UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO DE PRETO
DEPARTAMENTO DE PUERICULTURA E PEDIATRIA

ROBERTA GARCIA SALOMÃO

**Ingestão alimentar, homocisteína e proteoma plasmático no lúpus eritematoso sistêmico
juvenil**

Ribeirão Preto

2016

ROBERTA GARCIA SALOMÃO

**Ingestão alimentar, homocisteína e proteoma plasmático no lúpus eritematoso sistêmico
juvenil**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo, Departamento de Puericultura e
Pediatria, para obtenção do título de Doutor.

Área de Concentração: Saúde da Criança e
do Adolescente

Orientadora: Profa. Dra. Jacqueline Pontes
Monteiro

Ribeirão Preto

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Salomão, Roberta Garcia

Ingestão alimentar, homocisteína e proteoma plasmático no
lúpus eritematoso sistêmico juvenil. Ribeirão Preto, 2016.

103 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Saúde da Criança e do
Adolescente.

Orientadora: Monteiro, Jacqueline Pontes.

1. Lúpus eritematoso sistêmico juvenil. 2. Homocisteína. 3.
Proteoma plasmático. 4. Ingestão alimentar.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salomão, RG. Ingestão alimentar, homocisteína e proteoma plasmático no lúpus eritematoso sistêmico juvenil. Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMPRUSP) para obtenção do título de Doutor em Saúde da Criança e do Adolescente.

Aprovado em: ____/____/____

Banca examinadora:

Profa Dra Jacqueline Pontes Monteiro. Instituição: FMRP-USP

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Profa Dra Paula Garcia Chiarello. Instituição: FMRP-USP

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof Dr Paulo Louzada Júnior. Instituição: FMRP-USP

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Profa Dra Lusânia Maria Gregg Antunes. Instituição: FCFRP-USP

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Profa Dra Virgínia Resende Silva Weffort. Instituição: UFTM

Julgamento: _____ Assinatura: _____

À minha professora, orientadora e amiga Jacque
que sempre me apoiou, incentivou e ensinou
durante todo o caminho de elaboração e
desenvolvimento desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por me iluminar e abençoar durante todo o caminho da pós-graduação.

À Profa Dra Jacqueline Pontes Monteiro que muito contribuiu para o meu crescimento pessoal e profissional como orientadora e amiga em todos os momentos.

Às Profa Dra Virgínia Paes Leme Ferriani e Profa Dra Luciana Martins de Carvalho que sempre estiveram solícitas e disponíveis em ajudar na coleta e análise de dados.

À equipe de Reumatologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e a equipe de Pediatria do Centro Médico Social Comunitário Vila Lobato pela atenção e colaboração prestada ao presente estudo.

Aos voluntários e seus responsáveis que aceitaram participar de todas as etapas do projeto.

Todas as equipes de laboratório que me auxiliaram nas análises: Centro de Química de Proteínas (Prof Dr José César Rosa, Clarice Izumi e Érika Silva Czernisz), Laboratório de Nutrição e Metabolismo (Prof Dr Alceu Afonso Jordão Júnior e Renata Lataro) e Laboratório de Endocrinologia Infantil (Prof Dr Sonir Rauber Antonini e Ana Carolina Bueno).

Às secretárias do Departamento de Pediatria, Sandra, Dulce, Vera, Cláudia e Fernanda por me ajudarem em todas as questões burocráticas que a pós-graduação exige.

À Ana Lúcia, que mesmo não estando mais presente no departamento de Pediatria me apoiou muito no início do meu curso.

Aos meus amigos Vitor Hugo e Luís Cláudio que sempre me ajudaram com as questões de informática.

À equipe de pós-graduandos da Profa Jacqueline: Mariana, Carol, Roseli, Tamiris, Elaine e Maria Olímpia que de forma direta ou indireta contribuíram para o meu crescimento de trabalho em equipe.

Aos meus pais, Mário e Vera e meu irmão Tales que sempre estiveram do meu lado e me apoiaram com muito amor e força nessa longa jornada.

Ao meu noivo e companheiro que sempre me apoiou com amor, carinho e paciência em todos os momentos.

Se você quer ser bem-sucedido, precisa ter dedicação total,
buscar seu último limite e dar o melhor de si mesmo.

Ayrton Senna da Silva

RESUMO

Salomão RG. Ingestão alimentar, homocisteína e proteoma plasmático no lúpus eritematoso sistêmico juvenil [tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2016. 103f.

Lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença multisistêmica crônica e autoimune de etiologia desconhecida. O LES é considerado um fator de risco independente para eventos cardiovasculares em qualquer faixa etária. A coexistência de fatores de risco tradicionais e não tradicionais (alto nível plasmático de homocisteína) são as causas para o risco do desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV) em portadores de LES. A hiperhomocisteinemia é considerada um fator de risco independente para DCV e cerebrovasculares e tem como causas fatores nutricionais, genéticos e fisiológicos. Proteína C reativa de alta sensibilidade (hs-PCR), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interferon α , MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein-1*) e leptina tem sido descritos como importantes biomarcadores para DCV. Por outro lado, adiponectina e grelina tem sido retratadas como potentes protetores contra o desenvolvimento da aterosclerose. Parâmetros antropométricos aumentados também podem estar associados ao risco de DCV como aumento da espessura da camada íntima da carótida. O processo de inflamação crônica existente no LES está diretamente associado a alterações no perfil lipídico e no metabolismo de lipoproteínas. Análises em larga escala dos perfis de expressão de proteínas estão se tornando uma importante ferramenta na investigação de várias patologias associadas a resposta autoimune.

Objetivos: Descrever e comparar medidas antropométricas, ingestão alimentar e proteoma plasmático em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico juvenil (LESJ) e controles saudáveis. Comparar metabólitos e antropometria entre dois clusters metabólicos de pacientes com LESJ (Lúpus Melhor Perfil Metabólico – LMPM e Lúpus Pior Perfil Metabólico – LPPM) e um cluster com controles saudáveis (Controle Melhor Perfil Metabólico) e, também, em dois clusters de pacientes com LESJ definidos pela dose diária de corticoide administrada.

Métodos: Foram recrutadas 19 adolescentes portadoras de LESJ e 39 controles saudáveis. Foram mensurados índice de massa corporal (IMC), peso, estatura, circunferência da cintura (CC), ingestão alimentar (Recordatório de 24 horas), SLEDAI (*Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*), SLICC (*Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index*), níveis plasmáticos de homocisteína, vitamina B12,

folato, TNF- α , hs-PCR, MCP-1, adiponectina, leptina, grelina, perfil lipídico e proteoma plasmático pela técnica *Shotgun proteomics* com *Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation*. Os grupos foram comparados por ANCOVA. k-cluster foi usado para separar LESJ e controles em dois *clusters* extremos de melhor e pior perfil metabólico de acordo com os níveis plasmáticos de homocisteína, TNF- α , hsPCR e folato para a análise da proteômica. **Resultados:** Pacientes com LESJ apresentaram maior IMC, CC, homocisteína, triglicérides, TNF- α , hsPCR e menor folato plasmático quando comparados ao grupo controle. Foram encontradas 10 proteínas com expressão significativamente diferente entre os *clusters*: Cluster Lúpus Melhor Perfil Metabólico (LMPM), Cluster Lúpus Pior Perfil Metabólico (LPPM) e Cluster Controle Melhor Perfil Metabólico (CMPM) (α -2-macroglobulina, α -1-antitripsina, apoliproteína AI, apoliproteína E, ceruloplasmina, complemento C3, fibrinogênio de cadeia α , haptoglobina, hemopexina e sorotransferrina). Oito proteínas foram mais expressas no LMPM e menos expressas no LPPM comparados com CMPM. As proteínas menos expressas no LPPM foram negativamente correlacionadas com maior risco para DCV. **Conclusão:** O presente estudo mostrou que as adolescentes com LESJ apresentaram maior IMC, circunferência da cintura, concentrações séricas de homocisteína, triglicérides, TNF- α , hs-PCR e, menor estatura e concentração de folato sérico quando comparadas com adolescentes saudáveis. Além disso, o *cluster* LPPM apresentou uma expressão diminuída das proteínas apolipoproteína AI, apolipoproteína E, alfa-2-macroglobulina, alfa-1-antitripsina, ceruloplasmina, complemento C3, hemopexina e sorotransferrina quando comparado aos *clusters* CMPM e LMPM. Sendo assim, é possível concluir que o presente estudo sinaliza possíveis complicações cardiovasculares futuras em pacientes com LESJ e, sugerem a necessidade de novos estudos, a fim de elucidar a interação do estado nutricional e das proteínas encontradas pela proteômica no contexto de sistemas biológicos em pacientes com LESJ.

Palavras-chave: Lúpus eritematoso sistêmico Juvenil. Homocisteína. Proteoma plasmático. Ingestão alimentar.

ABSTRACT

Salomão RG. Food intake, homocysteine and plasma proteomic in childhood-onset systemic lupus erythematosus [tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2016. 103f.

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a, autoimmune, chronic and inflammatory disease of unknown etiology. SLE is considered an independent risk factor for cardiovascular diseases at any age. Reasons for the increased risk of CVD in SLE include the co-existence of traditional cardiac risk factors and nontraditional risk factors such as high concentrations of homocysteine. Elevated homocysteine (Hcy) levels is considered an independent risk factor for CVD. Hiperhomocysteine can indicate undernourishment due to a lack of vitamins or genetic alterations. Inflammatory biomarkers have been consistently associated with the presence of CVD in multiple studies from different populations, including SLE, such as high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP), tumor necrosis factor – α (TNF – α), type I interferon (IFN), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and leptin. On the other hand, some cytokines and hormones are related to atherosclerosis prevention, such as adiponectin and ghrelin. The existing chronic inflammation process in SLE is directly associated with changes in lipid and lipoprotein metabolism. Some comprehensive studies have been conducted at multiple biological levels including DNA (or genomics), mRNA (or transcriptomics), protein (or proteomics) and metabolites (or metabolomics). The ‘omics’ platforms allow us to re-examine SLE at a greater degree of molecular resolution. **Objectives:** To describe and compare anthropometric measurements, food intake, metabolites and plasma proteomic analysis in childhood onset systemic lupus erythematosus (c-SLE) and healthy controls. To compare metabolites and anthropometric parameters between two clusters with c-SLE (lupus cluster with the best - LCBMP and the worst metabolic profile - LCWMP) and one cluster with controls (healthy cluster with the best metabolic profile - HCBMP) and to compare metabolites and anthropometric parameters between two clusters of c-SLE patients defined by daily corticosteroid doses intake. **Methods:** 19 c-SLE and 39 healthy volunteers were recruited. We evaluated BMI, weight, height, waist circumference, food intake through a 24-hours recalls, SLEDAI (*Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*), SLICC (*Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index*), SLICC, serum levels of homocysteine, vitamin B12,

folate, TNF- α , hs-C reactive protein, monocyte chemoattractant protein-1, adiponectin, leptin, ghrelin, lipid profile and plasma proteomic by Shotgun proteomics with Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation. The groups were compared by ANCOVA. k-cluster were used to separate SLE and control groups into two different clusters with the best and the worst metabolic profile according to homocysteine, TNF- α , hsCRP and folate plasma levels for proteomic assessment. **Results:** SLE patients presented higher BMI, WC, homocysteine, triglycerides, TNF- α , hsCRP levels and lower plasma folate when compared to controls. We found 10 proteins with significantly different expression between healthy cluster with the best metabolic profile (HCBMP) and lupus cluster with the best (LCBMP) and the worst metabolic profile (LCWMP) (alpha-2-macroglobulin; alpha-1-antitripsin, apolipoprotein AI, apolipoprotein E, ceruloplasmin, complement C3, fibrinogen α chain, haptoglobin, hemopexin and serum transferrin). Eight proteins were higher expressed in LCBMP and lower expressed in LCWMP compared with HCBMP. Proteins less expressed in LCWMP were negatively correlated with a higher risk for cardiovascular disease. **Conclusion:** Our results described some previously cardiovascular risk factors in c-SLE patients and possible associations between nutritional status and cardiovascular disease risk factors. Proteomic results showed acute phase proteins and pro-inflammatory proteins more expressed in c-SLE patients compared to controls. These results might allow us to treat c-SLE with personalized diets to avoid cardiovascular complications in future. The small sample size and the cross-sectional design were the limitations of the study, but it is a rare disease in the pediatric field and, despite this fact, the present study was able to characterize two distinct nutritional and metabolic groups with uncommon proteins expressed. These results deserve further investigations to better elucidate the whole of these proteins in the context of systems biology interactions in SLE pediatric patients.

Keywords: Child-hood onset Systemic Lupus Erythematosus; Homocysteine; Proteomic; Food Intake.

Sumário

RESUMO	5
ABSTRACT	7
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. JUSTIFICATIVA	17
3. OBJETIVOS	18
3.1 OBJETIVO PRINCIPAL	18
3.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS.....	18
4. METODOLOGIA E CASUÍSTICA.....	19
4.1. MODELO DO ESTUDO	19
4.2 SELEÇÃO DOS PARTICIPANTES	19
4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	19
4.4 CRITÉRIOS DE NÃO INCLUSÃO	19
4.5 APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA E AUXÍLIO FINANCEIRO.....	20
4.6 DELINEAMENTO DO ESTUDO	20
4.7 CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	21
4.8 COLETA DE SANGUE.....	21
4.9 AVALIAÇÃO CLÍNICA	21
4.10 AVALIAÇÃO NUTRICIONAL	22
4.10.1 ANTROPOMETRIA	22
4.10.1.1 PESO	22
4.10.1.2 ESTATURA	22
4.10.1.3 ÍNDICE DE MASSA CORPORAL (IMC).....	23
4.10.1.4 CIRCUNFERÊNCIA DA CINTURA (CC).....	23
4.10.2 RECORDATÓRIO DE 24 HORAS (R-24hs).....	23
4.11 ANÁLISES LABORATORIAIS.....	24
4.11.1 HOMOCISTEÍNA.....	24
4.11.2 VITAMINA B12 E FOLATO	25
4.11.3 PERFIL LIPÍDICO.....	25
4.11.4 PROTEÍNA C REATIVA (PCR).....	26
4.11.5 MONOCYTE CHEMOATTRACTANT PROTEIN-1 (MCP-1).....	26
4.11.6 INTERFERON-ALFA (IFN- α)	27
4.11.7 FATOR DE NECROSE TUMORAL – α (TNF – α)	27
4.11.8 LEPTINA	27
4.11.9 ADIPONECTINA	27

4.11.10 GRELINA.....	28
4.11.11 PROTEÔMICA	28
4.11.12 DOSAGEM DE PROTEÍNAS EM SOLUÇÃO	30
4.11.13 DELIPIDAÇÃO DAS AMOSTRAS	30
4.11.14 CONFECÇÃO DOS POOLS DE PLASMA.....	30
4.11.15 REMOÇÃO DAS PROTEÍNAS MAIS ABUNDANTES	30
4.11.16 MARCAÇÃO DAS AMOSTRAS COM ISÓBAROS ITRAQ	31
4.11.17 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE TROCA CATIÔNICA (SCX)	32
4.11.18 ESPECTROMETRIA DE MASSA – ESI – Q - TOF	32
4.11.19 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS	32
4.11.20 ANÁLISE QUANTITATIVA DOS DADOS	33
4.11.21 ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA	33
4.11.22 GO –TERM FINDER (GENE ONTOLOGY - GO)	33
4.11.23 METACORE	34
4.11.24 VALIDAÇÃO DAS PROTEÍNAS ENCONTRADAS.....	34
4.11.25 PREPAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA WESTERN BLOT	34
4.11.26 SEPARAÇÃO DAS PROTEÍNAS POR ELETROFORESE SDS-PAGE, TRANSFERÊNCIA POR WESTERN BLOT E IMUNODETECÇÃO DAS PROTEÍNAS ALVO.	35
4.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	36
5. RESULTADOS	37
6. DISCUSSÃO.....	57
7. CONCLUSÃO.....	68
8. REFERÊNCIAS	69
ANEXO A: Protocolo de pesquisa para participantes com LES.....	86
ANEXO B: Protocolo de pesquisa para participantes saudáveis.	92
ANEXO C: Termo de consentimento livre e esclarecido.....	95
Universidade de São Paulo	95
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto	95
ANEXO D: Foto representativa da imunodepleção das proteínas mais abundantes (Albumina e IgG).	96
ANEXO E: Porcentagem de cobertura da identificação das proteínas diferencialmente expressas entre os clusters CMPM, LMPM e LPPM pelo Scaffold.....	97

1. INTRODUÇÃO

Lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença multisistêmica crônica e autoimune de etiologia desconhecida. A patogênese do LES é multifatorial e está relacionada com a combinação de fatores genéticos e ambientais, os quais provocam danos irreversíveis no sistema imunológico. LES é caracterizado pela produção de auto anticorpos e formação de imuno complexos que levam a diversas manifestações clínicas e afetam diferentes órgãos e tecidos de maneiras diferentes em cada paciente (1–4). Aproximadamente 20% dos pacientes com LES desenvolvem a patologia antes dos 16 anos o que pode levar a um maior número de órgãos afetados e a rápida progressão dos danos estruturais quando comparado aos adultos (5,6). Sabe-se que no LES há uma mortalidade bimodal; a precoce, atribuída a complicações de glomerulonefrite, lúpus neuropsiquiátrico e infecções enquanto que a tardia é usualmente atribuída a eventos cardíacos e cerebrovasculares (7).

O lúpus eritematoso sistêmico juvenil (LESJ) é considerado um fator de risco independente para eventos cardiovasculares. Desde o início da década de 70, observa-se que os pacientes com LES têm maior risco (4 a 10 vezes maior) de desenvolver aterosclerose precocemente quando comparados com a população em geral (8). O aumento do risco de doenças cardiovasculares (DCV) é descrito tanto em adultos quanto em crianças com doenças reumáticas (6,9) e, a aterosclerose, é a principal causa de morbidade e mortalidade em pacientes com LES especialmente em países subdesenvolvidos (10).

As razões para o aumento do risco de DCV em pacientes lúpicos incluem a coexistência de fatores de risco tradicionais como diabetes, hipertensão, hipercolesterolemia, altas concentrações de lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDL) e a presença de síndrome metabólica (caracterizada pela elevada pressão sanguínea, obesidade central, dislipidemia e intolerância a glicose), e fatores de risco não tradicionais como idade avançada no diagnóstico, maior duração da doença, maior pontuação do índice de gravidade da doença, maior duração da terapia com esteróides e altos níveis plasmáticos de homocisteína (7,8,11–15). As crianças e adolescentes com LESJ ficam por mais tempo expostos aos fatores de risco, por isso o risco de desenvolverem DCV precocemente é maior que o de adultos (16).

A hiperhomocisteinemia é considerada um fator de risco independente para DCV e cerebrovasculares e tem como causas fatores nutricionais, genéticos e fisiológicos (19). A deficiência de uma ou mais vitaminas presentes no metabolismo da Hcy pode levar ao seu aumento no plasma, indicando má nutrição (21). Do Prado et al. (2006) (22) encontraram homocisteína plasmática elevada em 46,9% dos pacientes pediátricos com LESJ em relação ao controle saudável. Martínez-Berriotxo et al. (2003) (23), concluíram que as concentrações plasmáticas de homocisteína eram significativamente maiores nos pacientes adultos com LES em comparação com controles saudáveis (10,54mol/L vs 8,49mol/L, $p<0,001$, respectivamente).

Recentemente, disfunção endotelial tem sido identificada como uma anormalidade precoce na doença cardiovascular aterosclerótica. Acredita-se que o evento inicial na formação do ateroma é a lesão de células endoteliais. A reparação do dano vascular é mediada por células progenitoras endoteliais (EPCs) derivadas da medula óssea e por células angiogênicas mielomonocíticas (MCACs). O interferon alfa induz a apoptose das EPCs e MCACs (24). Nos pacientes com lúpus os níveis de interferon correlacionam-se com a gravidade e atividade da doença, e pode ser a primeira citocina mediadora da aceleração da aterosclerose em pacientes com LESJ (25,26).

