2022.

JOG, N. R.; JAMES, J. A. Epstein Barr Virus and Autoimmune Responses in Systemic Lupus Erythematosus. **Front. Immunol.**, v. 11, e623944, fev. 2021. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.623944/full>. Acesso em: 13 fev. 2023.

KIRIAKIDOU, M. *et al.* Systemic Lupus Erythematosus. **Ann Intern Med.**, v. 159, n. 7, ITC4-1, out. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24081299/>. Acesso em: 16 nov. 2022.

KOH, A. S.; KOVALIK, J.-P. Metabolomics and cardiovascular imaging: a combined approach for cardiovascular ageing. **ESC Heart Fail**, v. 8, n. 3, p. 1738-1750, jun, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8120371/>. Acesso em: 16 nov. 2022.

KUO, C.-F. *et al.* Familial aggregation of systemic lupus erythematosus and coaggregation of autoimmune diseases in affected families. **JAMA Intern Med**, v. 175, n. 9, p. 1518-1526, set. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26193127/>. Acesso em: 13 fev. 2023.

LI, J.; MAY, W.; MCMURRAY, R. W. Pituitary hormones and systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum.**, v. 52, n. 12, p. 3701-3712, dez. 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16320320/>. Acesso em: 13 fev. 2023.

LIMA, D. S. N. *et al.* Brachial endothelial function is impaired in patients with systemic lupus erythematosus. **J Rheumatol.**, v. 29, n. 2, p. 292-297, fev. 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11842823/>. Acesso em: 16 nov. 2022.

LISNEVSKAIA, L.; MURPHY, G.; ISENBERG, D. Systemic lupus erythematosus. **Lancet**, v. 384, n. 9957, p. 1878-1879, 22 nov. 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24881804/>. Acesso em: 16 nov. 2022.

LO, M. S. Monogenic Lupus. **Curr Rheumatol Rep**, v. 18, n. 12, p. 71, dez. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27812953/>. Acesso em: 13 fev. 2023.

MAKOWSKI, L.; CHAIB, M.; RATHMELL, J. C. Immunometabolism: from basic mechanisms to translation. **Immunological Reviews**, v. 295, p. 5-14, abr. 2020. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/imr.12858>. Acesso em: 16 nov. 2022.

MANZI, S. *et al.* L H Kuller Age-specific incidence rates of myocardial infarction and angina in women with systemic lupus erythematosus: comparison with the Framingham Study. **Am J Epidemiol.**, v. 145, n. 5, p. 408-415, mar. 1997. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9048514/>. Acesso em: 16 nov. 2022.

MASSOM, W. *et al.* Cardiovascular risk stratification and appropriate use of statins in patients with systemic lupus erythematosus according to different strategies. **Clin Rheumatol.**, v. 39, n. 2, p. 455-462, fev. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31802350/>. Acesso em: 16 nov. 2022.

MCMAHON, M. *et al.* Dysfunctional Proinflammatory High-Density Lipoproteins Confer Increased Risk of Atherosclerosis in Women With Systemic Lupus Erythematosus. **Arthritis Rheum.**, v. 60, n. 8, p. 2428-2437, ago. 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19644959/>. Acesso em: 16 nov. 2022.

MCMAHON, M. *et al.* High plasma leptin levels confer increased risk of atherosclerosis in women with systemic lupus erythematosus, and are associated with inflammatory oxidised lipids. **Ann Rheum Dis.**, v. 70, n. 9, p. 1619-1624, set. 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21670088/>. Acesso em: 16 nov. 2022.

O'NEILL, L. A. J.; KISHTON, R. J.; RATHMELL, J. A guide to immunometabolism for immunologists. **Nat Rev Immunol.**, v. 16, n. 9, p. 553-565, set. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27396447/>. Acesso em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27396447/>. Acesso em: 16 nov. 2022.