A proteína C reativa de alta sensibilidade (hs-PCR) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) tem sido descritos como importantes biomarcadores para DCV. Estudos sugerem que o TNF- α apresenta um importante papel na alteração do perfil lipídico em pacientes com lúpus (27–29).

Além das citocinas inflamatórias citadas acima, os pacientes com LES apresentam anormalidades nos parâmetros que não são rotineiramente mensurados na prática clínica como, por exemplo, a proteína MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein-1*), que é uma citocina que recruta monócitos em células da camada subendotelial em lesões ateroscleróticas (30). Marks et al. (2010) (38) avaliaram a concentração plasmática de MCP-1, de crianças e adolescentes portadores de lúpus com e sem nefrite lúpica (NL) e compararam com os níveis de adolescentes e adultos saudáveis. Observou-se que não houve diferença significativa de MCP-1 plasmático entre os pacientes com lúpus e o controle, porém, os níveis de MCP-1 plasmáticos estavam mais elevados nas crianças em relação aos adultos controles ($p<0,04$). Os autores afirmam que o MCP-1 pode ter um importante papel na etiopatogenia do LES e NL e poderia ser utilizado como um potente biomarcador de atividade da doença (31).

O tecido adiposo secreta uma variedade de citocinas com funções autócrinas/parácrinas e endócrinas que influenciam o peso corporal e o metabolismo de glicose e lipídeos. Essas citocinas, que incluem a leptina, a adiponectina, a interleucina – 6 (IL-6), o TNF- α e a resistina são coletivamente conhecidas como adipocitocinas ou adipocinas. Leptina e adiponectina são as duas principais adipocinas secretadas pelo tecido adiposo (32). A leptina atua no sistema imune como uma citocina pró-inflamatória por promover a proliferação e ativação dos linfócitos T contribuindo para a inflamação sistêmica em doenças reumáticas autoimunes, entre elas o LES. Estudos com animais demonstram que a deficiência de leptina está associada ao aumento da susceptibilidade à infecção e a redução da inflamação (33). Estudos em adultos com LES relatam altos níveis séricos de leptina (33–36).

Em contrapartida a adiponectina e, um hormônio secretado pelo estômago, a grelina, apresentam um papel benéfico contra o desenvolvimento de DCV. A adiponectina atua principalmente nos músculos esqueléticos e no fígado aumentando a sensibilidade à insulina. Tem sido sugerido que a adiponectina seja um potente protetor no desenvolvimento da aterosclerose por inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias e gerar macrófagos resistentes ao estímulo pró-inflamatório (32,37). A grelina atua como hormônio estimulador do apetite e tem um importante papel na regulação da secreção de insulina, possui ação benéfica nos eventos cardiovasculares por diminuir a calcificação vascular e inibir a produção de citocinas de células endoteliais (38,39).

Obesidade e subnutrição, especialmente a deficiência de micronutrientes, são geralmente descritos em pacientes com LES e podem estar envolvidos no processo inflamatório da doença. Porém pouco se sabe a respeito da fisiopatologia dessas alterações nutricionais e seu impacto na patogênese do LES (40,41). A obesidade é um fator de risco adicional para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e está correlacionada com a diminuição da qualidade de vida, podendo levar a limitações funcionais, dores, fadiga, diabetes mellitus, entre outros e, parece ser frequente em pacientes com LES (42). Altos valores de índice de massa corporal (IMC) estão associados com o aumento de fatores adversos para DCV como a PCR e o fibrinogênio (43). Da mesma maneira, Sazliyan et al. (2011) (44) demonstraram que altos valores de circunferência da cintura foram preditores independentes do aumento da espessura da camada íntima da carótida em adultos com lúpus.

O processo de inflamação crônica existente no LES está diretamente associado a alterações no perfil lipídico e no metabolismo de lipoproteínas. Além disso, existem evidências de que algumas drogas utilizadas no tratamento do LES podem levar ao desenvolvimento de fatores de risco adversos para doenças cardiovasculares como, aumento da pressão arterial e concentração sérica de lipídeos. Por exemplo, os corticosteroides estão relacionados com a indução de dislipidemia, intolerância à glicose e hipertensão arterial por aumentar a resistência vascular sistêmica, o volume extracelular e a contração cardíaca (45,46).

Nascif et al. (2007) avaliaram a função endotelial e os fatores de risco para aterosclerose em 35 adolescentes com LESJ e em 27 controles pareados para sexo e idade. Colesterol total e frações, triglicérides, creatinina, glicemia de jejum, anticorpos anticardiolipina e homocisteína plasmática, bem como a dose de corticóide oral acumulada foram considerados para se estabelecer os fatores de risco para aterosclerose. Não houve diferença estatística entre os dois grupos em relação à função endotelial. Os pacientes tinham maiores concentrações de colesterol total ($p = 0.02$), VLDL ($p = 0.01$), triglicérides ($p = 0.01$), e homocisteína ($p < 0.001$) comparados aos controles. Sessenta e oito por cento dos pacientes apresentaram hiperhomocisteinemia, embora eles não tenham encontrado nenhuma correlação entre esses valores e a dilatação de fluxo (47).

Até o momento, nenhum fator ou grupo de fatores de risco tem sido forte o suficiente para prever quais pacientes terão eventos cardiovasculares ateroscleróticos (8,11). Daviglius et al. (2004) (12) sugerem que mulheres jovens saudáveis apresentam perfil favorável para um menor risco de mortalidade por DCV, mas o acúmulo de fatores de risco aumenta a mortalidade. Portanto, mulheres jovens com LESJ são particularmente mais vulneráveis ao diagnóstico subestimado e ao tratamento inadequado. No entanto, o desenvolvimento de novos biomarcadores de laboratório associados aos fatores de risco cardiovasculares, além de novas técnicas de imagem, tem ajudado a melhorar prognósticos para pacientes com LES. Convencionalmente, o estudo da resposta autoimune tem sido realizado através da análise da presença ou não de anticorpos individuais em fluidos biológicos.

Análises em larga escala dos perfis de expressão de proteínas estão se tornando uma importante ferramenta na investigação de várias patologias associadas a resposta autoimune. Compreender os complexos processos bioquímicos que ocorrem dentro dos organismos vivos requer não apenas elucidação das entidades moleculares envolvidas nesse processo, mas também a sua distribuição espacial dentro do organismo em

qualquer momento do ciclo de desenvolvimento. Estudos que correlacionam a ingestão alimentar, a expressão de proteínas e metabólitos estão elucidando diversos mecanismos patológicos e auxiliando suas terapêuticas.

As plataformas metodológicas “ômicas” permitem um estudo completo, em larga escala, de DNA (genômica), mRNA (transcriptômica), proteínas (proteômica) e metabólitos (metabolômica) (48). Atualmente, estes tipos de análises em larga escala são ferramentas importantes na investigação de diversas patologias e na nutrição molecular. A análise proteômica permite a identificação simultânea de diferentes auto-anticorpos (proteínas) no soro de pacientes portadores de doenças auto-imunes e pode ser utilizada na identificação e caracterização de proteínas de tecidos e fluidos biológicos em modelos animais ou de pacientes portadores de LES e, essas proteínas, tem o potencial de serem biomarcadores específicos e relevantes para a saúde revelando precocemente indicadores para a evolução clínica do LES (49). A abordagem geral fornecida pela proteômica pode se correlacionar com uma variedade de fenótipos do paciente, como o regime terapêutico, a evolução da doença e a ingestão alimentar (50–53).

A abordagem *shotgun* para análise proteômica, associada à marcação química de peptídeos com *tags* isobáricas, permite tanto a identificação de proteínas como a quantificação da sua abundância por espectrometria de massas. Um *kit* disponível comercialmente e denominado iTRAQ® (*Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation*), contém isóbaros que reagem com aminas primárias de peptídeos. É possível realizar a análise simultânea de até 8 amostras diferentes. Os peptídeos marcados de cada amostra são misturados, separados por cromatografia líquida bidimensional (troca iônica seguida de fase reversa) e analisados usando espectrometria de massas (MS e MS/MS). Devido à característica isobárica dos reagentes, o mesmo peptídeo proveniente de diferentes amostras é identificado como um único pico no espectro MS. Após dissociação induzida por colisão, os peptídeos marcados com os diferentes iTRAQs são fragmentados liberando o íon repórter (cuja razão m/z é conhecida: 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119 ou 121) e os íons das séries b e y, entre outros fragmentos. A área do pico do íon repórter é utilizada para avaliar a abundância relativa do peptídeo e, consequentemente, da proteína da qual ele é derivado (54,55).

Diante do exposto, a técnica da proteômica identifica combinações de proteínas que servirão como guia para tratamento de grupos com diferentes respostas metabólicas e estado nutricional (56).

2. JUSTIFICATIVA

O presente estudo se justifica devido à importância em se descrever grupos metabólicos específicos (um grupo de fatores de risco para aterosclerose) e suas associações com dados da proteômica e do estado nutricional em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico Juvenil fornecendo, dessa forma, parâmetros mais precisos no regime terapêutico clínico e nutricional.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Comparar grupos de pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico Juvenil (LESJ) e controles saudáveis apresentando diferentes valores para o conjunto de fatores de risco (homocisteína, vitamina B12, folato, lipoproteínas, proteína C reativa de alta sensibilidade (hsPCR), MCP-1, interferon- α , TNF- α , leptina, adiponectina e grelina) com o perfil proteômico e de ingestão alimentar.

3.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

-Descrever a concentração sérica de um grupo de fatores de risco para aterosclerose (homocisteína, vitamina B12, folato, lipoproteínas, proteína C reativa de alta sensibilidade (hsPCR), MCP-1, interferon- α , TNF- α , leptina, adiponectina e grelina) em pacientes pediátricos femininos com LESJ comparando-os a um grupo controle saudável pareado para idade e estadiamento puberal.

-Descrever medidas do estado nutricional (peso, estatura, circunferência da cintura e IMC) em pacientes pediátricos femininos com LESJ comparando-os a um grupo controle saudável pareado para idade e estadiamento puberal.

-Descrever o perfil proteômico em diferentes clusters de pacientes pediátricos femininos com LESJ, que apresentem resultados semelhantes para todos os metabólitos descritos acima, comparando-os a um cluster com controles saudáveis pareado para idade e estadiamento puberal.

-Comparar a concentração sérica de um grupo de fatores de risco para aterosclerose e medidas do estado nutricional em clusters de pacientes pediátricos femininos com LESJ definidos pela dose de corticoide ingerida.

4. METODOLOGIA E CASUÍSTICA

4.1. MODELO DO ESTUDO

Estudo analítico, observacional, transversal de caso controle. Este é um estudo considerado analítico por comparar dois grupos, observacional por não fazer nenhuma interferência na realidade dos participantes, transversal por avaliar apenas um momento e de caso controle por analisar diferentes variáveis em um grupo portador de uma patologia e, para fins de comparação, um grupo saudável (57).

4.2 SELEÇÃO DOS PARTICIPANTES

Foram recrutadas 19 adolescentes do sexo feminino com idade entre 10 a 18 anos, 11 meses e 29 dias com diagnóstico de LESJ de acordo com os critérios do *American College of Rheumatology* (ACR) (58,59) que recebiam tratamento clínico no Ambulatório de Colagenoses Infantis do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, Departamento de Puericultura e Pediatria. Para o grupo controle, foram recrutadas 39 (dois controles para um caso) adolescentes saudáveis pareadas para sexo, idade e estadiamento puberal que faziam atendimento de rotina pediátrica no serviço de Atenção Primária do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto – Vila Lobato. A amostra de pacientes com LESJ foi de conveniência mas, a amostra de pacientes saudáveis foi baseada por Schlesselman e definida por alfa 0,05 e beta 10% (60).

4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Pacientes que cumprem pelo menos 4 dos 11 critérios para o diagnóstico de Lúpus Eritematoso Sistêmico;
- Idade entre 10 e 18 anos;
- Sexo feminino

4.4 CRITÉRIOS DE NÃO INCLUSÃO

- Pacientes cujos responsáveis não autorizaram a coleta de sangue;

- Pacientes com infecção;
- Pacientes tabagistas;
- Pacientes gestantes.

4.5 APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA E AUXÍLIO FINANCEIRO

O estudo e o termo de consentimento, foram aprovados pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), número do processo: 9946/2010. O projeto teve auxílio financeiro para o seu desenvolvimento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – 16141-7).

4.6 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Primeiramente foram analisados os prontuários de todas as adolescentes portadoras de LESJ atendidas no ambulatório de Colagenoses Infantis do HCFMRP USP e de adolescentes saudáveis atendidas no serviço de Atenção Primária do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto – Vila Lobato para verificar quais se enquadravam nos critérios de inclusão do estudo. Aquelas que tinham o perfil requerido pelo estudo foram contatadas e, após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, foram coletados dados clínicos das portadoras de LESJ nos prontuários médicos e feitas ligações para a coleta de dois Recordatórios de 24 horas para todas as participantes.

Todas as participantes estavam de jejum de 12 horas para coleta de amostras de sangue. As amostras foram centrifugadas por 15 min a 1500rpm a 4°C para a extração de soro e plasma e depois foram estocadas a -80°C até as análises laboratoriais. Após a coleta de sangue, as participantes seguiam para a etapa de avaliação nutricional (Recordatório de 24 horas - R24h) e antropometria) e avaliação clínica para a classificação do estadiamento puberal e aferição da pressão arterial. Os protocolos utilizados na coleta de dados para LESJ e controle seguem em ANEXOS A e B, respectivamente (Figura 2).

Figura 2- Delineamento do estudo

4.7 CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Inicialmente as participantes e seus responsáveis tomavam ciência de todas as etapas do projeto e, se fosse de comum acordo, ambas assinavam o termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO C).

4.8 COLETA DE SANGUE

Foram coletados 4 tubos de tampa roxa com K2EDTA de 4mL para a extração de plasma e *buffy coat*; 1 tubo amarelo com gel de 5mL e 2 tubos amarelos com gel de 3,5mL para a extração de soro. A coleta de sangue foi realizada por flebotomistas treinados. Tal procedimento oferece risco mínimo (Categoria 2; 45 CFR 46.110) e é rotineiramente feito no Hospital das Clínicas da FMRP-USP e no serviço de Atenção Primária do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto.

4.9 AVALIAÇÃO CLÍNICA

Para o grupo estudo, nutricionista e médico reumatologista pediatra, coletaram dados como critérios diagnósticos para o LESJ, comorbidades associadas ao LES (atual

ou prévia) e medicamentos utilizados desde o diagnóstico de LESJ até a última consulta antes da coleta de sangue (dose/dose acumulada, tempo de uso) nos prontuários dos pacientes na semana antecedente a coleta de dados. A avaliação clínica foi realizada por médicos pediatras reumatologistas através dos índices de danos cumulativos da doença – SLICC/ACR-DI (*Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index*) (61) e de atividade da doença – SLEDAI (*Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*) (62) no dia da coleta de dados. Para ambos os grupos, o estadiamento puberal e a aferição da pressão arterial, foram realizados no ato da coleta por profissional devidamente treinado.

4.10 AVALIAÇÃO NUTRICIONAL

A avaliação nutricional, medidas antropométricas e história alimentar, foi feita por uma nutricionista devidamente treinada.

4.10.1 ANTROPOMETRIA

O peso, a estatura e a circunferência da cintura foram aferidos após 12 horas de jejum logo após a coleta de sangue.

4.10.1.1 PESO

Os pacientes foram pesados descalços, em balança eletrônica da marca Plenna[®], sendo descontados os gramas correspondentes às roupas padronizadas para pesagem do hospital. Antes da aferição do peso de cada paciente, a balança foi previamente tarada e sua precisão verificada por meio da pesagem de um peso padronizado, conforme técnicas descritas por Heymsfield et al. (1994) (63).

4.10.1.2 ESTATURA

A estatura foi medida por meio de haste graduada fixada em superfície plana, tendo em sua extremidade um marcador adaptável ao alto da cabeça, conforme técnicas descritas por Heymsfield et al. (1994) (63).

4.10.1.3 ÍNDICE DE MASSA CORPORAL (IMC)

A partir das medidas de peso e altura, foi calculado o índice de massa corporal (IMC) ou de Quetelet (peso, em kg/altura², em m) (64).

4.10.1.4 CIRCUNFERÊNCIA DA CINTURA (CC)

A medida foi avaliada com o paciente em pé, utilizando uma fita métrica inextensível com graduação máxima de 150 cm e mínima de 0,1 cm. Esta circunferência foi aferida aplicando a fita firmemente ao redor da cintura, ao nível da parte mais estreita do tronco, ou seja, na menor curvatura localizada entre a crista ilíaca e a última costela, a leitura será feita no momento da expiração, conforme técnicas descritas por Heyward et al. (1996) (65).

4.10.2 RECORDATÓRIO DE 24 HORAS (R-24hs)

Foram colhidos três Recordatórios de 24 horas de cada paciente, sendo dois por via telefônica (66), na semana antecedente a coleta de dados e um no dia da coleta. Para minimizar vieses inerentes ao instrumento, os Recordatórios colhidos via telefone foram checados por nutricionista treinada e, para evitar sub e/ou super relato foi utilizado um álbum fotográfico contendo figuras com diferentes tamanhos de porções (pequeno, médio e grande) em todos os recordatórios aplicados como conferência no dia da coleta de dados (67) . Esses R-24hs foram calculados por um *software* especialmente desenvolvido para analisar a ingestão dietética da população brasileira (Dietwin® versão 1997-2002) com foco em energia, folato, vitamina B12 e piridoxina (vitamina B6). O programa tem valores nutricionais de tabelas brasileiras, de análises da composição de alimentos fornecida pelos fabricantes e, para alimentos não disponíveis no banco de dados, a tabela do USDA, 2003 (*the United States Department of Agriculture Agriculture*) foi acrescentada no programa. Após o cálculo pelo Dietwin®, os resultados foram analisados pelo método *Multiple Source Method (MSM)*, para permitir a estimativa do consumo dietético habitual utilizando recordatório de 24 horas e remover a variabilidade intrapessoal (68).

A variância intrapessoal de cada grupo de alimento foi removida por meio de técnicas de modelagem estatística incorporadas ao software MSM proposta pela *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition* (EPIC). Este software foi desenvolvido para estimar a ingestão habitual de nutriente e alimentos de indivíduos e grupos populacionais com base nos dados provenientes de dois ou mais inquéritos alimentares de curto prazo (como o R24horas), coletados em cada indivíduo da amostra (69). O MSM calcula primeiro a ingestão dietética de indivíduos e então constrói a distribuição populacional baseada nos dados individuais (69,70). O processo compreende três etapas com base em, pelo menos, duas medições feitas em curto prazo.

A inserção dos dados de ingestão de alimentos no computador foi efetuada duas vezes, para garantir a correta digitação. Antes da entrada dos dados, todas as informações foram revisadas para a identificação de possíveis erros na descrição dos alimentos ou preparações consumidos, bem como no tamanho e na quantidade das porções.

4.11 ANÁLISES LABORATORIAIS

4.11.1 HOMOCISTEÍNA

Os níveis plasmáticos de homocisteína foram avaliados em imunoensaio pela técnica do IMMULITE® 1000, usando reagentes e anticorpos. A determinação da homocisteína implicou em uma etapa preliminar de tratamento manual da amostra. A homocisteína plasmática é liberada de suas proteínas ligantes e convertida a S-adenosil-homocisteína (SAH) por uma incubação de 30 min a 37°C na presença de S-adenosil-L-homocisteína hidrolase e DTT. A amostra tratada e a fosfatase alcalina marcada com anticorpo anti-SAH foram introduzidos simultaneamente em uma unidade teste contendo uma esfera de poliestireno revestida com SAH. Durante 30 minutos de incubação, a SAH contida na amostra do paciente concorre com a SAH-imobilizada pela ligação com a fosfatase alcalina conjugada com anticorpo anti-SAH. A enzima conjugada não ligada foi removida por lavagem em centrífuga. O substrato (dioxi-etano) foi adicionado, e o procedimento continuou como descrito pelo imunoensaio típico no Manual do Operador. Valores entre 6 a 12µmol/L foram adotados como referência para níveis de homocisteína (71).

4.11.2 VITAMINA B12 E FOLATO

A dosagem da concentração de vitamina B12 sérica foi feita em imunoensaio competitivo de fase sólida com enzimas quimicoluminosas pela técnica do IMMULITE® 1000. Essa dosagem requer uma etapa preliminar de desnaturação pelo calor para que a vitamina B12 presente no soro do paciente se liberte das proteínas de transporte por incubação à 100°C na presença de dithiothreitol e cianeto de potássio. Após a desnaturação as amostras seguiram dois ciclos de 30 minutos para a adição dos reagentes dentro da unidade teste, a qual continha uma pérola de poliestireno revestida com análogo de vitamina B12. Foi adotado o intervalo de 128pmol/L a 648pmol/L de acordo com o manual do fabricante.

A concentração de folato sérico foi dosada com imunoensaio competitivo de fase líquida marcado com uma proteína quimioluminescente imobilizada *in situ* com um sistema de detecção anti-ligante pela técnica do IMMULITE® 1000. A amostra foi pré-preparada também em fervura à 100°C para a liberação do folato sérico das proteínas de transporte. Após a etapa preliminar, a amostra e os reagentes presentes no kit, foram introduzidos em uma unidade teste a qual continha uma esfera de poliestireno revestida com anticorpo monoclonal de murino específico para a proteína ligante de ácido fólico e foram incubados por 30 minutos à 37°C com agitação intermitente. Durante esse tempo, o ácido fólico marcado com ligante para uma quantidade limitada de proteína de ligação do ácido fólico foi capturada pelo anticorpo na esfera. O análogo não ligado é então removido por lavagem em centrífuga. Foi adotado o intervalo de 3ng/mL a 17ng/mL de acordo com o manual do fabricante.

4.11.3 PERFIL LIPÍDICO

A I Diretriz de prevenção da aterosclerose na infância e adolescência preconizada pela Sociedade Brasileira de Cardiologia desde 2005 foi utilizada para definir perfis lipídicos anormais nas crianças e adolescentes participantes do estudo. Hipercolesterolemia foi definida quando os níveis de colesterol de jejum >170mg/dl e para lipoproteína de baixa densidade, níveis $\geq$ 130mg/dl. Hipertrigliceridemia foi considerada quando os valores foram $\geq$ 130mg/dl. Hiperlipidemia foi definida quando

com níveis de triglicérides sérico eram $\geq 130\text{mg/dl}$ e/ou colesterol sérico $>170\text{mg/dl}$ (72).

O colesterol total e os triglicérides foram analisados através do método de determinação enzimática (esterase/oxidase e oxidase/peroxidase, respectivamente) (Wiener Lab®), a lipoproteína de baixa densidade (LDL) e a lipoproteína de alta densidade (HDL) foram dosadas por método de precipitação colorimétrico (Wiener Lab®). Esses ensaios foram realizados por laboratórios do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, como parte de rotina clínica.

4.11.4 PROTEÍNA C REATIVA (PCR)

A PCR do soro dos participantes do estudo foi dosada com um kit de elevada sensibilidade em ensaio quantitativo, imunométrico quimioluminescente em fases sólida e líquida, no analisador IMMULITE 1000. A fase sólida, a pérola, é revestida com um anti-ligante de PCR e a fase líquida consiste de um anticorpo monoclonal murino anti-PCR marcado com ligante e uma fosfatase alcalina. As amostras dos pacientes, previamente diluídas, foram incubadas junto com o reagente e a pérola por 30 minutos. Durante este período, a PCR da amostra forma um complexo tipo sanduíche com o anti-ligante da pérola e o anticorpo monoclonal murino anti-PCR do reagente. A amostra do paciente não ligada e o conjugado enzimático foram removidos por uma lavagem com centrifugação. Desta forma, o substrato quimioluminescente é adicionado à unidade teste e o sinal gerado é proporcional à enzima ligada. Valores inferiores a 3mg/L foram adotados como referência, conforme manual do fabricante.

4.11.5 MONOCYTE CHEMOATTRACTANT PROTEIN-1 (MCP-1)

O marcador inflamatório MCP-1 do soro dos participantes do estudo foi mensurado em ensaio de ligação enzima – anticorpo em aparelho de ELISA com leitura de 450nm de acordo com dados do fabricante (ELISA Kit, RayBiotech, Human MCP-1). Foram adotados valores de referência no intervalo de confiança de $32,7 - 146,6\text{ng/L}$, conforme dados da literatura científica (73).

4.11.6 INTERFERON-ALFA (IFN- α)

O marcador inflamatório IFN- α do soro dos participantes do estudo foi mensurado em ensaio de ligação enzima – anticorpo, em aparelho de ELISA, com leitura de 450nm, de acordo com dados do fabricante. Foram adotados valores de referência no intervalo de confiança de 12,5pg/mL a 500pg/mL, conforme dados da sensibilidade do kit.

4.11.7 FATOR DE NECROSE TUMORAL – α (TNF – α)

O teste do fator de necrose tumoral – α no soro dos participantes do estudo foi realizado em ensaio imunométrico em fase sólida quimioluminescente para a dosagem no analisador IMMULITE 1000, com um ciclo de 60 minutos de incubação. Como valor de referência foi adotado valores inferiores a 8,1pg/mL, conforme dados do manual do fabricante.

4.11.8 LEPTINA

Os ensaios para medir a leptina foram feitos de acordo com as instruções determinadas pelo fabricante com o soro dos pacientes e dos controles (ELISA Kit, Millipore, Human Leptin®). A absorbância foi medida a 450nm com um leitor de placa ELISA (Versamax ROM v3.13). A concentração foi determinada usando programa de computador SoftMax Pro 4.3. Os ensaios foram feitos com sensibilidade de 0.78 - 100ng/ml. Como valores de referência, foram adotados os intervalos de confiança de 1,7ng/mL – 100,6ng/mL e 0 – 43,8ng/mL para os indivíduos com LES e os controles saudáveis, respectivamente, conforme dados da literatura científica (74).

4.11.9 ADIPONECTINA

Ensaios por ELISA também foram realizados para dosar adiponectina, de acordo com o método determinado pelo fabricante (ELISA Kit, Millipore, Human Adiponectin®). As amostras do soro dos participantes do estudo foram pré-diluídas a 1:500 antes de serem adicionadas na placa de ELISA. A leitura da absorbância foi

medida a 450nm com um leitor de placa ELISA (Versamax ROM v3.13). A concentração foi determinada pelo software SoftMax Pro 4.3. O ensaio tem a sensibilidade de 0,2ng/mL. Como valores de referência, foram adotados os intervalos de confiança de 2,2µg/mL – 43,1µg/mL e 3,9 - 46µg/mL para os indivíduos com LES e os controles saudáveis, respectivamente, conforme dados da literatura científica (74).

4.11.10 GRELINA

Essa citocina foi dosada em ensaio por ELISA, de acordo com o método determinado pelo fabricante (ELISA Kit, Millipore, Human Ghrelin). A leitura da absorbância foi medida a 450nm com um leitor de placa ELISA (Versamax ROM v3.13). A concentração foi determinada pelo software SoftMax Pro 4.3. Como valores de referência, foram adotados os intervalos de confiança de 0pg/mL – 789,6pg/mL e 0pg/mL – 275,3pg/mL para os indivíduos com LES e os controles saudáveis, respectivamente, conforme dados da literatura científica (74).

4.11.11 PROTEÔMICA

A análise do perfil proteômico plasmático foi realizada utilizando abordagem *shotgun proteomics* e quantificação relativa com isóbaros iTRAQ (*Isobaric Tag For Relative And Absolute Quantitation*).

A Figura 3 ilustra todas as etapas realizadas na metodologia proteômica.

Figura 3- Desenho experimental para análise proteômica utilizando marcação com iTRAQ em amostras de plasma dos clusters Controle Melhor Perfil Metabólico (CMPPM – iTRAQ 115), Controle Pior Perfil Metabólico (CPPM – iTRAQ 116), Lúpus Melhor Perfil Metabólico (LMPM – iTRAQ 113), Lúpus Pior Perfil Metabólico (LPPM – iTRAQ 114) e do Controle Interno (iTRAQ 117).

4.11.12 DOSAGEM DE PROTEÍNAS EM SOLUÇÃO

A dosagem de proteínas foi realizada utilizando o método de Bradford (1976) (75), com soro albumina bovina como padrão.

4.11.13 DELIPIDAÇÃO DAS AMOSTRAS

Alíquotas de plasma foram delipidadas por centrifugação a $15.000 \times g \times 30$ minutos, à temperatura de 22°C. Após a centrifugação, a fase inferior foi coletada cuidadosamente evitando a mistura com a fase superior correspondente aos lipídeos, como descrito por Fu et al. (76).

4.11.14 CONFECÇÃO DOS POOLS DE PLASMA

A análise estatística *Clustering algorithm* (κ -cluster) foi utilizada para formar os clusters metabólicos (pools), tanto no grupo LES quanto no grupo controle. Para formar os clusters, foram escolhidas 4 variáveis que se apresentaram estatisticamente diferentes entre os grupos Lúpus e Controle Saudável: Homocisteína (Hcy), Folato, Fator de Necrose Tumoral – alfa (TNF- α) e Proteína - C- reativa (PCR). Com esses parâmetros, o resultado foi de 4 clusters (pools): 2 clusters para cada grupo: Cluster Lúpus Melhor Perfil Metabólico (LMPM), Cluster Lúpus Pior Perfil Metabólico (LPPM), Cluster Controle Melhor Perfil Metabólico (CMPM) e Cluster Controle Pior Perfil Metabólico (CPPM). Para o cluster “Melhor Perfil Metabólico”, foi considerado o resultado de níveis de folato normais, Hcy, TNF- α e PCR baixos; e cluster “Pior Perfil Metabólico”, o resultado de níveis de folato baixos e Hcy, TNF- α e PCR altos. Cada pool foi composto por um volume equivalente a 1000 μ g de proteína de cada paciente.

4.11.15 REMOÇÃO DAS PROTEÍNAS MAIS ABUNDANTES

Cerca de 3000 μ g de proteína de cada *pool* foram submetidos à imunodepleção. Antes de serem imunodepletados um volume equivalente a 100 μ g de lisozima de galinha (Sigma®) foi adicionado em cada pool. Essa proteína foi escolhida por não fazer parte do plasma humano, ter um peso molecular conhecido (14,307Da) e ser

facilmente reconhecida nos espectros gerados pelo espectrômetro de massa. O objetivo de se adicionar lisozima no início do experimento é para controlar e corrigir as perdas de massa que podem ocorrer nas amostras durante o processo. Em seguida, os pools de plasma foram tratados para remoção das duas proteínas mais abundantes no plasma – albumina (69kDa) e IgG (50kDa), usando o *Kit Proteomep Immunoaffinity Albumin and IgG depletion* (Sigma®), conforme protocolo do fabricante. A quantificação das proteínas foi realizada pelo método de Bradford (75).

4.11.16 MARCAÇÃO DAS AMOSTRAS COM ISÓBAROS ITRAQ

Após a imunodepleção, as amostras seguiram a etapa de marcação com os isóbaros iTRAQ.

Primeiramente, um volume total que continha 750µg de proteína de cada cluster (LPPM, LMPM, CMPM e CPPM) foi utilizado para a precipitação com acetona. Além das amostras, também foi analisado um controle interno de variação do experimento composto por um quarto ($\frac{1}{4}$) da quantidade total de proteínas de cada cluster (187,5µg). A finalidade do controle interno era monitorar a marcação das proteínas pelos isóbaros do iTRAQ. As amostras proteicas foram precipitadas com acetona gelada, numa proporção de 1:6, v/v para eliminar contaminantes. As amostras foram mantidas a -20°C por 18h. A seguir, os tubos foram centrifugados em baixa rotação e a acetona foi removida. Os precipitados foram ressuspensos em 1µL de SDS 2% e 20µL de solução tampão bicarbonato de trietilamônio 0,5M. As amostras foram reduzidas com 2µL de 50nM de tris-(2-carboxietil) fosfina (TCEP). A mistura foi incubada por 1h a 60°C. A seguir, para alquilação, foi adicionado 1µL de iodoacetamida 84mM. Os tubos foram incubados por 30 minutos à temperatura ambiente. Após redução e alquilação das proteínas, as amostras foram submetidas à hidrólise enzimática com tripsina (na proporção de 1:50, enzima:substrato) por 24h a 37°C.

Para marcação com iTRAQ, os isóbaros foram diluídos em 70µL de etanol e, a seguir, foram transferidos para cada amostra que continha 100µg de proteína cada uma, como se segue: 113 (LPPM), 114 (LMPM), 115 (CPPM), 116 (CMPM) e 117 (controle interno). Os tubos foram mantidos por 1h à temperatura ambiente, sob agitação constante, acidificados pela adição de 5µL de ácido fórmico para interromper a reação.

Os conteúdos de cada pool foram combinados em um único tubo e submetido à concentração em SpeedVac (77).

4.11.17 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE TROCA CATIÔNICA (SCX)

A amostra obtida no passo anterior (combinação das amostras marcadas com os diferentes isóbaros) foi centrifugada a $\sim 10.000 \times g \times 5$ min. O sobrenadante foi aplicado em sistema HPLC com coluna de troca iônica PolyLC (Polysulfoethyl A), tendo como solvente A 5mM formiato de amônio, pH 3,2 contendo acetonitrila 20% (v/v) e solvente B 100 mM formiato de amônio pH 3,2 contendo acetonitrila 20% (v/v). A cromatografia foi desenvolvida com 10% do solvente B por 5 min, seguido de um gradiente linear de 10 a 100% de solvente B em 70 min, com fluxo de 1 mL/min. Foram coletadas 40 frações de 1mL cada, que foram secas em SpeedVac. A seguir, as amostras foram ressuspensas em 25 μ L de solução de ácido fórmico 0,1M contendo acetonitrila 5% (v/v), centrifugadas a $\sim 10.000 \times g \times 5$ min. Alíquotas de 20 μ L foram transferidas para *vials* apropriados e submetidos à cromatografia líquida de ultraperformance (UPLC) *on line* com um espectrômetro de massa.

4.11.18 ESPECTROMETRIA DE MASSA – ESI – Q - TOF

As amostras foram aplicadas em um nano-Acquity-UPLC (Waters) com coluna cromatográfica de fase reversa C18, acoplado “on line” a um espectrômetro de massa ESI-Q-TOF.

4.11.19 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS

Os espectros obtidos foram processados e submetidos a um banco de dados para identificação das proteínas. O software Mascot Distiller foi utilizado para a identificação e a busca foi realizada no banco de dados SwissProt, taxonomia Homo sapiens (human). Para excluir identificações falso positivas (FDR) os espectros de massas foram submetidos ao banco de dados no modo reverso, nível de significância estatística de $p < 0.05$, que corresponde a um erro permitido de 5% e a um escore para

peptídeos >35, com pelo menos 3 íons da série y ou b consecutivos para o sequenciamento do peptídeo por CID-MS/MS (77).

4.11.20 ANÁLISE QUANTITATIVA DOS DADOS

O software Scaffold Q+S (Proteome Software Inc., Portland, OR) foi usado para quantificar os íons do iTRAQs. Peptídeos foram quantificados utilizando a intensidade do íon repórter centróide. Os valores quantitativos para as proteínas foram derivados somente de peptídeos únicos. As razões das proteínas foram calculadas como a mediana de todas as razões dos peptídeos em cada pool, dadas na forma de *fold change* (a razão entre as intensidades dos clusters LMPM/CMPM e LPPM/CMPM) (77).

Para a avaliação da qualidade do experimento, as intensidades dos íons *repórteres* referentes a cada proteína identificada foram exportadas para uma planilha de excel para que fosse feito os cálculos da variação da intensidade dos íons de cada cluster em relação ao controle interno. Proteínas que apresentaram uma variação maior que 30% em relação ao controle interno foram excluídas da análise.

Para a análise quantitativa foi utilizado apenas os cluster CMPM, LMPM e LPPM. O cluster CPPM não foi considerado nessas análises pois continha apenas um indivíduo e foi considerado um *outlier* sendo excluído das análises estatísticas posteriores.

4.11.21 ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA

Foram selecionadas para análise de bioinformática as proteínas estatisticamente diferentes entre os clusters CMPM, LMPM e LPPM.

4.11.22 GO –TERM FINDER (GENE ONTOLOGY - GO)

A análise de bioinformática realizada através do GO-TermFinder (Gene Ontology) classificou as proteínas diferencialmente expressas quanto a processos biológicos, função molecular e componente celular. Foram aceitos os termos resultantes de valores de p significativo ($p < 0,001$).

4.11.23 METACORE

O MetaCore é um software que realiza análises funcionais de dados genômicos e proteômicos. Através dele podem ser realizadas análises de moléculas, de alvos de drogas, vias de sinalização, processos biológicos, interação entre proteína-proteína, entre outras. As proteínas diferencialmente expressas foram analisadas pelo MetaCore quanto as redes de processo de proteínas, mapas de vias e redes de processos biológicos.

4.11.24 VALIDAÇÃO DAS PROTEÍNAS ENCONTRADAS

A técnica de Western Blot foi utilizada para validar algumas das proteínas encontradas pela espectrometria de massas que se apresentaram diferentes estatisticamente entre os clusters LMPM, LPPM e CMPM. A proteína hemopexina foi validada por estar relacionada com resposta de defesa, resposta inflamatória, regulação da qualidade biológica e resposta ao estresse na análise feita pelo *Gene Ontology*.

A partir dos resultados de área e porcentagem de cada banda feita pela análise de densitometria, foi calculado o *fold change* dos *clusters* LMPM e LPPM em relação ao *cluster* CMPM o qual foi considerado como referência.

4.11.25 PREPAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA WESTERN BLOT

As amostras de plasma delipidadas foram agrupadas de acordo a formação dos pools descrita no item 4.11.14, porém, os *clusters* foram subdivididos conforme ilustrado abaixo para essa etapa (Figura 4).

Figura 4- Amostras para Western Blot

Após a divisão dos *clusters*, seguiu-se com a imunodepleção usando o Kit *Proteoep Immunoaffinity Albumin and IgG depletion kit* (Sigma®) conforme protocolo do fabricante. As proteínas das amostras resultantes foram quantificadas pelo método de Bradford (75) e, foi aplicado 10µg de proteína em cada poço do gel de 4 a 12% para confirmar a remoção das proteínas mais abundantes. Uma foto representativa do gel de eletroforese está em ANEXO D.

4.11.26 SEPARAÇÃO DAS PROTEÍNAS POR ELETROFORESE SDS-PAGE, TRANSFERÊNCIA POR WESTERN BLOT E IMUNODETECÇÃO DAS PROTEÍNAS ALVO.

A eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foi utilizada para a separação e caracterização das proteínas presentes nas amostras. As amostras foram ressuspendidas em tampão de eletroforese 2X e, um total de 15µg de proteínas de cada grupo foi aplicado no gel de poliacrilamida Amersham ECL Gel 4-12% (GE

Healthcare). A eletroforese foi realizada com 160V por 12 minutos, para a entrada do tampão no gel (pré-corrida) e 160 V por 1 hora para a separação das proteínas no gel.

A transferência das proteínas do gel para a membrana foi feita em 1 hora e 30 minutos a 300mA. Para verificar se as proteínas foram carregadas corretamente no gel e transferidas, a membrana foi corada com solução de Ponceau e o gel corado com Coomassie Blue.

Após a transferência, as membranas foram bloqueadas com leite em tampão TBST (Tris 20mM, NaCl 138mM, 0,1% Tween-20, pH 7,6). O anticorpo primário anti-hemopexina (Abcam) 1:500 foi diluído em TBST com 0,3% de leite e a membrana incubada nesta solução, seguido de incubação com anticorpo secundário anti-mouse IgG 1:10000 (GE-Healthcare). A membrana foi revelada utilizando o kit de quimioluminescência ECL Western Blot Detection Reagents (GE-Healthcare) em sistema de obtenção de imagem digital ImageQuant 350.

As imagens geradas foram submetidas à análise por densitometria de imagem pelo software Image J versão 1.48. Os resultados da área e porcentagem foram transformados em *fold change* para possibilitar a comparação com os resultados da proteômica.