- OCAMPO-PIRAQUIVE, V. *et al.* Mortality in systemic lupus erythematosus: causes, predictors and interventions. **Expert Rev Clin Immunol**, v. 14, n. 12, p. 1043-1053, dez. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30338717/>. Acesso em: 16 nov. 2022.
- PAN, L. *et al.* Immunological pathogenesis and treatment of systemic lupus erythematosus. **World Journal of Pediatrics**, v. 16, n. 1, p. 19-30, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30796732/>. Acesso em: 16 nov. 2022.
- RAMOS-CASALS, M. *et al.* Rituximab in systemic lupus erythematosus: a systematic review of off-label use in 188 cases. **Lupus**, v. 18, n. 9, p. 767-776, ago. 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19578100/>. Acesso em: 13 fev. 2023.
- ROBINSON, G. A. *et al.* Increased apolipoprotein-B:A1 ratio predicts cardiometabolic risk in patients with juvenile onset SLE. **EBioMedicine**, v. 65, p. 103243, mar. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33640328/>. Acesso em: 16 nov. 2022.
- ROSS, R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 2, p. 115-126, jan. 1999. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9887164/>. Acesso em: 16 nov. 2022.
- RUS, V; MAURY, E. E.; HOCHBERG, M. C. The eepidemiology of systemic lupus erythematosus. *In*: WALLACE, D. J.; HAHN, B. H. (ed.). **Dubois lupus erythematosus**. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2002.
- SELLA, E. M. C. *et al.* Myocardial perfusion scintigraphy and coronary disease risk factors in systemic lupus erythematosus. **Annals Rheum Dis.**, v. 62, n. 11, p. 1066-1070, 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14583569/>. Acesso em: 16 nov. 2022.
- SIVAKUMARAN, J. *et al.* Assessment of cardiovascular risk tools as predictors of cardiovascular disease events in systemic lupus erythematosus. **Lupus Science & Medicine**, v. 8, n. 1, e000448, 2021. Disponível em: <https://lupus.bmj.com/content/8/1/e000448>. Acesso em: 16 nov. 2022.
- STOJAN, G. *et al.* Intracellular homocysteine metabolites in SLE: plasma S-adenosylhomocysteine correlates with coronary plaque burden. **Lupus Science & Medicine**, v. 8, e000453, 2021. Disponível em: <https://lupus.bmj.com/content/8/1/e000453>. Acesso em: 16 nov. 2022.
- SUTTON, E. J.; DAVIDSON, J. E.; BRUCE, I. N. The Systemic Lupus International Collaborating Clinics (SLICC) damage index: a systematic literature review. **Semin Arthritis Rheum.**, v. 43, n. 3, p. 352-361, dez. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23786872/>. Acesso em: 16 nov. 2022.
- TANI, C. *et al.* Rare clinical manifestations in systemic lupus erythematosus: a review on frequency and clinical presentation. **Clin Exp Rheumatol**, v. 134, n. 5, p. 93-102, maio 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35485422/>. Acesso em: 13 fev. 2023.
- TONG, M. *et al.* Plasma pentraxin 3 in patients with chronic kidney disease: associations with renal function, protein-energy wasting, cardiovascular disease, and mortality. **Clin J Am Soc**

- Nephrol.**, v. 2, n. 5, p. 889-897, set. 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17702732/>. Acesso em: 16 nov. 2022.
- TOUMA, Z. *et al.* SLEDAI-2K 10 days versus SLEDAI-2K 30 days in a longitudinal evaluation. **Lupus**, v. 20, n. 1, p. 67-70, jan. 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21233149/>. Acesso em: 16 nov. 2022.
- TSANG-A-SJOE, M. W. P.; BULTINK, I. E. M. New developments in systemic lupus erythematosus. **Rheumatology (Oxford)**, v. 60, p. vi21-vi28, dez. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34951924/>. Acesso em: 16 nov. 2022.
- TSOKOS, G. C. Autoimmunity and organ damage in systemic lupus erythematosus. **Nat Immunol.**, v. 21, n. 6, p. 605-614, jun. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32367037/>. Acesso em: 13 fev. 2023.
- TSOKOS, G. C. *et al.* New insights into the immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus. **Nat Rev Rheumatol.**, v. 12, n. 12, p. 716-730, nov. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27872476/>. Acesso em: 16 nov. 2022.
- TSOKOS, G. C. Systemic Lupus Erythematosus. **New Engl J Med**, v. 365, n. 22, p. 2110-2121, dez. 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22129255/>. Acesso em: 16 nov. 2022.
- URIBE, A. G. *et al.* The Systemic Lupus Activity Measure-Revised, the Mexican Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI), and a Modified SLEDAI-2K Are Adequate Instruments to Measure Disease Activity in Systemic Lupus Erythematosus. **The Journal of Rheumatology**, v. 31, n. 10, p. 1934-1940, out. 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15468356/>. Acesso em: 16 nov. 2022.
- UROWITZ, M. B. *et al.* Modified Framingham Risk Factor Score for Systemic Lupus Erythematosus. **The Journal of Rheumatology**, v. 43, n. 5, p. 875-879, maio 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26879352/>. Acesso em: 16 nov. 2022.
- WESTERWEEL, P. E. *et al.* Premature Atherosclerotic Cardiovascular Disease in Systemic Lupus Erythematosus. **Arthritis Rheum**, v. 56, n. 5, p. 1384-1396, maio 2007. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/art.22568>. Acesso em: 16 nov. 2022.
- WILSON, P. W. *et al.* Prediction of Coronary Heart Disease Using Risk Factor Categories. **Circulation**, v. 97, n. 18, p. 1837-1847, maio 1998. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9603539/>. Acesso em: 16 nov. 2022.
- WOLF, D.; LEY, K. Immunity and Inflammation in Atherosclerosis. **Circulation Research January**, v. 124, p. 315-327, 2019. Disponível em: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCRESAHA.118.313591>. Acesso em: 16 nov. 2022.
- YUNG, R. *et al.* Mechanisms of drug-induced lupus. II. T cells overexpressing lymphocyte function-associated antigen 1 become autoreactive and cause a lupuslike disease in syngeneic