4.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A comparação entre variáveis do grupo de pacientes com LESJ e do grupo controle foi feita pela análise de covariância (ANCOVA), sendo fatores ou covariáveis a idade, IMC e a ingestão de vitaminas quando aplicável. A correlação entre variáveis de ambos os grupos foi feita por correlação de Pearson.

A análise estatística de *Clustering algorithm* (*k-cluster*) foi utilizada para separar os pacientes com LESJ em dois *clusters* de corticóide, o *cluster* 1 (n = 4) era o grupo de maior dose de corticóide 0,52mg/kg/dia e o *cluster* 2 (n = 15) era o grupo com menor dose de corticoide 0,10mg/kg/dia. Além disso, foi aplicado *k-cluster* nos grupos LES e controle para separar os indivíduos em variáveis metabólicas: *Cluster* Lúpus Melhor Perfil Metabólico (LMPM), *Cluster* Lúpus Pior Perfil Metabólico (LPPM), *Cluster* Controle Melhor Perfil Metabólico (CMPM) e *Cluster* Controle Pior Perfil Metabólico (CPPM). Antropometria e parâmetros bioquímicos foram comparados entre os clusters LMPM, LPPM e CMPM pela análise de covariância (ANCOVA) corrigida pela idade, IMC, ingestão de folato e vitamina B12 quando aplicável. As intensidades dos *clusters*

CMPM, LMPM e LPPM encontradas com o resultado do iTRAQ foram comparadas com ANOVA corrigida para Bonferroni. Os resultados dos clusters encontrados com a técnica Western Blot foram comparados com ANOVA corrigidos para Tukey.

Para as análises estatísticas foram utilizados os *softwares* SPSS®, versão 20.0, Dietwin® 2011, MASCOT Distiller™ (Proteome software), Scaffold Q+ (Proteome Software Inc, Portland, OR), GO-Term Finder (Gene Ontology), Metacore™ e Image J. O nível de significância considerado foi de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

A média de idade das pacientes do grupo LESJ quando receberam o diagnóstico da doença foi de $10,8 \pm 2,7$ anos e, o tempo de duração da doença até a coleta de dados, foi de $6,3 \pm 2,6$ anos. O grupo de pacientes com LESJ apresentou um SLEDAI (mediana, mínimo e máximo) de 4 (0 – 29) e um SLICC de 0 (0 – 9). De acordo com os critérios do SLEDAI, 16 das 19 participantes do estudo estavam com o LES em atividade sendo que desses 16, 4 estavam em atividade importante da doença (SLEDAI > 12) e 3 em atividade moderada da doença (SLEDAI: entre 5 e 12) (22). Baseado no SLICC, seis participantes já apresentavam algum dano consequente da patologia do LES. Dezesesseis participantes com LES faziam uso de prednisona por $5 \text{ anos} \pm 3 \text{ anos}$. Quatorze dos dezoito participantes estavam em uso de prednisona nos seis meses anteriores a coleta de dados e a média dessa dose foi de $0,25 \pm 0,20 \text{ mg/kg}$. A dose acumulada do pulso de metilprednisolona teve uma distribuição não normal, tendo como mediana, mínimo e máximo os valores 60mg/kg ($1 \text{ mg/kg} - 3857 \text{ mg/kg}$). As características clínicas dos pacientes com LES estão representadas no Gráfico 1.

Gráfico 1- Características clínicas do grupo LES

Não houve diferença estatística na pressão sistólica e diastólica entre os grupos LES e controle (sistólica: $105,51 \pm 2,26$ *versus* $102,80 \pm 1,61$, $p = 0,354$; diastólica: $68,5 \pm 2,19$ *versus* $69,00 \pm 1,56$; $p = 0,860$). O IMC, CC, concentrações séricas de homocisteína, TNF- α , hs-PCR, triglicérides e vitamina B12 foram estatisticamente maiores no grupo LES comparado aos saudáveis e a estatura e a concentração sérica de folato foram menores no LES em relação ao controle (Tabela 1). Não houve diferença estatística na ingestão de energia, folato e vitamina B6 entre os grupos. Apenas a ingestão de vitamina B12 foi maior no grupo LES comparada ao controle (lúpus $3,14\mu\text{g}/\text{dia} \pm 0,17 \mu\text{g}/\text{dia}$ *vs* controles $2,65 \mu\text{g}/\text{dia} \pm 1,8 \mu\text{g}/\text{dia}$; $p = 0,029$). Os resultados de ingestão de ambos os grupos estão representados na Tabela 2.

Tabela 1- Idade, parâmetros antropométricos e bioquímicos no grupo LES e controles saudáveis

Variáveis	Grupo LES (n=19)	Grupo controle (n=39)	p
Idade	15,7 ± 1,95	14,9 ± 2,5	0,117
Peso (kg) [§]	59,03 ± 2,47	54,75 ± 1,72	0,16
Estatura (m) [§]	1,54 ± 0,14	1,61 ± 0,01	0,000*
IMC (kg/m ²) [§]	24,51 ± 0,91	20,92 ± 0,63	0,001*
CC (cm) [§]	79,74 ± 1,90	72,55 ± 1,32	0,002*
Vitamina B12 (pmol/L) [¥]	613,37 ± 53,28	452,78 ± 35,98	0,018*
Folato (ng/L) [€]	12,11 ± 0,66	13,94 ± 0,45	0,028*
Homocisteína (mmol/L) [¥]	8,53 ± 0,45	7,26 ± 0,30	0,029*
Colesterol total (mg/dL) [¶]	166,10 ± 8,19	150,97 ± 5,70	0,145
HDL (mg/dL) [¶]	37,92 ± 2,73	43,92 ± 1,83	0,075
LDL (mg/dL) [¶]	98,02 ± 6,88	90,77 ± 4,56	0,389
Triglicérides (mg/dL) [¶]	168,22 ± 22,58	79,23 ± 15,71	0,002*
Leptina (ng/mL) [¶]	11,02 ± 4,08	15,04 ± 2,75	0,455
Adiponectina (ng/mL) [¶]	11,08 ± 1,05	8,58 ± 0,71	0,061
Grelina (pg/mL) [¶]	366,66 ± 33,37	311,57 ± 22,09	0,188
TNF - α (pg/mL) [¶]	8,96 ± 0,50	6,89 ± 0,34	0,001*
IFN - α (pg/mL) [¶]	121,20 ± 29,77	75,25 ± 18,25	0,206
PCR (mg/L) [¶]	4,41 ± 0,71	0,83 ± 0,48	0,000*
MCP-1 (pg/mL) [¶]	246,42 ± 38,01	173,82 ± 25,33	0,126

*p < 0.05.

Valores expressos em média ± desvio padrão. A diferença entre as médias foi calculada por ANCOVA ajustada por: §, idade; ¥, idade, IMC e ingestão de vitamina B12; €, idade, IMC e ingestão de folato; ¶, idade e IMC.

IMC = Índice de Massa Corporal

CC = Circunferência da Cintura

HDL = Lipoproteína de alta densidade.

LDL = Lipoproteína de baixa densidade.

TNF - α = Fator de Necrose tumoral - α .

IFN - α = Interferon - α .

hsPCR = Proteína C-reativa de alta sensibilidade.

MCP-1 = Proteína de quimioatração de monócitos -1.

Tabela 2- Consumo de energia e vitaminas obtido pelos três R24hs e analisados pelo *Multiple Source Method* nos grupos LES e controle

Variáveis	Grupo LES n = 19	Grupo Controle n = 39	RDA*	P**
Calorias (Kcal/dia)	1566,02 ± 76,02	1594,58 ± 52,02	ND	0,766
Vitamina B12 (µg/dia)	3,14 ± 0,17	2,65 ± 0,12	1,8	0,029*
Folato (µg/dia)	83,91 ± 9,64	77,30 ± 6,59	300	0,588
Vitamina B6 (mg/dia)	0,62 ± 0,56	0,60 ± 0,38	1,0	0,771

**p < 0.05.

*RDA – *Recommended Dietary Allowances in Dietary Reference Intake*.

ND – Não determinado.

Não houve correlação significativa entre a homocisteína e a média da dose de corticóide dos seis meses anteriores à coleta de dados ($r = 0,072$, $p = 0,807$), entre homocisteína e a dose acumulada de corticóide ($r = -0,488$, $p = 0,090$), entre homocisteína e SLICC e SLEDAI ($r = -0,275$, $p = 0,255$; $r = -0,214$, $p = 0,378$, respectivamente), entre triglicérides e dose acumulada de corticóide ($r = -0,155$, $p = 0,613$) e, entre triglicérides e MCP-1 ($r = 0,385$, $p = 0,114$) no grupo LES. No grupo controle, não houve correlação entre triglicérides e TNF- α ($r = 0,001$, $p = 0,995$) e entre triglicérides e MCP-1 ($r = -0,126$, $p = 0,464$).

Não houve correlação significativa, tanto no grupo LESJ quanto no grupo controle, entre homocisteína e folato sérico (lúpus: $r = 0,002$, $p = 0,995$, controle: $r = -0,197$, $p = 0,230$) homocisteína e vitamina B12 sérica (lúpus: $r = -0,313$, $p = 0,192$, controle: $r = -0,053$, $p = 0,750$), homocisteína e folato ingerido (lúpus: $r = 0,006$, $p = 0,982$, controle: $r = -0,138$, $p = 0,407$), homocisteína e vitamina B12 ingerida (lúpus: $r = 0,071$, $p = 0,771$, controle: $r = -0,065$, $p = 0,698$), vitamina B12 sérica e ingestão de folato (lúpus: $r = -0,051$, $p = 0,835$, controle: $r = -0,018$, $p = 0,917$), vitamina B12 sérica e ingestão de vitamina B12 (lúpus: $r = 0,236$, $p = 0,331$, controle: $r = 0,153$, $p = 0,359$), folato sérico e ingestão de folato (lúpus: $r = 0,359$, $p = 0,131$, controle: $r = -0,074$, $p = 0,661$), folato sérico e ingestão de vitamina B12 (lúpus: $r = 0,164$, $p = 0,502$, controle: $r = 0,194$, $p = 0,244$).

Houve correlação significativa no grupo LES entre triglicérides e a dose de corticóide dos últimos seis meses anteriores à coleta de dados ($r = 0,830$, $p = 0,00$) e entre triglicérides e TNF- α ($r = 0,518$, $p = 0,023$).

Foi aplicada a análise estatística de κ -cluster para separar os indivíduos com LESJ em dois clusters distintos de dose de corticóide. Um cluster era composto por

participantes com maior dose de corticóide (*Cluster* 1 = 0,52mg/kg/dia) e o outro *cluster* era composto por indivíduos com menor dose de corticóide (*Cluster* 2 – 0, 10mg/kg/dia) ($p = 0,000$) (Tabela 3).

Tabela 3- Pressão sistólica e diastólica, dados antropométricos e bioquímicos nos clusters de corticóide de participantes com LES

Variáveis	<i>Cluster</i> 1 (n = 4)	<i>Cluster</i> 2 (n = 15)	p
Pressão Sistólica (mmHg)	115,02 ± 5,02	105,45 ± 2,53	0,094
Pressão Diastólica (mmHg)	73,85 ± 3,35	68,17 ± 1,69	0,135
Peso (kg) [§]	54,14 ± 6,29	61,42 ± 3,19	0,307
Estatura (cm) [§]	1,51 ± 0,03	1,56 ± 0,01	0,136
IMC (Kg/m ²) [§]	23,05 ± 2,45	25,02 ± 1,24	0,479
CC (cm) [§]	77,22 ± 4,40	80,31 ± 2,23	0,536
Vitamina B12 (pmol/L) [€]	488,89 ± 164,67	651,09 ± 64,32	0,416
Folato (ng/L) [¶]	14,14 ± 1,37	11,63 ± 0,67	0,11
Homocisteína (mmol/L) [€]	10,58 ± 1,69	8,09 ± 0,66	0,226
Colesterol Total (mg/dL) [¥]	188,55 ± 13,76	153,31 ± 6,93	0,024*
HDL (mg/dL) [¥]	33,75 ± 4,11	38,76 ± 2,24	0,290
LDL (mg/dL) [¥]	107,88 ± 17,48	95,63 ± 6,24	0,521
Triglicérides (mg/dL) [¥]	330,3 ± 50,21	104,98 ± 25,31	0,000*
Leptina (ng/mL) [¥]	16,03 ± 3,73	14,25 ± 1,88	0,674
Adiponectina (ng/mL) [¥]	10,49 ± 1,98	10,56 ± 0,99	0,977
Ghrelin (pg/mL) [¥]	452,28 ± 69,83	324,33 ± 30,85	0,095
TNF - α (pg/mL) [¥]	9,06 ± 1,15	8,54 ± 0,57	0,690
IFN - α (pg/mL) [¥]	108,85 ± 64,30	134,31 ± 44,66	0,751
PCR (mg/L) [¥]	7,11 ± 2,37	3,69 ± 1,19	0,205
MCP-1 (pg/mL) [¥]	203,91 ± 121,5	244,79 ± 51,14	0,762

* $p < 0.05$.

Valores expressos em média ± desvio padrão. A diferença entre as medias foi calculada por ANCOVA ajustada por: §: idade; €: idade, IMC e ingestão de vitamina B12; ¶: idade, IMC e ingestão de folato; ¥: idade e IMC.

A análise da proteômica com iTRAQ permitiu a identificação de 86 proteínas plasmáticas pelo software MASCOT, porém pela análise quantitativa do software SCAfold foi possível obter 10 proteínas com intensidades estatisticamente diferentes entre os *clusters* (Tabela 4). O *cluster* controle de melhor perfil foi utilizado como referência, pois são os indivíduos saudáveis que melhor representam um perfil metabólico ideal em relação aos parâmetros homocisteína, folato sérico, PCR e TNF- α .

Algumas variáveis antropométricas e bioquímicas foram comparadas entre os *clusters* CMPM, LMPM e LPPM (Tabela 4). A tabela 5 descreve as proteínas que estavam com expressão aumentada ou diminuída nos *clusters* LMPM e LPPM em relação ao *cluster* CMPM. Para o *cluster* LPPM todas as proteínas estavam *down regulated*, com exceção da proteína haptoglobina que estava *up regulated* e para o *cluster* LMPM todas as proteínas estavam *up regulated*, exceto o fibrinogênio de cadeia alfa.

A porcentagem de cobertura de identificação das proteínas que se apresentaram estatisticamente diferentes entre os *clusters* está em ANEXO E.

Tabela 4: Antropometria e parâmetros bioquímicos nos *clusters* CMPM, LMPM e LPPM.

Variáveis	CMPM	LMPM	LPPM	p
Peso [¶]	53,98 $\pm$ 9,54	61,54 $\pm$ 13,72	45,85 $\pm$ 15,48	0,05
Estatura [¶]	1,60 $\pm$ 0,07	1,56 $\pm$ 0,06	1,44 $\pm$ 0,10	0,001*, 0,001**
IMC [¶]	20,83 $\pm$ 3,33	24,97 $\pm$ 5,26	21,51 $\pm$ 4,33	0,001**
CC [¶]	72,34 $\pm$ 7,97	80,21 $\pm$ 9,08	75 $\pm$ 8,48	0,001**
Homocisteína [¥]	7,27 $\pm$ 1,82	8,59 $\pm$ 2,38	8,85 $\pm$ 3,04	0,026**
Vitamina B12 [¥]	454,33 $\pm$ 220,08	623,52 $\pm$ 216,64	561 $\pm$ 446,89	0,014**
Folato [€]	13,94 $\pm$ 2,56	12,37 $\pm$ 3,22	10,3 $\pm$ 1,27	0,000***
Colesterol [§]	152,28 $\pm$ 31,90	157,23 $\pm$ 42,34	190,5 $\pm$ 47,37	0,204
HDL [§]	43 (25-99)	37 (27-61)	35 (32-38)	0,222
LDL [§]	88,93 $\pm$ 27,23	95,53 $\pm$ 27,49	108,5 $\pm$ 14,84	0,508
Triglicérides [§]	90 (25-226)	92 (31-725)	234 (105-363)	0,000*, 0,014**
TNF- α	7,08 $\pm$ 2,41	8,22 $\pm$ 2,14	12,32 $\pm$ 3,71	0,006*, 0,027**
PCR	0,42(0,30-4,60)	1,30(0,30-7,80)	16,65(16,30-17)	0,003*, 0,001**, 0,0012***

*p<0.05 entre CMPM e LPPM.

** p<0.05 entre CMPM e LPPM.

*** p<0.05 entre LPPM e LMPM.

The difference between means was calculated by ANCOVA adjusted by: age[¶]; age, BMI and cyanocobalamin intake[¥]; age, BMI and folate intake[€]; age and BMI[§].

Tabela 5- Proteínas identificadas pelo software MASCOT nos *clusters* CMPM, LMPM e LPPM

Proteínas Identificadas	Código de Acesso (MASCOT)	Massa Molecular (Dalton)	Intensidade de - CMPM	Intensidade de - LPPM	Intensidade - LMPM	p (ANOVA Bonferroni)	Função
Apolipoproteína A-I	APOA1_HUMAN	31 kDa	1	0,8	2,1	< 0,0001	Transporte reverso do colesterol
α-2-macroglobulina	A2MG_HUMAN	163 kDa	1	0,8	1,3	< 0,0001	Inibição de Protease
Alfa-1-antitripsina	A1AT_HUMAN	47 kDa	1	0,7	1,5	0,0084	Inibição de Protease
Apolipoproteína E	APOE_HUMAN	36 kDa	1	0,9	2,2	0,0086	Transporte de vitaminas lipossolúveis e colesterol
Ceruloplasmina	CERU_HUMAN	122 kDa	1	0,9	1,6	0,00058	Transporte de cobre e ferro
Complemento C3	CO3_HUMAN	187 kDa	1	0,8	1,3	0,0014	Ativação do sistema complemento
Fibrinogênio de cadeia alfa	FIBA_HUMAN	95 kDa	1	0,7	0,9	0,0047	Coagulação e fibrinólise
Haptoglobina	HPT_HUMAN	45 kDa	1	1,3	2,5	< 0,0001	Metabolismo do ferro - antioxidante
Hemopexina	HEMO_HUMAN	52 kDa	1	0,9	1,7	0,001	Metabolismo do ferro - antioxidante
Sorotransferrina	TRFE_HUMAN	77 kDa	1	0,8	1,7	< 0,0001	Metabolismo do ferro - antioxidante

*p < 0.05.

As intensidades foram comparadas entre os três *clusters* por ANOVA corrigida para Bonferroni.

As dez proteínas diferencialmente expressas entre os *clusters* foram categorizadas para componente celular (por exemplo: exossomo e vesícula extracelulares), função molecular (proteínas de ligação, regulação de enzimas, inibição de protease) e processo biológico (resposta inflamatória, resposta de defesa) pelo *Gene Ontology*.

A análise do *Gene Ontology* para componente celular classificou todas as proteínas diferencialmente expressas nos termos exossomo e vesícula extracelular. A maioria das proteínas (80%) também foram classificadas como componente de vesículas citoplasmáticas. As proteínas apolipoproteína A-I e apolipoproteína E foram relacionadas com partícula de lipoproteína de alta densidade (HDL), quilomícrons, partícula de lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) e partícula de lipoproteína rica em triglicérides (Tabela 6).

Tabela 6- Resultado do *Gene Ontology* (Componente celular) para as proteínas diferencialmente expressas.

Termo do Gene Ontology para Componente Celular	Número de genes relacionados ao termo (%)	Valor de p	Genes anotados para o termo
Micropartículas de sangue	90	5,68E-20	TRFE_HUMAN, HEMO_HUMAN, CERU_HUMAN, APOE_HUMAN, CO3_HUMAN, HPT_HUMAN, APOA1_HUMAN, A2MG_HUMAN, FIBA_HUMAN
Exossoma extracelular	100	4,46E-11	TRFE_HUMAN, HEMO_HUMAN, CERU_HUMAN, APOE_HUMAN, CO3_HUMAN, A1AT_HUMAN, HPT_HUMAN, APOA1_HUMAN, A2MG_HUMAN, FIBA_HUMAN
Vesícula extracelular	100	4,46E-11	TRFE_HUMAN, HEMO_HUMAN, CERU_HUMAN, APOE_HUMAN, CO3_HUMAN, A1AT_HUMAN, HPT_HUMAN, APOA1_HUMAN, A2MG_HUMAN, FIBA_HUMAN
Vesícula citoplasmática	80	6,53E-09	TRFE_HUMAN, HEMO_HUMAN, APOE_HUMAN, A1AT_HUMAN, HPT_HUMAN, APOA1_HUMAN, A2MG_HUMAN, FIBA_HUMAN
Vesícula endocítica	50	3,63E-07	TRFE_HUMAN, HPT_HUMAN, HEMO_HUMAN, APOA1_HUMAN, APOE_HUMAN
Grânulos de secreção	50	1,52E-06	TRFE_HUMAN, APOA1_HUMAN, A2MG_HUMAN, FIBA_HUMAN, A1AT_HUMAN
Grânulos de plaquetas-alfa	30	1,94E-05	A2MG_HUMAN, FIBA_HUMAN, A1AT_HUMAN
Lipoproteína discoidal de alta densidade	20	2,82E-05	APOA1_HUMAN, APOE_HUMAN
Quilomícron	20	3,30E-04	APOA1_HUMAN, APOE_HUMAN
Lipoproteína de muito baixa densidade	20	5,90E-04	APOA1_HUMAN, APOE_HUMAN
Lipoproteína rica em triglicerídeos	20	0,00059	APOA1_HUMAN, APOE_HUMAN

A busca no GO para função molecular mostrou que as proteínas alfa-2 macroglobulina, complemento C3, alfa-1-antitripsina, apolipoproteína A-I e apolipoproteína E, apresentam função molecular de reguladoras de enzimas. O termo do Gene Ontology com valor de p mais significativo para função molecular foi o relacionado ao aumento da atividade de fosfatidilcolina-esterol O-aciltransferase (enzima responsável por converter colesterol e fosfatidilcolina em ésteres colesterol e lisofosfatidilcolinas). Esta função estava relacionada com os genes das proteínas apolipoproteína A-I e apolipoproteína E. Estas duas últimas proteínas citadas também foram relacionadas com ligação ao receptor de partículas de lipoproteína. As proteínas alfa-2 macroglobulina, complemento C3 e alfa-1-antitripsina apresentaram genes anotados para atividade regulatória / inibitória de endopeptidases (Tabela 7).

Tabela 7- Resultado do *Gene Ontology* (Função molecular) para as proteínas diferencialmente expressas.

Função Molecular	Número de genes relacionados ao termo (%)	Valor de p	Genes anotados para o termo
Ativador da enzima fosfatidilcolina aciltransferase	20	5,27E-05	APOA1_HUMAN, APOE_HUMAN
Inibidor de enzimas	40	0,00013	APOA1_HUMAN, A2MG_HUMAN, CO3_HUMAN, A1AT_HUMAN
Regulador de enzimas	50	0,00018	APOA1_HUMAN, APOE_HUMAN, A2MG_HUMAN, CO3_HUMAN, A1AT_HUMAN
Ligação de proteínas	100	0,00027	TRFE_HUMAN, HEMO_HUMAN, CERU_HUMAN, APOE_HUMAN, CO3_HUMAN, A1AT_HUMAN, HPT_HUMAN, APOA1_HUMAN, A2MG_HUMAN, FIBA_HUMAN
Ligação ao receptor de lipoproteínas	20	0,00035	APOA1_HUMAN, APOE_HUMAN
Inibidor de endopeptidases	30	0,00087	A2MG_HUMAN, CO3_HUMAN, A1AT_HUMAN
Regulador de endopeptidases	30	0,00092	A2MG_HUMAN, CO3_HUMAN, A1AT_HUMAN

Os processos biológicos de regulação da resposta ao estresse, qualidade biológica, resposta de defesa e resposta inflamatória foram processos que se destacaram na análise do *Gene Ontology* correlacionando, respectivamente, em 90%, 90%, 80% e 60% das proteínas diferencialmente expressas e, estavam associadas aos genes da hemopexina e complemento C3. Essa informação reforça a presença dessas proteínas como antioxidantes e nos processos inflamatórios.

A maioria das proteínas agrupadas no processo biológico de resposta inflamatória (Apo A I, Apo E, alfa-2-macroglobulina, alfa-1-antitripsina e complemento) estão mais expressas no lúpus de melhor perfil em relação ao lúpus de pior perfil de acordo com a proteômica quantitativa realizada neste trabalho, indicando um papel protetor dessas proteínas no cluster LMPM .

Os processos biológicos que envolvem ativação plaquetária, coagulação sanguínea, homeostase, liberação de HDL e esterificação do colesterol possuem respectiva correspondência de 60%, 60%, 60%, 20% e 20%, das proteínas diferencialmente expressas e estavam envolvidas com os genes da Apo A I e Apo E, reforçando novamente a atuação dessas lipoproteínas com o metabolismo lipídico e possível envolvimento com doenças cardiovasculares (Tabela 8).

Tabela 8- Resultado do *Gene Ontology* (Processo biológico) para as proteínas diferencialmente expressas.

Processo Biológico	Porcentagem de genes relacionados a função molecular	Valor de p	Genes anotados para o termo
Degranulação de plaquetas	50	2,85E-09	TRFE_HUMAN, APOA1_HUMAN, A2MG_HUMAN, FIBA_HUMAN, A1AT_HUMAN
Ativação de plaquetas	60	4,42E-09	TRFE_HUMAN, APOA1_HUMAN, APOE_HUMAN, A2MG_HUMAN, FIBA_HUMAN, A1AT_HUMAN
Transporte mediado de vesículas	90	9,93E-09	TRFE_HUMAN, HEMO_HUMAN, APOE_HUMAN, CO3_HUMAN, A1AT_HUMAN, HPT_HUMAN, APOA1_HUMAN, A2MG_HUMAN, FIBA_HUMAN
Resposta de defesa	80	5,50E-07	HEMO_HUMAN, APOE_HUMAN, CO3_HUMAN, A1AT_HUMAN, HPT_HUMAN, APOA1_HUMAN, A2MG_HUMAN, FIBA_HUMAN
Coagulação sanguínea	60	7,33E-07	TRFE_HUMAN, APOA1_HUMAN, APOE_HUMAN, A2MG_HUMAN, FIBA_HUMAN, A1AT_HUMAN
Hemeostase	60	7,97E-07	TRFE_HUMAN, APOA1_HUMAN, APOE_HUMAN, A2MG_HUMAN, FIBA_HUMAN, A1AT_HUMAN
Resposta a ferimentos	70	1,23E-06	TRFE_HUMAN, APOA1_HUMAN, APOE_HUMAN, A2MG_HUMAN, FIBA_HUMAN, CO3_HUMAN, A1AT_HUMAN
Resosta inflamatória	60	3,95E-06	HPT_HUMAN, APOA1_HUMAN, APOE_HUMAN, A2MG_HUMAN, CO3_HUMAN, A1AT_HUMAN
Regulação dos níveis dos fluidos corporais	60	4,64E-06	TRFE_HUMAN, APOA1_HUMAN, APOE_HUMAN, A2MG_HUMAN, FIBA_HUMAN, A1AT_HUMAN
Cicatrização de feridas	60	6,27E-06	TRFE_HUMAN, APOA1_HUMAN, APOE_HUMAN, A2MG_HUMAN, FIBA_HUMAN, A1AT_HUMAN
Regulação da qualidade biológica	90	8,77E-06	TRFE_HUMAN, HEMO_HUMAN, CERU_HUMAN, APOE_HUMAN, CO3_HUMAN, A1AT_HUMAN, APOA1_HUMAN,

			A2MG_HUMAN, FIBA_HUMAN
Regulação negativa da atividade catalítica	60	1,69E-05	HPT_HUMAN, APOA1_HUMAN, APOE_HUMAN, A2MG_HUMAN, CO3_HUMAN, A1AT_HUMAN
Resposta ao estresse	90	2,37E-05	TRFE_HUMAN, HEMO_HUMAN, APOE_HUMAN, CO3_HUMAN, A1AT_HUMAN, HPT_HUMAN, APOA1_HUMAN, A2MG_HUMAN, FIBA_HUMAN
Exocitose	50	3,96E-05	TRFE_HUMAN, APOA1_HUMAN, A2MG_HUMAN, FIBA_HUMAN, A1AT_HUMAN
Regulação da ativação da cascata de proteínas	30	4,77E-05	A2MG_HUMAN, FIBA_HUMAN, CO3_HUMAN
Homeostase de íons	50	0,0003	TRFE_HUMAN, HEMO_HUMAN, APOA1_HUMAN, CERU_HUMAN, APOE_HUMAN
Resposta imune	40	0,0003	HEMO_HUMAN, A2MG_HUMAN, FIBA_HUMAN, CO3_HUMAN
Regulação do metabolismo de proteínas	70	0,00038	HEMO_HUMAN, APOA1_HUMAN, APOE_HUMAN, A2MG_HUMAN, FIBA_HUMAN, CO3_HUMAN, A1AT_HUMAN
Homeostase iônica do ferro celular	30	0,00072	TRFE_HUMAN, HEMO_HUMAN, CERU_HUMAN
Endocitose	50	0,00074	HPT_HUMAN, HEMO_HUMAN, APOA1_HUMAN, APOE_HUMAN, CO3_HUMAN
Liberação de lipoproteínas de alta densidade	20	0,0008	APOA1_HUMAN, APOE_HUMAN
Regulação positiva da esterificação do colesterol	20	0,001	APOA1_HUMAN, APOE_HUMAN

A análise das proteínas diferencialmente expressas realizada no Metacore gerou uma rede de processos biológicos, envolvendo os genes que codificam as proteínas α -2-macroglobulina, complemento C3 e apo A, que se correlacionam com o metabolismo de lipídios (Figura 5).

*Alfa-2-macroglobulina, Complemento C3 e Apo A I se apresentaram menos expressas no LPPM em relação ao LMPM e CMPM.

Figura 5- Rede gerada no Metacore envolvendo os genes que codificam as proteínas α -2-macroglobulina, complemento C3 e apo A.

Os mapas de vias englobando as proteínas diferencialmente expressas deste estudo foram pesquisados no Metacore e, os mapas que se destacaram com valor de p significativo estão representados no gráfico 2. As vias que podem estar relacionadas com risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares foram a via de transporte reverso do colesterol mediado pelo HDL e a interrupção da via complemento em microangiopatia trombótica, respectivamente (Figuras 6 e 7).

Gráfico 2- Análise de mapas de vias fornecida pelo Metacore para proteínas diferencialmente expressas entre os clusters CMPM, LMPM e LPPM

*As proteínas ApoA e ApoE estão mais expressas no cluster LPM em relação ao LPPM e foram colocadas no contexto de biologia de sistemas pelo programa Metacore.

Figura 6- Transporte reverso de colesterol mediado por HDL como resultado da busca por mapas de vias utilizando o Metacore.

*A proteína complemento C3 está mais expressa no cluster LMPM em relação ao LPPM e foi colocada em contexto de biologia de sistemas pelo programa Metacore.

Figura 7- Interrupção da via complemento em microangiopatia trombótica

A análise de redes geradas no Metacore das proteínas diferencialmente expressas selecionou a que mais se destacou com valor de p significativo, a via de sinalização da inflamação pela interleucina -6 (Figura 8).

*Alfa-2-macroglobulina, ceruloplasmina, complemento C3, hemopexina e alfa-1-antitripsina se apresentaram menos expressa no cluster LPPM em relação aos clusters LMPM e CMPM. Fibrinôgênio de cadeia alfa estava menos expresso nos clusters LMPM e LPPM em relação ao CMPM e a haptoglobina estava mais expressa nos dois clusters de indivíduos com LES em relação aos saudáveis.

Figura 8- Via de sinalização da inflamação pela IL-6

Com o Western Blot foi possível observar que a hemopexina estava significativamente mais expressa no cluster LMPM em relação ao cluster LPPM ($p = 0,042$) o que corrobora com os resultados da proteômica feita com ITRAQ (Gráfico 3).

Gráfico 3- Comparação do fold change da hemopexina entre os três clusters. Análise de expressão da hemopexina feita por Western Blot e as bandas quantificadas por densitometria pelo software Image J.

Resumidamente, os resultados das proteínas encontradas pela técnica da proteômica, estão representados na tabela 9.

Tabela 9- Resultados da proteômica correlacionados com a literatura

Proteínas identificadas	Situação associada ao maior risco para doenças cardiovasculares		
		LMPM	LPPM
Apolipoproteína A-I	Baixa expressão	↑	↓
Alfa-2-macroglobulina	Baixa expressão	↑	↓
Alpha-1-antitripsina	Baixa expressão	↑	↓
Apolipoproteína E	Baixa expressão	↑	↓
Ceruloplasmina	Baixa expressão	↑	↓
Complemento C3	Baixa expressão	↑	↓
Fibrinogênio cadeia alfa	Alta expressão	↓	↓
Haptoglobina	Baixa expressão	↑	↑
Hemopexina	Baixa expressão	↑	↓
Sorotransferrina	Baixa expressão	↑	↓

↑ = proteínas mais expressas em relação ao CPM.

↓ = proteínas menos expressas em relação ao CPM.

6. DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que as adolescentes com LESJ apresentaram maior IMC, circunferência da cintura, concentrações séricas de homocisteína, triglicérides, TNF- α , hs-PCR e, menor estatura e concentração de folato sérico quando comparadas com adolescentes saudáveis. Além disso, o *cluster* LPPM apresentou uma expressão diminuída das proteínas apolipoproteína AI, apolipoproteína E, alfa-2-macroglobulina, alfa-1-antitripsina, ceruloplasmina, complemento C3, hemopexina e sorotransferrina quando comparado aos *clusters* CMPM e LMPM.

Altos valores de IMC foram fortemente correlacionados com o aumento de fatores de risco para doenças cardiovasculares como PCR, fibrinogênio e adesão de moléculas intracelulares no estudo *Women's Healthy Study* (43). O excesso de peso observado em pacientes com LES em uso crônico de corticóide pode aumentar a probabilidade da ocorrência de doenças cardiovasculares, gerando um círculo vicioso, no qual o ganho de peso pode manter a doença em atividade e assim, requerer o uso contínuo de corticóides (45). A obesidade no LES está relacionada com a diminuição da qualidade de vida, com limitações funcionais, dores e fadiga (42).

Da mesma maneira que o IMC, altos valores de circunferência da cintura são fatores preditores da ocorrência do aumento da espessura da carótida em adultos com LES (44). As adolescentes portadoras de LESJ do presente estudo apresentaram maior circunferência da cintura quando comparadas com adolescentes saudáveis. Sabio et al. (2009) encontraram o mesmo resultado em adultos com LES com a presença de síndrome metabólica (78). Rizk et al. (2012) (79) concluíram que um alto valor de circunferência da cintura é um fator de risco para o desenvolvimento de aterosclerose. Ortiz et al. (2013) (80), não encontraram diferença significativa entre adolescentes com LESJ com e sem dislipidemia para circunferência da cintura.

As participantes com LESJ não apresentaram pressão sistólica e diastólica significativamente diferente em relação as saudáveis embora alguns estudos mostrem que 31% dos pacientes pediátricos com LESJ e 60% de adultos com LES apresentem hipertensão (81,82).

Neste estudo, as participantes com LESJ tinham a concentração de Hcy plasmática maior do que as saudáveis. Ortiz et al. e Boros et al., também encontraram a Hcy mais elevada no plasma de pacientes pediátricos com LESJ quando comparados

com controles saudáveis (80,83). Um estudo transversal com crianças e adolescentes com LESJ encontrou uma prevalência de 47% dos pacientes com Hcy elevada comparados com controles saudáveis (22). Von Feldt et al. (2006), encontraram a hiperhomocisteinemia positivamente correlacionada com altos escores de calcificação da artéria coronária ($\rho = 0,24$, $p = 0,002$) em pacientes adultos com LES, e consideraram a Hcy um marcador laboratorial para a ocorrência de doenças cardiovasculares ateroscleróticas em pacientes com LES (8). Elevada concentração de Hcy está correlacionada com disfunção endotelial, agregação plaquetária e aceleração da oxidação do LDL. Estudos prospectivos, tipo meta análises, sugerem que a redução da concentração de Hcy plasmática para 3 $\mu\text{mol/l}$, ou a redução em 25% da média da concentração de 12 $\mu\text{mol/l}$, pode reduzir o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares em 11 a 16% e de infarto em 19 a 24% dos casos (84).

Alguns estudos, incluindo o *Framingham Heart Study*, também encontraram que a alta concentração de Hcy está associada com aumento de doença arterial coronariana e acidente vascular cerebral, sendo considerada uma importante causa de morbimortalidade em pacientes com LES (16,85,86). Em adultos com LES, tanto a inflamação secundária a patologia quanto a elevada concentração de Hcy podem ser a causa do desenvolvimento precoce de aterosclerose (83).

As vitaminas B12, B6 e folato estão envolvidas no metabolismo da Hcy e, a concentração sérica de Hcy está inversamente relacionada com a ingestão dessas vitaminas (82). Minami et al. (2011), encontraram que a ingestão de vitamina B6, B12 e folato podem influenciar a concentração sérica de marcadores de inflamação como a PCR, citocinas e homocisteína (87).

As pacientes com LESJ do presente estudo apresentaram ingestão deficiente comparada com a recomendação (*Recommended Dietary Allowances* – RDA) de folato (27,54% da RDA) e vitamina B6 (64% da RDA) e ingestão superior a recomendada de vitamina B12 (170% da RDA) (88). O fato da ingestão de vitamina B12 ter sido maior no grupo LESJ comparado com o grupo controle pode explicar a maior concentração sérica dessa vitamina no LESJ. Alguns estudos com pacientes adultos com LES encontraram a vitamina B12 plasmática diminuída quando comparado ao controle (21,85,89), porém esses estudos não controlaram para ingestão alimentar.

Do Prado et al. (2006), não encontraram diferença estatística na concentração sérica de vitamina B12 entre crianças com LESJ e controles saudáveis (22). Apesar do consumo de folato não ter sido significativamente diferente entre os grupos do presente

estudo, a concentração sérica de folato foi estatisticamente menor no grupo LESJ comparada ao controle. Padjas et al. (2007), também encontraram menor concentração sérica de folato em adultos com LES (89). do Prado et al. (2006), confirmaram esses resultados com pacientes pediátricos com LESJ comparados a saudáveis (22). Refai et al. (2002), estudaram pacientes adultos com LES com e sem trombose comparados com controles saudáveis. Os autores não encontraram diferença significativa entre os grupos em relação a concentração sérica de folato, porém o folato foi significativamente associado com altas concentrações plasmáticas de Hcy (85).

Além da deficiência de vitaminas, a deficiência ou a redução na atividade da enzima MTHFR, comum no metabolismo da Hcy, resulta em hiperhomocistemia, homocistinúria e hipometioninemia. Pacientes com deficiência grave ou redução na atividade dessa enzima, principalmente durante a infância e adolescência, podem apresentar atraso no desenvolvimento, disfunção motora, convulsões, distúrbios psiquiátricos e neurológicos e também aumento do risco de complicações vasculares (90). A atividade reduzida da enzima MTHFR é um fator preditivo para estenose da artéria coronária independente de outros fatores de risco, como idade, tabagismo, hipercolesterolemia e hipertensão (90–92).

Entender a complexidade do metabolismo de diversos nutrientes interagindo entre si e com os genes, requer uma pesquisa ampla com a análise do fenótipo nutricional e o meio ambiente. Atualmente, a descrição da fisiologia humana como resposta a intervenção nutricional é chamada de “*nutritional phenotype*”. Esse modelo de pesquisa requer um novo tipo de delineamento experimental e ferramentas de bioinformática mais sofisticadas para facilitar a compreensão dos estudos no contexto de sistema biológico (93,94).