mice. **J Clin Invest**, v. 97, n. 12, p. 2866-2871, 1996. Disponível em:
<https://www.jci.org/articles/view/118743/pdf>. Acesso em: 13 fev. 2023.

ZELLER, C. B.; APPENZELLER, S. Cardiovascular Disease in Systemic Lupus Erythematosus: The Role of Traditional and Lupus Related Risk Factors. **Curr Cardiol Rev.**, v. 4, n. 2, p. 116-122, maio 2008. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19936286/>. Acesso em: 16 nov. 2022.

ZUCCHI, D. *et al.* One year in review 2019: systemic lupus erythematosus. **Clin Exp Rheumatol.**, v. 37, n. 5, p. 715-722, set./out. 2019. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31376267/>. Acesso em: 16 nov. 2022.

ZUCCHI, D. *et al.* One year in review 2022: systemic lupus erythematosus. **Clin Exp Rheumatol.**, v. 40, n. 1, p. 4-14, jan. 2022. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35088691/>. Acesso em: 13 fev. 2023.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)



O (a) Sr.(sra.) está sendo convidado(a) a participar como voluntário(a) do estudo **“AVALIAÇÃO E DIAGNÓSTICO DA OBESIDADE E SUA ASSOCIAÇÃO COM BIOMARCADORES PREDITORES DO RISCO CARDIOVASCULAR NOS PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO”**, que será realizado no Ambulatório de Reumatologia do Hospital Universitário Professor Alberto Antunes/HUPAA. Receberá dos pesquisadores Vanessa Miranda Pereira Fausto e Thiago Sotero Fragoso as seguintes informações:

1. A pesquisa se destina a estudar a obesidade e o risco de desenvolver doenças cardiovasculares (como infarto e acidente vascular cerebral) em um grupo de pacientes com e lúpus eritematoso sistêmico no ambulatório de Reumatologia do Hospital Professor Alberto Antunes.
2. A importância deste estudo é a de conhecer melhor o comportamento do Lúpus Eritematoso nos pacientes atendidos neste serviço. Esta pesquisa é importante para que se possam estabelecer programas de tratamento e assistência mais adequados à nossa realidade.
3. Os resultados que se desejam alcançar são os seguintes: quantificar a porcentagem de pacientes com obesidade e sarcopenia (perda de massa muscular) dentre os participantes; descobrir novos exames que possam ajudar a prevenir infarto e acidente vascular cerebral. A partir desses dados, desenvolver medidas de tratamento e prevenção. Com isso, objetivamos reduzir o risco cardiovascular (ocorrência de doenças como infarto e acidente vascular cerebral).
4. A coleta de dados começará em 29 de maio de 2021 e terminará em 29 de outubro de 2022.
5. O estudo será feito da seguinte maneira: Durante a consulta de rotina com seu médico reumatologista, serão coletadas informações sobre a sua doença e tratamento, serão realizados exame físico e coleta de sangue – semelhantes daqueles que você faria como parte da avaliação de rotina com o seu médico. A diferença é que:
 - Na coleta de sangue, avaliaremos substâncias chamadas de metabólitos (produzidos devido à inflamação causada pela sua doença) que serão utilizados como exames para avaliar a doença;
 - Serão avaliados de peso, altura e circunferência abdominal através de balança e fita métrica.
6. A sua participação será nas seguintes etapas: consulta médica com reumatologista com realização de exame físico, realização de exames de sangue, realização de exame clínica e medida de peso, altura e circunferência abdominal.

7. A sua participação neste estudo é totalmente voluntária e a sua recusa em participar não influenciará de nenhuma forma o relacionamento com a equipe médica que lhe assiste.
8. Os incômodos e possíveis riscos à sua saúde física e/ou mental são: demora no atendimento (na sala de espera); dor no local de retirar sangue (numa veia da mão ou do braço).
9. Os benefícios esperados com a sua participação no projeto de pesquisa, mesmo que não diretamente são: ao descobrir a presença de obesidade, o seu médico irá recomendar medidas para melhoria desses parâmetros podendo assim diminuir os riscos de desenvolver algumas doenças do coração e acidente vascular cerebral.
10. Você poderá contar com a seguinte assistência: se você precisar de algum tratamento, ou encaminhamento devido novos achados em sua avaliação médica, ou por se sentir prejudicado por causa da pesquisa, você será encaminhado (a) para ambulatórios específicos do Hospital Universitário Professor Alberto Antunes, de acordo com o fluxo de marcação do mesmo.
11. Você será informado (a) do resultado final do projeto e sempre que desejar, serão fornecidos esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo.
12. A qualquer momento, você poderá recusar a continuar participando do estudo e, também, que poderá retirar seu consentimento, sem que isso lhe traga qualquer penalidade ou prejuízo.
13. As informações conseguidas através da sua participação não permitirão a identificação da sua pessoa, exceto para a equipe de pesquisa, e que a divulgação das mencionadas informações só será feita entre os profissionais estudiosos do assunto após a sua autorização. Os dados apresentados publicamente serão sempre analisados no conjunto de todos os pacientes, sem identificação de nenhum dos participantes do estudo.
14. O estudo não acarretará nenhuma despesa para você.
15. Você será indenizado (a) por qualquer dano que venha a sofrer com a sua participação na pesquisa (nexo causal), desde que seja relacionado a prejuízos advindos dos procedimentos que serão realizados.
16. Você receberá uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado por todos.

Endereço d(os,as) responsável(is) pela pesquisa (OBRIGATÓRIO):

Instituição: Hospital Universitário Professor Alberto Antunes – UFAL

Endereço: Avenida Lourival Melo Mota, s/n, Cidade Universitária

Cidade/CEP: Maceió – AL CEP 57072900 Telefone: (82) 3202-3800

Ponto de referência: Ao lado da universidade Federal de Alagoas - UFAL

O **Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)** é um colegiado interdisciplinar e independente, que deve existir nas instituições que realizam pesquisas envolvendo seres humanos no Brasil, foi criado para defender os interesses dos sujeitos em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro dos padrões éticos (Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012). O CEP é responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos. Este papel está bem estabelecido nas diversas diretrizes éticas internacionais (Declaração de Helsinque, Diretrizes Internacionais para as Pesquisas Biomédicas envolvendo Seres Humanos – CIOMS) e Brasileira (Resolução CNS 196/96, Resolução CNS 466/12 e complementares), diretrizes estas que ressaltam a necessidade de revisão ética e científica das pesquisas envolvendo seres humanos, visando a salvaguardar a dignidade, os direitos, a segurança e o bem-estar do sujeito da pesquisa. Além disso, o CEP contribui para a qualidade das pesquisas e para a discussão do papel da pesquisa no desenvolvimento social da comunidade. Contribui ainda para a valorização do pesquisador que recebe o reconhecimento de que sua proposta é eticamente adequada. Desta maneira e de acordo com a Resolução CNS 466/12, “pesquisas envolvendo seres humanos devem ser submetidas à apreciação do Sistema CEP/CONEP, que, ao analisar e decidir, se torna corresponsável por garantir a proteção dos participantes.”