O processo inflamatório presente no LES é um fator de risco pró-aterogênico independente para alterações no perfil lipídico e no metabolismo de lipoproteínas em pacientes com LES com e sem atividade (45). Hayata et al. (2005), identificaram uma taxa de dislipidemia em 50 a 85% em crianças e adolescentes com LES (95). O presente estudo demonstrou que o triglicérides sérico estava aumentado nas pacientes com LESJ comparadas às saudáveis. Valdivielso et al. (2008) encontraram concentração sérica de triglicérides maior em adultos com LES comparado ao grupo controle (96). Ortiz et al. (2013) não encontraram diferença significativa em crianças com LESJ comparadas a saudáveis (80). No presente estudo, o triglicérides teve uma correlação positiva com a

dose de corticóide dos últimos 6 meses anteriores a coleta de dados ($r = 0,830$, $p = 0,00$) e com TNF- α ($r = 0,518$, $p = 0,023$).

Algumas drogas utilizadas no tratamento do LES como, por exemplo, os corticosteróides podem atuar como fatores de risco independentes para alterações da pressão arterial e do perfil lipídico (46) por aumentarem a produção hepática de VLDL, resultando na elevação da concentração de colesterol total, triglicérides, VLDL e LDL séricos (22). No presente estudo, criamos *clusters* de uso de corticóide para avaliar a interferência do medicamento na pressão sistólica e diastólica, nos dados antropométricos e nos dados bioquímicos. O colesterol total e o triglicéride estavam aumentados no *cluster* que recebia a dose maior de corticóide. Rho et al. (2008) encontraram que a dose de corticóide estava associada com o aumento sérico do triglicéride mesmo depois de ajustar para idade, sexo e SLEDAI em adultos com LES (46). Outros estudos em adultos com LES também sugerem a associação entre a dose de corticóide e o aumento do colesterol total e da espessura da carótida (97,98). Sarkissian et al. (2007), encontraram, em uma coorte longitudinal, que a redução da dose de corticóide acompanhou significativamente a redução de triglicéride plasmático ($p < 0,001$) (99).

Ardoin et al. (2007) observaram que o TNF – α é uma citocina inflamatória que estimula a secreção de proteínas de fase aguda e também está envolvido na alteração do perfil lipídico (28). As participantes com LESJ do presente estudo apresentaram concentração mais elevada de TNF – α comparadas às saudáveis. Outros estudos também encontraram o mesmo resultado (100,101).

Outra citocina que também é considerada como preditora de doenças cardiovasculares é a proteína C reativa de alta sensibilidade (hs-PCR) que é uma proteína de fase aguda presente em respostas inflamatórias (102,103). As adolescentes com LESJ do presente estudo apresentaram hs-PCR mais elevada no plasma em relação as adolescentes saudáveis. Sozeri et al. (2013), encontraram o mesmo resultado para pacientes pediátricos com LES. O potencial pró-aterogênico da hs-PCR inclui o aumento da adesão vascular, fibrinólise e disfunção endotelial (17). Ardoin et al. (2010), encontraram que a hs-PCR está associada ao aumento da mortalidade por doenças cardiovasculares em adultos com LES (16).

Com os resultados da proteômica foi possível observar 10 proteínas diferentes estatisticamente entre os *clusters* CMPM, LMPM e LPPM. Resumidamente, são proteínas envolvidas no processo inflamatório, transporte de vitaminas e minerais e

metabolismo de lipídeos. A análise *Gene Ontology (GO)* classificou 100% das proteínas encontradas em vesículas e exossomos extracelulares. Além disso, as proteínas apolipoproteína A-I e apolipoproteína E foram relacionadas com partícula de lipoproteína de alta densidade (HDL), com quilomícrons, com partícula de lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) e com partícula de lipoproteína rica em triglicérides.

Vesículas extracelulares são liberadas por diversas células no meio extracelular e são classificadas como ectossomo, exossomo e corpo apoptótico. Os exossomos estão presentes em todos os fluidos biológicos, como sangue, urina, tecido tumoral entre outros. É cada vez mais evidente que os exossomos desempenham importante função em processos como a coagulação, sinalização intercelular, patogênese, metabolismo de drogas e vacinas e, dessa forma, há um crescente interesse em se estudar a aplicação clínica dos exossomos para que possam ser usados tanto no prognóstico quanto na terapêutica de diversas patologias sendo assim, considerados biomarcadores para a saúde e doença (104,105). Um estudo de revisão em indivíduos com LES em terapia com células tronco mesenquimais, destaca o papel das vesículas extracelulares como importantes mediadores nesta nova forma de tratamento (106).

O GO classificou as proteínas encontradas de acordo com suas funções. A alfa-2-macroglobulina é uma proteína abundante no plasma, produzida pelo fígado, macrófagos, fibroblastos e células do córtex adrenal. Atua como inibidora de protease, da fibrinólise (inibe a plasmina e da calicreína) e da cascata de coagulação (inibe a trombina). A alfa-2-macroglobulina também faz transporte de fibroblastos, insulina e IL-1 β (107,108). No estudo de Ramacciotti et al. (2010) a alfa-2-macroglobulina estava mais expressa em pacientes com trombose venosa profunda concluindo que essa proteína pode influenciar a ocorrência de trombose através da inflamação, excreção de células e inibição da fibrinólise podendo ser um biomarcador para a trombose (109).

Complemento 3 é uma proteína com papel fundamental na ativação do sistema complemento, sendo necessária para ativação das vias clássicas e alternativas. A deficiência de C3 aumenta a suscetibilidade a infecção bacteriana. A subunidade C3b pode se ligar covalentemente, pela sua tio éster, em carboidratos de superfície ou agregados imunes. A degradação proteolítica do complemento C3 produz um mediador de processo inflamatório local que induz a contração de músculos lisos, aumenta a permeabilidade vascular, e causa a liberação de histamina a partir de mastócitos, leucócitos e basófilos (110). Watanabe et al. (2012) encontraram proteínas de fase aguda, fibrinogênio e haptoglobina e do sistema complemento 3, com expressão

aumentada em pacientes com artrite reumatóide (AR) (111). As proteínas encontradas são biomarcadores importantes na identificação do risco cardiovascular em pacientes com AR (111). Neste trabalho, o C3 se apresentou menos expresso no cluster Lúpus de Pior Perfil em relação ao controle. Rana et al. (2012) encontraram o mesmo resultado para essa proteína em crianças com LES comparadas a controles saudáveis (112).

Alfa-1-antitripsina é uma proteína inibidora de serina-proteases. Seu alvo principal é a elastase, mas também tem uma afinidade por plasmina e trombina. Sua função fisiológica importante é a proteção do trato respiratório inferior contra a destruição proteolítica por elastase de leucócitos humanos (113).

Apolipoproteína AI (Apo AI) é o principal constituinte protéico da lipoproteína de alta densidade (HDL). Também está presente nos quilomícrons secretados pelos enterócitos, porém já é rapidamente transferida para o HDL na corrente sanguínea (114). A Apolipoproteína E (Apo E) é uma lipoproteína sintetizada principalmente no fígado, mas também pode ser produzida em diversos tecidos como os rins e adrenais (115). É encontrada circulando no plasma com quilomícrons e lipoproteína de densidade intermediária (IDL) (116).

Apolipoproteína A I atua na homeostase do colesterol e, também, possui propriedades anti-inflamatórias tanto na inflamação aguda quanto crônica (117), podendo inibir a ação de citocinas pró-inflamatórias produzidas pelas células T. Os resultados do presente estudo mostram que a Apo AI está mais expressa no cluster Lúpus de Melhor Perfil em relação aos outros clusters. A apo A I foi quantificada com expressão reduzida no cluster Lúpus de Pior Perfil em relação ao cluster Controle Saudável. Rana et al. (2012), também encontraram a Apo AI menos expressa (resultado de proteômica) em pacientes pediátricos com LES em relação a indivíduos saudáveis (112). McMahon et al. (2006) demonstraram que baixa concentração plasmática de Apo AI estava associada com o aumento do risco de desenvolvimento de doença cerebrovascular e aterosclerose em mulheres adultas com LES (118).

Apolipoproteína E possui um importante papel na modulação da inflamação e oxidação, pois uma de suas funções está relacionada com citocinas pró- inflamatórias e anti-inflamatórias (119). Além disso, a Apo E está presente no metabolismo dos lipídeos e, sua deficiência pode levar ao aumento plasmático de colesterol e triglicérides e consequentemente de quilomícrons, VLDL e LDL remanescentes (120). Getz et al. (2009) afirmam que baixa concentração de apo E pode induzir a hipertrigliceridemia (121). Em relação ao sistema imune, um número crescente de estudos apontam para a

interação da Apo E suprimindo a proliferação de células T, a regulação dos macrófagos e a modulação da inflamação e oxidação (122).

Neste projeto, a Apo E se encontrava mais expressa no cluster LMPM em relação ao LPPM. O cluster LPPM estava com a apo E menos expressa que os indivíduos saudáveis. Orlacchio et al. (2008), fizeram a genotipagem do gene que codifica a Apo E em indivíduos adultos com LES e controles saudáveis e verificaram que a frequência dos alelos da Apo E não variou entre os grupos, porém os pacientes com LES que apresentavam o alelo Apo E 2 desenvolviam doenças arterial – coronarianas mais precocemente do que os indivíduos que não possuíam esse alelo (123).

Portanto, tanto a Apo A I quanto a Apo E estão envolvidas no metabolismo de lipídeos e a diminuição, seja na concentração plasmática ou uma alteração gênica, dessas lipoproteínas pode estar relacionada com o surgimento de doenças cardiovasculares em indivíduos com LES. É possível observar neste estudo, que os pacientes que se encontravam no cluster LPPM apresentavam a Apo A I e a Apo E menos expressa em relação aos indivíduos saudáveis e em relação ao LMPM, fato que pode sugerir risco para doenças cardiovasculares.

O GO relacionou os genes da Apo A I e da Apo E com a função da enzima fosfatidilcolina – esterol O-aciltransferase que também é conhecida como lecitina colesterol aciltransferase. Essa enzima também participa do metabolismo do colesterol convertendo o colesterol livre em ésteres de colesterol e, dessa forma, auxilia a produção de HDL (124).

Além das proteínas citadas acima, a ceruloplasmina, fibrinogênio de cadeia alfa, haptoglobina, hemopexina e a sorotransferrina, também apresentaram função de proteínas de ligação pela análise do *Gene Ontology*.

A ceruloplasmina é a principal proteína de transporte de cobre no sangue (cerca de 95%) com função antioxidante, e também desempenha um papel no metabolismo do ferro por promover a oxidação do Fe^{2+} em Fe^{3+} sem liberar espécies reativas de oxigênio, além de auxiliar no transporte no plasma em associação com a transferrina (125,126). Neste estudo, a ceruloplasmina estava mais expressa no cluster LMPM e menos expressa no cluster LPPM em relação ao cluster CMPM. Sahebari et al. (2014), encontraram o cobre plasmático negativamente correlacionado com a atividade de doença em pacientes adultos com LES (127).

Fibrinogênio é uma proteína da cascata de coagulação que é clivada após a lesão vascular em fibrina pela ação da trombina para formar o coágulo sanguíneo. Além disso, produz monômeros que vão polimerizar a fibrina e atuar como co-fatores na agregação plaquetária (128). O estudo de Datta et al. (2014) sugere que o fibrinogênio é um candidato a biomarcador em pacientes com acidente vascular cerebral isquêmico, por ter se apresentado mais expresso no plasma desses pacientes (129). Já os autores do estudo de Liu et al. (2013), identificaram o fibrinogênio como biomarcador para o diagnóstico clínico de tuberculose, por terem encontrado essa proteína mais expressa no plasma de pacientes com tuberculose (130). Os dois *clusters* de pacientes com LES (LMPM e LPPM) apresentaram o fibrinogênio de cadeia alfa menos expresso em relação aos indivíduos saudáveis, fato este que não conseguimos explicar. É possível que pacientes com LESJ do nosso estudo não apresentem esse fator de risco para doença cardiovascular. Pesquisas que incluam associação da proteômica dos nossos pacientes com genotipagem podem elucidar esses dados.

Haptoglobina tem a função de se ligar a hemoglobina livre para permitir a reciclagem do ferro heme pelo fígado e também para evitar possíveis danos renais. O complexo haptoglobina – hemoglobina é rapidamente capturado pelo receptor de limpeza dos macrófagos CD 163 na superfície celular hepática. Após a hemólise, a hemoglobina tende a se acumular nos rins e ser excretada na urina. Também atua como um agente antimicrobiano, antioxidante e antibacteriano, desempenhando um papel na modulação de diversos aspectos da resposta de fase aguda. A haptoglobina não clivada desempenha um papel na permeabilidade intestinal, controlando o equilíbrio entre a tolerância e a imunidade contra antígenos (131). Em 2006, Pavón et al. encontraram aumento na expressão da isoforma haptoglobina -2 em pacientes com lúpus, considerando-a um biomarcador para manifestações na doença, como hipergamaglobulinemia, vasculite e doenças cardiovasculares (132). O grupo de Ijäs et al. (2013) fizeram análises de polimorfismo no gene que codifica a haptoglobina em pacientes com hemorragia intra-placa, e verificaram que alterações no gene que codifica essa proteína podem modular a resposta inflamatória nesses pacientes e associaram com o risco de eventos cardiovasculares isquêmicos (133). O presente estudo encontrou a haptoglobina mais expressa nos dois clusters de pacientes com LESJ em relação ao controle saudável, porém, é necessário associar esses resultados proteômicos com análises genômicas para facilitar a compreensão dos dados.

Hemopexina tem a função de se ligar a porção heme liberada pela hemoglobina com a maior afinidade que qualquer outra proteína conhecida para transportá-la até o fígado, retornando para a circulação após esse processo. Além do transporte, a hemopexina protege o organismo humano contra os danos oxidativos causados pela porção heme livre e preserva o ferro plasmático (134). Na deficiência de hemopexina plasmática o ferro heme entra nas células e é tóxico. A hemopexina pode promover neuro – proteção em ratos com acidente vascular cerebral e hemorragia cerebral em rato. In vitro, oferece proteção celular contra o ferro heme e espécies reativas de oxigênio (135). O presente estudo encontrou a hemopexina mais expressa no cluster Lupus de Melhor Perfil e menos expressa no cluster Lupus de Pior Perfil. Hernández et al. (2013), encontraram a hemopexina mais expressa em pacientes diabéticos em comparação com indivíduos saudáveis, porém a literatura é escassa de dados associados ao LES (136).

Sorotransferrina, também conhecida por transferrina é responsável pelo transporte do ferro a partir de locais de absorção e degradação do ferro heme para os locais de armazenamento e utilização. A ligação com o ferro é forte, porém reversível. A quantidade de ferro ligado a transferrina é inferior a 0,1% do ferro total do organismo. Sua maior afinidade é com o Fe^{3+} em pH neutro e essa afinidade diminui com valores de pH ácido (137). Custodio et al. (2012) encontraram que a sorotransferrina estava mais expressa e a alfa-1-antripsina menos expressa no plasma humano e encontraram associação com trombose e coagulação (138). Neste trabalho, a sorotransferrina estava menos expressa no cluster LPPM e mais expressa no cluster LMPM em relação aos indivíduos saudáveis, isso pode ser explicado pelo fato de que a transferrina é uma proteína negativa da resposta de fase aguda e os pacientes do LPPM apresentavam maior concentração plasmática de proteína C reativa compatível com resposta de fase aguda (139).

A análise de bioinformática feita pelo *software Metacore* encontrou uma via de sinalização envolvendo as proteínas apo A I, complemento C3 e alfa-2-macroglobulina no metabolismo do colesterol. Essa via mostra o envolvimento direto da apo A I no metabolismo da HDL, o que confirma sua função no metabolismo lipídico. O complemento C3 e a alfa-2-macroglobulina estão envolvidos de forma indireta no metabolismo do colesterol, através das funções da calicreína.

A pré-calicreína plasmática é uma glicoproteína que é sintetizada pelo fígado e secretada para a corrente sanguínea como um peptídeo de cadeia única. É convertida em calicreína pelo fator XIIa pela clivagem na ligação com a arginina – isoleucina.

Participa da coagulação sanguínea, fibrinólise, geração de quininas e inflamação (140). Em estudos transversais, o sistema caliceína – quinina tem sido associado com doenças cardiovasculares e seus fatores de risco, incluindo inflamação, controle da pressão arterial e coagulação (141,142). Elevados níveis plasmáticos de caliceína tem sido associado com o aumento do risco de infarto do miocárdio (143). Mackenzie et al. (2010) encontraram associação positiva entre os níveis plasmáticos de caliceína e colesterol total ($p < 0,01$) e triglicérides ($p < 0,01$) em crianças saudáveis, sugerindo que essa proteína está associada com risco cardiovascular em crianças especialmente com perfil lipídico alterado (144).

Aterosclerose é um processo inflamatório crônico e o sistema complemento tem um papel fundamental na imunidade em pacientes com essa condição patológica por remover as células apoptóticas das placas ateroscleróticas. Dentro das placas ateroscleróticas, o sistema complemento pode ser ativado pelas vias clássica ou alternativa (145). A via clássica ativa o sistema complemento por meio da ligação do anticorpo com o antígeno e, uma das vias alternativas, é através da proteína caliceína que cliva e ativa o complemento C3, possibilitando sua atuação nas placas ateroscleróticas (146).

Já a alfa-2-macroglobulina é uma proteína que está relacionada com a caliceína por atuar como inibidora de fibrinólise pela inibição da plasmina e da caliceína e, a proteína apo A não se mostra interligada com a caliceína, porém está relacionada diretamente com o metabolismo de lipídeos confirmando suas funções no metabolismo dos lipídeos.

Outra via de sinalização criada pelo *Metacore* foi a via de transporte reverso do colesterol mediado pela HDL envolvendo as proteínas apo A I and apo E. A lipoproteína de alta densidade (HDL) é uma proteína produzida pelo fígado e possui em sua conformação as proteínas apo AI e apo E (147,148). Tem um importante papel protetor contra a aterosclerose, suas propriedades anti-ateroscleróticas incluem a liberação do colesterol celular e o transporte reverso do colesterol, efeitos antioxidante, anti-inflamatório e anticoagulante. O transporte reverso do colesterol é uma via complexa que induz o transporte de colesterol das células e tecidos para o fígado, onde será metabolizado, absorvido e catabolizado (149–153).

Além das vias citadas acima, o *Metacore* também encontrou a via de Interrupção da via complemento em microangiopatia trombótica. Microangiopatia trombótica é caracterizada por oclusões microvasculares generalizadas (trombos ricos em plaquetas),

trombocitopenia, anemia hemolítica, disfunções neurológicas, insuficiência renal e febre. O sistema complemento tem um papel fundamental na imunidade e, pode ser ativado pela via clássica (as imunoglobulinas IgG1, IgG3 e IgM ativam o C1q) ou pela via alternativa (induzida pela IgA que ativa o C3 e a Properdina) (110,154–158). Tanto a via clássica, quanto a alternativa, levam a defesa celular contra o agente danoso e a inflamação (156,159). Distúrbios na regulação do sistema complemento estão associados com a suscetibilidade em desenvolver microangiopatia trombótica (160–162).

Para as redes de processo biológico, a via que mais se destacou foi a via de sinalização da inflamação pela interleucina -6. O presente estudo não avaliou a concentração sérica de Interleucina – 6 (IL-6) mas a via representada por esse marcador mostra a inter-relação da IL-6 com a ceruloplasmina, complemento C3, hemopexina, fibrinogênio de cadeia alfa, haptoglobina, alfa-2-macroglobulina, apo AI, apo E e alfa-1-antitripsina direta ou indiretamente mostrando sua atuação na secreção de proteínas de fase aguda. Asanuma et al. (2006), encontraram a concentração de IL-6 aumentada em pacientes adultos com LES comparados aos controles. A IL-6 foi correlacionada com o IMC ($r = 0.34$; $p = 0.003$), SLEDAI ($r = 0.34$; $p = 0.003$), PCR ($r = 0.50$; $p < 0.001$) MCP-1 ($r = 0.41$; $p < 0.001$) e HDL ($r = -0.29$; $p = 0.01$). A IL-6 também foi associada com calcificação coronariana (OR = 1.07, $p = 0.035$) (163). Hu et al. (2006), encontraram concentração sérica de IL-6 aumentada em pacientes lúpicos, com e sem atividade, comparados com controles saudáveis e, a IL-6 estava positivamente correlacionada com o SLEDAI ($r = 0.74$, $p < 0.01$) (164).