ATENÇÃO: O Comitê de Ética da UFAL analisou e aprovou este projeto de pesquisa. Para obter mais informações a respeito deste projeto de pesquisa, informar ocorrências irregulares ou danosas durante a sua participação no estudo, dirija se ao: Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas- Prédio do Centro de Interesse Comunitário (CIC), Térreo, Campus A. C. Simões, Cidade Universitária. Telefone: 3214-1041 Horário de Atendimento: das 8:00 as 12:00hs. E-mail:comitedeeticaufal@gmail.com.

Finalmente, tendo eu compreendido perfeitamente tudo o que me foi informado sobre a minha participação no mencionado estudo e, estando consciente dos meus direitos, das minhas responsabilidades, dos riscos e dos benefícios que a minha participação implica, concordo em participar da pesquisa e, para tanto eu DOU O MEU CONSENTIMENTO SEM QUE PARA ISSO EU TENHA SIDO FORÇADO (A) OU OBRIGADO (A).

Maceió, _____ de _____ de _____.

Assinatura ou impressão datiloscópica do (a) voluntário (a)
(rubricar as demais folhas)

Assinatura do responsável pelo Estudo
(rubricar as demais folhas)

APÊNDICE B – FORMULÁRIO PARA COLETA DE DADOS CLÍNICOS E SOCIODEMOGRÁFICOS

(1) IDENTIFICAÇÃO

Nome (iniciais): _____ Prontuário: _____
 Telefone: _____ Data da coleta: ____/____/____
 Data de nascimento: ____/____/____ Idade: _____
 Sexo: () Masculino () Feminino
 Cor: () Branco () Preto () Pardo () Amarelo
 Estado civil: () Solteiro () Casado/união estável () Viúvo () Divorciado
 () Outros
 Escolaridade em anos de estudo: _____
 Situação ocupacional: () Ativo com renda () Inativo com renda (aposentadoria/ pensão) ()
 Ativo sem renda () Inativo/desempregado () Dona de casa/ estudante
 Grau de Instrução: _____
 Profissão: _____
 Naturalidade: _____ Procedência: _____

(2) DADOS CLÍNICOS

Doença (diagnóstico): () Lúpus eritematoso sistêmico , critérios diagnósticos:

Data do diagnóstico da doença: ____/____/____

Hipertensão arterial sistêmica () Sim () Não
 Diabetes mellitus () Sim () Não
 Tabagismo () Sim () Não
 Etilismo () Sim () Não
 Atividade física () Sim () Não

Medicamentos em uso:

Glicocorticoide	() Sim () Não	Dose: _____
Hidroxicloroquina	() Sim () Não	
Imunobiológico	() Sim () Não	
Metotrexato	() Sim () Não	
Azatioprina	() Sim () Não	
Micofenolato de mofetil	() Sim () Não	
Colecalciferol	() Sim () Não	
Alendronato ou bifosfonados	() Sim () Não	
Anti-hipertensivos	() Sim () Não	
Antidiabéticos	() Sim () Não	
Estatina	() Sim () Não	
AAS	() Sim () Não	

(3) EXAME FÍSICO e AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA

Medida de pressão arterial: _____

Altura: _____ cm

Peso: _____ Kg

IMC: _____ Kg/m²

Circunferência abdominal: _____

(4) AVALIAÇÃO LABORATORIAL

EXAME	RESULTADO	EXAME	RESULTADO
HB		TGO	
LEUCO		TGP	
PLAQUETAS		GLICEMIA JEJUM	
PCR		INSULINA	
C3		COLESTEROL TOTAL	
C4		HDL	
COOMBS DIRETO		LDL	
RETICULÓCITOS		TRIGLICÉRIDES	
URÉIA		SUMÁRIO DE URINA	
CREATININA		PROTEINÚRIA 24 HORAS	