A IL-6 é uma citocina secretada em processos inflamatórios por macrófagos, células endoteliais e fibroblastos e possui uma importante função na regulação do sistema imune. É uma citocina pró-inflamatória e sua primeira ação é induzir a secreção de proteínas de fase aguda pelo fígado para a corrente sanguínea e, essas proteínas, podem atuar como mediadoras na resposta inflamatória. Porém, se a expressão de IL-6 estiver aumentada, essa citocina irá contribuir para a patogênese em vias de inflamação, autoimunidade e câncer (165).

7. CONCLUSÃO

O presente estudo possui algumas limitações, como o tamanho amostral e o desenho transversal. Porém, apesar das limitações, foram encontradas algumas variáveis relacionadas com a progressão de doenças cardiovasculares em adolescentes, como alto IMC, circunferência da cintura, altas concentrações séricas de homocisteína, triglicérides, TNF- α , hs-PCR e baixa concentração sérica de folato. Além disso, foram encontradas proteínas pró-inflamatórias relacionadas com a inflamação e metabolismo de lipídeo menos expressas no *cluster* lúpus pior perfil metabólico. A identificação precoce desses marcadores inflamatórios facilita o desenvolvimento de estratégias de intervenção, tanto médica quanto nutricional, com a finalidade de reduzir ou até mesmo evitar a ocorrência de doenças cardiovasculares em pacientes pediátricos com LES. Sendo assim, é possível concluir que o presente estudo sinaliza possíveis complicações cardiovasculares futuras em pacientes com LESJ e, sugerem a necessidade de novos estudos, a fim de elucidar a interação do estado nutricional e das proteínas encontradas pela proteômica no contexto de sistemas biológicos em pacientes com LESJ.

8. REFERÊNCIAS

1. De Franceschi L, Bosello S, Scambi C, Biasi D, De Santis M, Caramaschi P, et al. Proteome analysis of biological fluids from autoimmune-rheumatological disorders. *Proteomics Clin Appl* [Internet]. 2011 Feb [cited 2014 Sep 1];5(1-2):78–89. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21246742>
2. Piotrowski P, Lianeri M, Gasik R, Roszak A, Olesińska M, Jagodziński PP. Monocyte chemoattractant protein-1 -2518 A/G single nucleotide polymorphism might be associated with renal disease and thrombocytopenia of SLE. *J Biomed Biotechnol* [Internet]. 2010 Jan [cited 2014 Sep 1];2010:130265. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2858281&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
3. Postal M, Sinicato NA, Peliçari KO, Marini R, Lavras Costallat LT, Appenzeller S. Clinical and serological manifestations associated with interferon- α levels in childhood-onset systemic lupus erythematosus. *Clin (São Paulo, Brazil)* [Internet]. 2012 Jan [cited 2016 Feb 14];67(2):157–62. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3275113&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
4. Wais T, Fierz W, Stoll T, Villiger PM. Subclinical disease activity in systemic lupus erythematosus: immunoinflammatory markers do not normalize in clinical remission. *J Rheumatol* [Internet]. 2003 Oct [cited 2016 Feb 14];30(10):2133–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14528506>
5. Brunner HI, Gladman DD, Ibañez D, Urowitz MD, Silverman ED. Difference in disease features between childhood-onset and adult-onset systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* [Internet]. 2008 Feb [cited 2016 Feb 14];58(2):556–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18240232>
6. Barsalou J, Bradley TJ, Silverman ED. Cardiovascular risk in pediatric-onset rheumatological diseases. *Arthritis Res Ther* [Internet]. 2013 Jan [cited 2015 Mar 9];15(3):212. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3672705&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
7. Manzi S, Meilahn EN, Rairie JE, Conte CG, Medsger TA, Jansen-McWilliams L, et al. Age-specific incidence rates of myocardial infarction and angina in women with systemic lupus erythematosus: comparison with the Framingham Study. *Am J Epidemiol* [Internet]. 1997 Mar 1 [cited 2014 Aug 22];145(5):408–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9048514>
8. Von Feldt JM, Scalzi L V., Cucchiara AJ, Morthala S, Kealey C, Flagg SD, et al. Homocysteine levels and disease duration independently correlate with coronary artery calcification in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* [Internet]. 2006;54(7):2220–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Homocysteine+levels+and+disease+duration+independently+correlate+with+coronary+artery+calcification+in+patients+with+systemic+lupus+erythematosus>.
9. Knight JS, Kaplan MJ. Cardiovascular disease in lupus: insights and updates. *Curr Opin Rheumatol* [Internet]. 2013 Sep [cited 2015 Feb 8];25(5):597–605.

- Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3964608&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
10. Kiani AN, Magder L, Petri M. Coronary calcium in systemic lupus erythematosus is associated with traditional cardiovascular risk factors, but not with disease activity. *J Rheumatol* [Internet]. 2008 Jul [cited 2015 Mar 15];35(7):1300–6. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18484694>
 11. Escárcega RO, García-Carrasco M, Fuentes-Alexandro S, Jara LJ, Rojas-Rodriguez J, Escobar-Linares LE, et al. Insulin resistance, chronic inflammatory state and the link with systemic lupus erythematosus-related coronary disease. *Autoimmun Rev* [Internet]. 2006 Nov [cited 2014 Aug 18];6(1):48–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17110317>
 12. Daviglus ML, Stamler J, Pirzada A, Yan LL, Garside DB, Liu K, et al. Favorable cardiovascular risk profile in young women and long-term risk of cardiovascular and all-cause mortality. *JAMA* [Internet]. 2004 Oct 6 [cited 2014 Sep 1];292(13):1588–92. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15467061>
 13. Keeling SO, Teo M, Fung D. Lack of cardiovascular risk assessment in inflammatory arthritis and systemic lupus erythematosus patients at a tertiary care center. *Clin Rheumatol* [Internet]. 2011 Oct [cited 2014 Aug 25];30(10):1311–7. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21503617>
 14. Ahmad Y, Bruce IN. Subclinical atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* [Internet]. 2004 May [cited 2014 Sep 1];31(5):841–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15124239>
 15. Roman MJ, Crow MK, Lockshin MD, Devereux RB, Paget SA, Sammaritano L, et al. Rate and determinants of progression of atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* [Internet]. 2007 Oct [cited 2014 Sep 1];56(10):3412–9. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17907140>
 16. Ardoin SP, Schanberg LE, Sandborg C, Yow E, Barnhart HX, Mieszkalski K I, et al. Laboratory markers of cardiovascular risk in pediatric SLE: the APPLE baseline cohort. *Lupus* [Internet]. 2010;19(11):1315–25. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Laboratory+markers+of+cardiovascular+risk+in+pediatric+SLE:+the+APPLE+baseline+cohort>
 17. Sozeri B, Deveci M, Dincel N, Mir S. The early cardiovascular changes in pediatric patients with systemic lupus erythematosus. *Pediatr Nephrol* [Internet]. 2013;28(3):471–6. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23135607>
 18. Yiu K-H, Wang S, Mok M-Y, Ooi G-C, Khong P-L, Lau C-S, et al. Relationship between cardiac valvular and arterial calcification in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* [Internet]. 2011 Apr [cited 2016 Feb 14];38(4):621–7. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21285175>
 19. Selhub J. Homocysteine metabolism. *Annu Rev Nutr* [Internet]. 1999 [cited 2016 Jul 2];19:217–46. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10448523>
20. Bydlowski SP, Magnanelli AC, Chamone D de AF. Hiper-homocisteinemia e doenças vaso-oclusivas. *Arq Bras Cardiol* [Internet]. Arquivos Brasileiros de Cardiologia; 1998 Jul [cited 2016 Feb 29];71(1):69–76. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0066-782X1998000700013&lng=en&nrm=iso&tlng=pt
 21. Moroni G, Novembrino C, Quaglini S, De Giuseppe R, Gallelli B, Uva V, et al. Oxidative stress and homocysteine metabolism in patients with lupus nephritis. *Lupus* [Internet]. 2010 Jan [cited 2014 Sep 1];19(1):65–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19933721>
 22. do Prado R, D’Almeida VM, Guerra-Shinohara E, Galdieri LC, Terreri MT, Hilário MO. Increased concentration of plasma homocysteine in children with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* [Internet]. 2006 Jan [cited 2015 Mar 15];24(5):594–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17181933>
 23. Martínez-Berriotxo A, Ruiz-Irastorza G, Egurbide Arberas MV, Rueda Gutiérrez M, Aguirre Errasti C. [Plasma homocysteine levels in systemic lupus erythematosus]. *Med Clin (Barc)* [Internet]. 2003 May 17 [cited 2014 Sep 1];120(18):681–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12781093>
 24. Denny MF, Thacker S, Mehta H, Somers EC, Dodick T, Barrat FJ, et al. Interferon-alpha promotes abnormal vasculogenesis in lupus: a potential pathway for premature atherosclerosis. *Blood* [Internet]. 2007 Oct 15 [cited 2016 Feb 14];110(8):2907–15. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2018671&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract>
 25. Bennett L, Palucka AK, Arce E, Cantrell V, Borvak J, Banchereau J, et al. Interferon and Granulopoiesis Signatures in Systemic Lupus Erythematosus Blood. *J Exp Med* [Internet]. 2003 Mar 17 [cited 2014 Jul 21];197(6):711–23. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2193846&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract>
 26. Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G, Gaffney PM, Ortmann WA, Espe KJ, et al. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2003 Mar 4 [cited 2014 Aug 28];100(5):2610–5. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=151388&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract>
 27. Roifman I, Beck PL, Anderson TJ, Eisenberg MJ, Genest J. Chronic inflammatory diseases and cardiovascular risk: a systematic review. *Can J Cardiol* [Internet]. 2011 Jan [cited 2014 Aug 22];27(2):174–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21459266>
 28. Ardoin SP, Sandborg C, Schanberg LE. Management of dyslipidemia in children and adolescents with systemic lupus erythematosus. *Lupus* [Internet]. 2007 Jan [cited 2014 Sep 1];16(8):618–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17711898>
 29. Palucka AK, Blanck J-P, Bennett L, Pascual V, Banchereau J. Cross-regulation

- of TNF and IFN- α in autoimmune diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2005 Mar 1 [cited 2014 Aug 30];102(9):3372–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=552921&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
30. Lee AB, Godfrey T, Rowley KG, Karschikus CS, Dragicevic G, Romas E, et al. Traditional risk factor assessment does not capture the extent of cardiovascular risk in systemic lupus erythematosus. *Intern Med J* [Internet]. 2006 Apr [cited 2014 Sep 2];36(4):237–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16640741>
 31. Marks SD, Shah V, Pilkington C, Tullus K. Urinary monocyte chemoattractant protein-1 correlates with disease activity in lupus nephritis. *Pediatr Nephrol* [Internet]. 2010 Nov [cited 2016 Feb 14];25(11):2283–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20683619>
 32. Rothenbacher D, Brenner H, März W, Koenig W. Adiponectin, risk of coronary heart disease and correlations with cardiovascular risk markers. *Eur Heart J* [Internet]. 2005 Aug [cited 2014 Sep 2];26(16):1640–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15932907>
 33. Barbosa V de S, Franciscantônio PL, Silva NA da. [Leptin and adiponectin in patients with systemic lupus erythematosus: clinical and laboratory correlations]. *Rev Bras Reumatol* [Internet]. 2015 Jan [cited 2015 Apr 16];55(2):140–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25440710>
 34. Garcia-Gonzalez A, Gonzalez-Lopez L, Valera-Gonzalez IC, Cardona-Muñoz EG, Salazar-Paramo M, González-Ortiz M, et al. Serum leptin levels in women with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int* [Internet]. 2002 Aug [cited 2014 Sep 2];22(4):138–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12172951>
 35. Sada K-E, Yamasaki Y, Maruyama M, Sugiyama H, Yamamura M, Maeshima Y, et al. Altered levels of adipocytokines in association with insulin resistance in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* [Internet]. 2006 Aug [cited 2014 Sep 2];33(8):1545–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16881111>
 36. Kim H-A, Choi G-S, Jeon J-Y, Yoon J-M, Sung J-M, Suh C-H. Leptin and ghrelin in Korean systemic lupus erythematosus. *Lupus* [Internet]. 2010 Feb [cited 2016 Feb 14];19(2):170–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19965946>
 37. Hashimoto N, Kanda J, Nakamura T, Horie A, Kurosawa H, Hashimoto T, et al. Association of hypoadiponectinemia in men with early onset of coronary heart disease and multiple coronary artery stenoses. *Metabolism* [Internet]. 2006 Dec [cited 2014 Sep 2];55(12):1653–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17142139>
 38. Li G-Z, Jiang W, Zhao J, Pan C-S, Cao J, Tang C-S, et al. Ghrelin blunted vascular calcification in vivo and in vitro in rats. *Regul Pept* [Internet]. 2005 Jul 15 [cited 2014 Sep 2];129(1-3):167–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15927713>
 39. Li WG, Gavrilu D, Liu X, Wang L, Gunnlaugsson S, Stoll LL, et al. Ghrelin inhibits proinflammatory responses and nuclear factor-kappaB activation in human endothelial cells. *Circulation* [Internet]. 2004 May 11 [cited 2014 Sep

- 2];109(18):2221–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15117840>
40. Waitzberg DL, Correia MITD. Nutritional assessment in the hospitalized patient. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* [Internet]. 2003 Sep [cited 2014 Aug 25];6(5):531–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12913670>
41. Hajer GR, van Haften TW, Visseren FLJ. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *Eur Heart J* [Internet]. 2008 Dec [cited 2014 Sep 1];29(24):2959–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18775919>
42. Harris JG, Maletta KI, Kuhn EM, Olson JC. A139: body mass index and height change over time in childhood-onset systemic lupus erythematosus cohort. *Arthritis Rheumatol (Hoboken, NJ)* [Internet]. 2014;66 Suppl 1:S182. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24677893>
43. Mora S, Lee I-M, Buring JE, Ridker PM. Association of physical activity and body mass index with novel and traditional cardiovascular biomarkers in women. *JAMA* [Internet]. 2006;295(12):1412–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16551713>
44. Sazliyan S, Mohd Shahrir M, Kong CN, Tan H, Hamidon B, Azmi M. Implications of immunosuppressive agents in cardiovascular risks and carotid intima media thickness among lupus nephritis patients [Internet]. *Lupus*. 2011. p. 1260–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Implications+of+immunosuppressive+agents+in+cardiovascular+risks+and+carotid+intima+media+thickness+among+lupus+nephritis+patients>.
45. Klack K, Bonfa E, Borba Neto EF. Diet and nutritional aspects in systemic lupus erythematosus. *Rev Bras Reumatol* [Internet]. 2012;52(3):384–408. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22641593>
46. Rho YH, Oeser A, Chung CP, Morrow JD, Stein CM. Drugs to Treat Systemic Lupus Erythematosus: Relationship between Current Use and Cardiovascular Risk Factors. *Arch Drug Inf* [Internet]. 2008 Jul [cited 2014 Sep 2];1(1):23–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2817442&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract>
47. Nascif AKS, Hilário MOE, Terreri MTRA, Ajzen SA, D’Almeida V, Plavnik FL, et al. Endothelial function analysis and atherosclerotic risk factors in adolescents with systemic lupus erythematosus. *Int J Adolesc Med Health* [Internet]. Jan [cited 2016 Feb 14];19(4):497–505. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18348424>
48. Arriens C, Mohan C. Systemic lupus erythematosus diagnostics in the “omics” era. *Int J Clin Rheumatol* [Internet]. 2013 Dec 1 [cited 2015 Apr 12];8(6):671–87. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4029501&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract>
49. Mahn A V, Muñoz MC, Zamorano MJ. Discovery of biomarkers that reflect the intake of sodium selenate by nutritional proteomics. *J Chromatogr Sci* [Internet]. 2009 Oct [cited 2014 Sep 2];47(9):840–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19835700>

50. Vanarsa K, Mohan C. Proteomics in rheumatology: the dawn of a new era. *F1000 Med Rep* [Internet]. 2010 Jan [cited 2014 Sep 2];2:87. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3026622&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
51. Zhang X, Jin M, Wu H, Nadasdy T, Nadasdy G, Harris N, et al. Biomarkers of lupus nephritis determined by serial urine proteomics. *Kidney Int* [Internet]. 2008 Sep [cited 2014 Sep 2];74(6):799–807. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2614389&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
52. Rovin BH, Zhang X. Biomarkers for lupus nephritis: the quest continues. *Clin J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2009 Nov [cited 2014 Aug 23];4(11):1858–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19729426>
53. Wu T, Fu Y, Brekken D, Yan M, Zhou XJ, Vanarsa K, et al. Urine proteome scans uncover total urinary protease, prostaglandin D synthase, serum amyloid P, and superoxide dismutase as potential markers of lupus nephritis. *J Immunol* [Internet]. 2010 Feb 15 [cited 2014 Sep 2];184(4):2183–93. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2927858&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
54. Sui W, Tang D, Zou G, Chen J, Ou M, Zhang Y, et al. Differential proteomic analysis of renal tissue in lupus nephritis using iTRAQ reagent technology. *Rheumatol Int* [Internet]. 2012;32(11):3537–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Differential+proteomic+analysis+of+renal+tissue+in+lupus+nephritis+using+iTRAQ+reagent+technology>
55. Aggarwal K, Choe LH, Lee KH. Shotgun proteomics using the iTRAQ isobaric tags. *Brief Funct Genomic Proteomic* [Internet]. 2006 Jun [cited 2015 Apr 1];5(2):112–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16772272>
56. Katsumata Y, Kawaguchi Y, Baba S, Hattori S, Tahara K, Ito K, et al. Identification of three new autoantibodies associated with systemic lupus erythematosus using two proteomic approaches. *Mol Cell Proteomics* [Internet]. 2011 Jun [cited 2014 Sep 2];10(6):M110.005330. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3108835&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
57. Lima-Costa MF, Barreto SM. Tipos de estudos epidemiológicos: conceitos básicos e aplicações na área do envelhecimento. *Epidemiol e Serviços Saúde* [Internet]. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços / Secretaria de Vigilância em Saúde / Ministério da Saúde; 2003 Dec [cited 2015 Nov 15];12(4):189–201. Available from: http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-49742003000400003&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
58. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* [Internet]. 1982 Nov [cited 2015 Mar 17];25(11):1271–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7138600>
59. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. [Internet]. *Arthritis and rheumatism. UNITED STATES*; 1997. p. 1725. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9324032>

60. JJ S. Case-control studies: Design, conduct, analysis. 1st ed. Press OU, editor. New York; 1982. 368 p.
61. Gladman D, Ginzler E, Goldsmith C, Fortin P, Liang M, Urowitz M, et al. The development and initial validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology damage index for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* [Internet]. 1996 Mar [cited 2014 Sep 2];39(3):363–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8607884>
62. Petri M, Hellmann D, Hochberg M. Validity and reliability of lupus activity measures in the routine clinic setting. *J Rheumatol* [Internet]. 1992 Jan [cited 2014 Sep 2];19(1):53–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1556700>
63. Heymsfield SB, Tighe A WZ. Nutritional assessment by anthropometric and biochemical methods. In: Shils ME, Olson JA SM, editor. *Modern nutrition in health and disease*. 2nd ed. Lea Febiger: Malvern; 1994. p. 812–41.
64. Garrow JS, Webster J. Quetelet's index (W/H²) as a measure of fatness. *Int J Obes* [Internet]. 1985 Jan [cited 2016 Feb 8];9(2):147–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4030199>
65. Heyward VH SL. Body composition and children. *Applied body composition assessment*. New York: Kinetics H; 1996. p. 91–8.
66. Posner BM, Borman CL, Morgan JL, Borden WS, Ohls JC. The validity of a telephone-administered 24-hour dietary recall methodology. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 1982 Sep [cited 2014 Aug 18];36(3):546–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6180624>
67. Monteiro JP. Consumo Alimentar - Visualizando porções. 1st ed. Koogan G, editor. Rio de Janeiro; 2007. 80 p.
68. Beaton GH, Milner J, McGuire V, Feather TE, Little JA. Source of variance in 24-hour dietary recall data: implications for nutrition study design and interpretation. Carbohydrate sources, vitamins, and minerals. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 1983 Jun [cited 2016 Feb 15];37(6):986–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6846242>
69. Haubrock J, Nöthlings U, Volatier J-L, Dekkers A, Ocké M, Harttig U, et al. Estimating usual food intake distributions by using the multiple source method in the EPIC-Potsdam Calibration Study. *J Nutr* [Internet]. 2011 May [cited 2016 Feb 15];141(5):914–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21430241>
70. Harttig U, Haubrock J, Knüppel S, Boeing H. The MSM program: web-based statistics package for estimating usual dietary intake using the Multiple Source Method. *Eur J Clin Nutr* [Internet]. 2011 Jul [cited 2016 Feb 15];65 Suppl 1:S87–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21731011>
71. Neves LB, Macedo DM, Lopes AC. Homocisteína. *J Bras Patol e Med Lab* [Internet]. SBPC, SBP, SBC; 2004 Oct [cited 2016 Feb 14];40(5):311–20. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442004000500006&lng=en&nrm=iso&tlng=pt
72. I Diretriz de Prevenção da Aterosclerose na Infância e na Adolescência. *Arq Bras Cardiol* [Internet]. Arquivos Brasileiros de Cardiologia; 2005 Dec [cited 2016