APÊNDICE C – SLEDAI-2K MODIFICADO

PESO	DESCRIÇÃO	DEFINIÇÃO
8	Convulsão	Início recente. Excluindo causas metabólicas, infecciosas ou por drogas.
8	Psicose	Habilidade alterada de realizar atividades normais devido à grave distúrbio na percepção da realidade. Inclui alucinações, incoerência, perda significativa de associações, conteúdo inadequado do pensamento, pensamento ilógico, comportamento bizarro, desorganizado ou catatônico. Exclui uremia e drogas.
8	S. cerebral orgânica	Função mental alterada com prejuízo da orientação, memória ou outra função intelectual, com início e flutuações súbitas. Inclui alteração do nível de consciência com diminuição da capacidade de concentração e incapacidade de sustentar atenção no meio-ambiente associado a 2 dos seguintes: distúrbios persecutórios, discurso incoerente, insônia ou sonolência diurna, atividade psicomotora aumentada ou diminuída. Excluir causas infecciosas, metabólicas ou drogas.
8	Distúrbio visual	Alterações retinianas do LES. Inclui corpos citóides, hemorragia retiniana, exsudato seroso ou hemorragia na coróide, neurite ótica. Excluir hipertensão, infecção e drogas.
8	Alteração de par craniano	Início de neuropatia sensorial ou motora.
8	Cefaléia lúpica	Cefaléia intensa e persistente podendo ser tipo enxaqueca, mas tem que ser resistente ao uso de narcóticos.
8	AVC	AVC novo. Exclui aterosclerose.
8	Vasculite	Ulceração, gangrena, nódulos em dedos, infartos periungueais, hemorragias pontuais, biópsia ou arteriografia comprovando vasculite.
4	Artrite	Mais de 2 articulações com dor e flogose.
4	Miosite	Fraqueza/ dor muscular proximal associado a aumento de CK-T/ aldolase ou ENMG ou biópsia muscular.
4	Cilindrúria	Granular hemático ou celular de hemácias
4	Hematúria	> 5 hemácias/ cp. Excluir infecção, nefrolitíase ou outra causa.
4	Piúria	> 5 leucócitos/ cp. Excluir infecção.
4	Proteinúria	> 0.5 mg/ 24 hs (independente de início recente ou recorrência).
2	Nova erupção cutânea	Erupção cutânea nova ou recorrente com sinais de inflamação.
2	Alopécia	Início recente ou recorrência de queda de cabelo anormal difusa ou localizada.
2	Úlcera mucosa	Início recente ou recorrência de úlceras orais ou nasais.
2	Pleurite	Dor torácica pleurítica com atrito ou derrame pleural ou espessamento pleural.

2	Pericardite	Dor pericárdica com mais um dos seguintes: derrame, atrito ou ECG, ou ECO.
1	Febre	> 38° C. Excluir infecção.
1	Trombocitopenia	< 100.000 plaquetas/ mm ³
1	Leucopenia	< 3.000 leucócitos/ mm ³ . Excluir drogas.

Escore Total: / 101

APÊNDICE D – SLICC

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 significante (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 constricção, 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.

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
ALAGOAS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO E DIAGNÓSTICO DA OBESIDADE E SUA ASSOCIAÇÃO COM BIOMARCADORES PREDITORES DO RISCO CARDIOVASCULAR NOS PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE E LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

Pesquisador: Thiago Sotero Fragoso

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 39956520.2.0000.5013

Instituição Proponente: Hospital Universitário Professor Alberto Antunes

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.472.515

Apresentação do Projeto:

O presente estudo trata-se de um corte transversal com objetivo de validar o diagnóstico da obesidade e sarcopenia nos pacientes com LES e AR através da medida da absorciometria por raios-X com dupla energia e verificar, através da metabolômica e da dosagem de citocinas, biomarcadores associados à obesidade que sejam capazes de predizer o risco cardiovascular.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral

Identificar biomarcadores associados ao aumento do risco cardiovascular em pacientes obesos portadores de AR e LES e sua associação com atividade de doença.

Objetivos Específicos

Estimar a composição corporal dos pacientes com artrite reumatoide e

lúpus eritematoso sistêmico através do absorciometria por raios-X com dupla energia a

fim de diagnosticar obesidade;

Determinar índice de massa corpórea e circunferência abdominal nos

pacientes com artrite reumatoide e lúpus eritematoso sistêmico;

Avaliar o perfil metabólico através do método metabolômico global nos

pacientes com artrite reumatoide e lúpus eritematoso sistêmico;

Caracterizar o perfil de adipocinas e citocinas inflamatórias nos pacientes

Endereço: Av. Lourival Melo Mota, s/n - Campus A . C. Simões,

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 57.072-900

UF: AL

Município: MACEIO

Telefone: (82)3214-1041

E-mail: comitedeeticaufal@gmail.com