- Feb 14];85:3–36. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0066-782X2005002500001&lng=en&nrm=iso&tlng=pt
73. Berrahmoune H, Lamont J V, Herbeth B, FitzGerald PS, Visvikis-Siest S. Biological determinants of and reference values for plasma interleukin-8, monocyte chemoattractant protein-1, epidermal growth factor, and vascular endothelial growth factor: Results from the STANISLAS cohort. *Clin Chem* [Internet]. 2006 Mar [cited 2014 Sep 4];52(3):504–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16423909>
 74. Al M, Ng L, Tyrrell P, Bargman J, Bradley T, Silverman E. Adipokines as novel biomarkers in paediatric systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* [Internet]. 2009 May [cited 2014 Sep 4];48(5):497–501. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19269958>
 75. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* [Internet]. 1976 May [cited 2014 Jul 9];72(1-2):248–54. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269776905273>
 76. Fu Q, Garnham CP, Elliott ST, Bovenkamp DE, Van Eyk JE. A robust, streamlined, and reproducible method for proteomic analysis of serum by delipidation, albumin and IgG depletion, and two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* [Internet]. 2005 Jul [cited 2015 Mar 12];5(10):2656–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15924293>
 77. Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics* [Internet]. 2002 Nov [cited 2014 Aug 29];1(11):845–67. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12488461>
 78. Sabio JM, Vargas-Hitos J, Zamora-Pasadas M, Mediavilla JD, Navarrete N, Ramirez A, et al. Metabolic syndrome is associated with increased arterial stiffness and biomarkers of subclinical atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* [Internet]. 2009;36(0315-162X (Print)):2204–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19723903>
 79. Rizk A, Gheita TA, Nassef S, Abdallah A. The impact of obesity in systemic lupus erythematosus on disease parameters, quality of life, functional capacity and the risk of atherosclerosis. *Int J Rheum Dis* [Internet]. 2012 Jun [cited 2015 Mar 17];15(3):261–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22212605>
 80. Ortiz TT, Terreri MT, Caetano M, Souza FS, D’Almeida V, Sarni ROS, et al. Dyslipidemia in pediatric systemic lupus erythematosus: the relationship with disease activity and plasma homocysteine and cysteine concentrations. *Ann Nutr Metab. Switzerland*; 2013;63(1-2):77–82.
 81. Shen C, Chung H, Huang Y, Yeh K, Huang J. Coronary artery dilation among patients with paediatric-onset systemic lupus erythematosus [Internet]. *Scandinavian Journal of Rheumatology*. 2012. p. 1–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Coronary+artery+dilation+among+patients+with+paediatric-onset+systemic+lupus+erythematosus>
 82. Garcia G, Trejos J, Restrepo B, Landázuri P. Homocisteína, folato e vitamina B12 em pacientes colombianos portadores de coronariopatia. *Arq Bras Cardiol*

- [Internet]. Arquivos Brasileiros de Cardiologia; 2007 Aug [cited 2014 Sep 4];89(2):79–85. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0066-782X2007001400002&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
83. Boros CA, Bradley TJ, Cheung MMH, Bargman JM, Russell JL, McCrindle BW, et al. Early determinants of atherosclerosis in paediatric systemic lupus erythematosus. Clin Exp Rheumatol [Internet]. 2011 Jan [cited 2014 Sep 4];29(3):575–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21640055>
 84. Stein JH, McBride PE. Hyperhomocysteinemia and atherosclerotic vascular disease - Pathophysiology, screening, and treatment. Arch Intern Med [Internet]. AMER MEDICAL ASSOC; 1998;158(12):1301–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9645823>
 85. Refai TMK, Al-Salem IH, Nkansa-Dwamena D, Al-Salem MH. Hyperhomocysteinaemia and risk of thrombosis in systemic lupus erythematosus patients. Clin Rheumatol [Internet]. 2002 Nov [cited 2014 Sep 4];21(6):457–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12447627>
 86. Petri M, Roubenoff R, Dallal GE, Nadeau MR, Selhub J, Rosenberg IH. Plasma homocysteine as a risk factor for atherothrombotic events in systemic lupus erythematosus. Lancet [Internet]. 1996;348(9035):1120–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8888164>
 87. Minami Y, Hirabayashi Y, Nagata C, Ishii T, Harigae H, Sasaki T. Intakes of vitamin B6 and dietary fiber and clinical course of systemic lupus erythematosus: a prospective study of Japanese female patients. J Epidemiol. 2011;21(4):246–54.
 88. Committee on Use of Dietary Reference Intakes in Nutrition Labeling. DIETARY REFERENCE INTAKES [Internet]. PRESS TNA, editor. Washington, D.C.: INSTITUTE OF MEDICINE OF THE NATIONAL ACADEMIES; 2003. Available from: <http://www.nap.edu/read/10872/chapter/1>
 89. Padjas A, Undas A, Swadzba J, Musiał J. Antibodies to N-homocysteinylated albumin in patients with systemic lupus erythematosus. Pol Arch Med Wewn [Internet]. 2007;117(3):20–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Antibodies+to+N-homocysteinylated+albumin+in+patients+with+systemic+lupus+erythematosus>
 90. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. Nat Genet [Internet]. 1995 May [cited 2014 Jul 22];10(1):111–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7647779>
 91. Balcerzyk A, Niemiec P, Kopyta I, Emich-Widera E, Pilarska E, Pienczk-Ręclawowicz K, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase gene A1298C polymorphism in pediatric stroke--case-control and family-based study. J Stroke Cerebrovasc Dis [Internet]. 2015 Jan [cited 2015 Mar 30];24(1):61–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25440348>
 92. Summers CM, Cucchiara AJ, Nackos E, Hammons AL, Mohr E, Whitehead AS, et al. Functional polymorphisms of folate-metabolizing enzymes in relation to homocysteine concentrations in systemic lupus erythematosus. J Rheumatol [Internet]. 2008 Nov [cited 2014 Sep 5];35(11):2179–86. Available from:

- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4030675&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
93. Monteiro JP, Kussmann M, Kaput J. The genomics of micronutrient requirements. *Genes Nutr* [Internet]. 2015 Jul [cited 2016 Jan 11];10(4):466. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4434349&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 94. van Ommen B, Bouwman J, Dragsted LO, Drevon CA, Elliott R, de Groot P, et al. Challenges of molecular nutrition research 6: the nutritional phenotype database to store, share and evaluate nutritional systems biology studies. *Genes Nutr* [Internet]. 2010 Feb 3 [cited 2016 Jan 11];5(3):189–203. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2935528&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 95. Hayata ALS, Borba EF, Bonfá E, Kochen JAL, Goldenstein-Schainberg C. The frequency of high/moderate lipoprotein risk factor for coronary artery disease is significant in juvenile-onset systemic lupus erythematosus. *Lupus* [Internet]. 2005 Jan [cited 2014 Sep 4];14(8):613–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16175933>
 96. Valdivielso P, Gomez-Doblas JJ, Macias M, Haro-Liger M, Fernandez-Nebro A, Sanchez-Chaparro MA, et al. Lupus-associated endothelial dysfunction, disease activity and arteriosclerosis. *Clin Exp Rheumatol. Italy*; 2008;26(5):827–33.
 97. Doria A, Shoenfeld Y, Wu R, Gambari PF, Puato M, Ghirardello A, et al. Risk factors for subclinical atherosclerosis in a prospective cohort of patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 2003;62(11):1071–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Risk+factors+for+subclinical+atherosclerosis+in+a+prospective+cohort+of+patients+with+systemic+lupus+erythematosus>
 98. Petri M, Lakatta C, Magder L, Goldman D. Effect of prednisone and hydroxychloroquine on coronary artery disease risk factors in systemic lupus erythematosus: a longitudinal data analysis. *Am J Med* [Internet]. 1994;96(3):254–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Effect+of+prednisone+and+hydroxychloroquine+on+coronary+artery+disease+risk+factors+in+systemic+lupus+erythematosus:+a+longitudinal+data+analysis>.
 99. Sarkissian T, Beyene J, Feldman B, McCrindle B, Silverman ED. Longitudinal examination of lipid profiles in pediatric systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* [Internet]. 2007 Feb [cited 2015 Apr 16];56(2):631–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17265498>
 100. Ma CY, Jiao YL, Zhang J, Yang QR, Zhang ZF, Shen YJ, et al. Elevated plasma level of HMGB1 is associated with disease activity and combined alterations with IFN-alpha and TNF-alpha in systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int* [Internet]. 2012;32(2):395–402. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Elevated+plasma+level+of+HMGB1+is+associated+with+disease+activity+and+combined+alterations+with+IFN-alpha+and+TNF-alpha+in+systemic+lupus+erythematosus>.
 101. Farid TM, Abd El Baky AM, Khalefa ES, Talaat AA, Mohamed AA, Gheita TA,

- et al. Association of tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms with juvenile systemic lupus erythematosus nephritis in a cohort of egyptian patients. *Iran J Kidney Dis* [Internet]. 2011;5(6):392–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Association+of+tumor+necrosis+factor-alpha+gene+polymorphisms+with+juvenile+systemic+lupus+erythematosus+nephritis+in+a+cohort+of+egyptian+patients>
102. Shi B, Ni Z, Cai H, Zhang M, Mou S, Wang Q, et al. High-sensitivity C-reactive protein: an independent risk factor for left ventricular hypertrophy in patients with lupus nephritis. *J Biomed Biotechnol* [Internet]. 2010;2010:373426. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=High-sensitivity+C-reactive+protein:+an+independent+risk+factor+for+left+ventricular+hypertrophy+in+patients+with+lupus+nephritis>
 103. Gasparyan AY, Stavropoulos-Kalinoglou A, Mikhailidis DP, Toms TE, Douglas KMJ, Kitas GD. The rationale for comparative studies of accelerated atherosclerosis in rheumatic diseases. *Curr Vasc Pharmacol* [Internet]. 2010;8(4):437–49. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=The+rationale+for+comparative+studies+of+accelerated+atherosclerosis+in+rheumatic+diseases>
 104. van der Pol E, Böing AN, Harrison P, Sturk A, Nieuwland R. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol Rev* [Internet]. 2012 Jul [cited 2015 Jan 25];64(3):676–705. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22722893>
 105. Keller S, Sanderson MP, Stoeck A, Altevogt P. Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function. *Immunol Lett* [Internet]. 2006 Nov 15 [cited 2015 Feb 24];107(2):102–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17067686>
 106. Figueroa FE, Cuenca Moreno J, La Cava A. Novel approaches to lupus drug discovery using stem cell therapy. Role of mesenchymal-stem-cell-secreted factors. *Expert Opin Drug Discov* [Internet]. 2014 May [cited 2015 Apr 7];9(5):555–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24655067>
 107. Sottrup-Jensen L. Alpha-macroglobulins: structure, shape, and mechanism of proteinase complex formation. *J Biol Chem* [Internet]. 1989 Jul 15 [cited 2015 Apr 7];264(20):11539–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2473064>
 108. Enghild JJ, Salvesen G, Thøgersen IB, Pizzo S V. Proteinase binding and inhibition by the monomeric alpha-macroglobulin rat alpha 1-inhibitor-3. *J Biol Chem* [Internet]. 1989 Jul 5 [cited 2015 Apr 7];264(19):11428–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2472396>
 109. Ramacciotti E, Hawley AE, Wroblewski SK, Myers DD, Strahler JR, Andrews PC, et al. Proteomics of microparticles after deep venous thrombosis. *Thromb Res* [Internet]. 2010 Jun [cited 2015 Apr 7];125(6):e269–74. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2929804&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 110. Sahu A, Lambris JD. Structure and biology of complement protein C3, a connecting link between innate and acquired immunity. *Immunol Rev* [Internet].

- 2001 Apr [cited 2015 Apr 7];180:35–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11414361>
111. Watanabe J, Charles-Schoeman C, Miao Y, Elashoff D, Lee YY, Katselis G, et al. Proteomic profiling following immunoaffinity capture of high-density lipoprotein: Association of acute-phase proteins and complement factors with proinflammatory high-density lipoprotein in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* [Internet]. 2012;64(6):1828–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Proteomic+profiling+following+immunoaffinity+capture+of+high-density+lipoprotein:+Association+of+acute-phase+proteins+and+complement+factors+with+proinflammatory+high-density+lipoprotein+in+rheumatoid+arthritis>.
 112. Rana A, Minz RW, Aggarwal R, Sharma S, Pasrija N, Anand S, et al. A comparative proteomic study of sera in paediatric systemic lupus erythematosus patients and in healthy controls using MALDI-TOF-TOF and LC MS-A pilot study. *Pediatric Rheumatology*. 2012. p. 24.
 113. Alpha-1-antichymotrypsin - alpha-1-antichymotrypsin/ ACT - Homo sapiens (Human) [Internet]. [cited 2014 Aug 21]. Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q15965>
 114. Wasan KM, Brocks DR, Lee SD, Sachs-Barrable K, Thornton SJ. Impact of lipoproteins on the biological activity and disposition of hydrophobic drugs: implications for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. 2008 Jan [cited 2015 Mar 9];7(1):84–99. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18079757>
 115. Elshourbagy NA, Liao WS, Mahley RW, Taylor JM. Apolipoprotein E mRNA is abundant in the brain and adrenals, as well as in the liver, and is present in other peripheral tissues of rats and marmosets. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1985 Jan [cited 2015 Mar 11];82(1):203–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=397000&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 116. Blue ML, Williams DL, Zucker S, Khan SA, Blum CB. Apolipoprotein E synthesis in human kidney, adrenal gland, and liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1983 Jan [cited 2015 Apr 7];80(1):283–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=393357&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 117. Shoenfeld Y, Szyper-Kravitz M, Witte T, Doria A, Tsutsumi A, Tatsuya A, et al. Autoantibodies against protective molecules--C1q, C-reactive protein, serum amyloid P, mannose-binding lectin, and apolipoprotein A1: prevalence in systemic lupus erythematosus. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2007;1108:227–39. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Autoantibodies+against+protective+molecules--C1q,+C-reactive+protein,+serum+amyloid+P,+mannose-binding+lectin,+and+apolipoprotein+A1:+prevalence+in+systemic+lupus+erythematosus>.
 118. McMahon M, Grossman J, FitzGerald J, Dahlin-Lee E, Wallace DJ, Thong BY, et al. Proinflammatory high-density lipoprotein as a biomarker for atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2006;54(8):2541–9.

119. Zhang H, Wu L-M, Wu J. Cross-talk between apolipoprotein E and cytokines. *Mediators Inflamm* [Internet]. 2011 Jan [cited 2015 Apr 7];2011:949072. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3136159&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
120. Davignon J, Gregg RE, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis* [Internet]. 1988 Jan [cited 2016 Feb 11];8(1):1–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3277611>
121. Getz GS, Reardon CA. Apoprotein E as a lipid transport and signaling protein in the blood, liver, and artery wall. *J Lipid Res* [Internet]. 2009 Apr [cited 2015 Sep 3];50 Suppl:S156–61. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2674757&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
122. van den Elzen P, Garg S, León L, Brigl M, Leadbetter EA, Gumperz JE, et al. Apolipoprotein-mediated pathways of lipid antigen presentation. *Nature* [Internet]. 2005 Oct 6 [cited 2015 Apr 7];437(7060):906–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16208376>
123. Orlicchio A, Bruce IN, Rahman P, Kawarai T, Bernardi G, St George-Hyslop PH, et al. The apolipoprotein E2 isoform is associated with accelerated onset of coronary artery disease in systemic lupus erythematosus. *Med Sci Monit* [Internet]. 2008 May [cited 2015 Apr 7];14(5):CR233–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18443545>
124. Fielding CJ, Shore VG, Fielding PE. A protein cofactor of lecithin:cholesterol acyltransferase. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 1972 Feb 25 [cited 2015 Apr 7];46(4):1493–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4335615>
125. Ceruloplasmin precursor - CP - Homo sapiens (Human) [Internet]. [cited 2014 Aug 22]. Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/P00450>
126. Ceruloplasmin [Internet]. [cited 2014 Aug 22]. Available from: <http://en.wikipedia.org/wiki/Ceruloplasmin>
127. Sahebali M, Abrishami-Moghaddam M, Moezzi A, Ghayour-Mobarhan M, Mirfeizi Z, Esmaily H, et al. Association between serum trace element concentrations and the disease activity of systemic lupus erythematosus. *Lupus* [Internet]. 2014 Jul [cited 2016 Feb 16];23(8):793–801. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24759629>
128. Fibrinogen alpha chain precursor - FGA - Homo sapiens (Human) [Internet]. [cited 2014 Aug 21]. Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/P02671>
129. Datta A, Chen CP, Sze SK. Discovery of prognostic biomarker candidates of lacunar infarction by quantitative proteomics of microvesicles enriched plasma. *PLoS One*. Public Library of Science; 2014;9(4).
130. Liu J, Jiang T, Wei L, Yang X, Wang C, Zhang X, et al. The discovery and identification of a candidate proteomic biomarker of active tuberculosis. *BMC Infect Dis* [Internet]. *BMC Infectious Diseases*; 2013;13(1):506. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3870977&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
131. Haptoglobin precursor - HP - Homo sapiens (Human) [Internet]. [cited 2014 Aug

- 22]. Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/P00738>
132. Pavón EJ, Muñoz P, Lario A, Longobardo V, Carrascal M, Abián J, et al. Proteomic analysis of plasma from patients with systemic lupus erythematosus: increased presence of haptoglobin alpha2 polypeptide chains over the alpha1 isoforms. *Proteomics*. 2006;6 Suppl 1:S282–92.
 133. Ijäs P, Saksi J, Soine L, Tuimala J, Jauhiainen M, Jula A, et al. Haptoglobin 2 allele associates with unstable carotid plaque and major cardiovascular events. *Atherosclerosis*. 2013;230(2):228–34.
 134. Tolosano E, Altruda F. Hemopexin: structure, function, and regulation. *DNA Cell Biol* [Internet]. 2002 Apr [cited 2015 Apr 7];21(4):297–306. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12042069>
 135. Hahl P, Davis T, Washburn C, Rogers JT, Smith A. Mechanisms of neuroprotection by hemopexin: modeling the control of heme and iron homeostasis in brain neurons in inflammatory states. *J Neurochem* [Internet]. 2013 Apr [cited 2015 Apr 7];125(1):89–101. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3752430&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 136. Hernández C, García-Ramírez M, Simó R. Overexpression of hemopexin in the diabetic eye: a new pathogenic candidate for diabetic macular edema. *Diabetes Care* [Internet]. 2013 Sep [cited 2015 Apr 7];36(9):2815–21. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3747892&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 137. Serotransferrin precursor - TF - Homo sapiens (Human) [Internet]. [cited 2014 Aug 22]. Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/P02787>
 138. Custodio A, López-Farré AJ, Zamorano-León JJ, Mateos-Cáceres PJ, MacAya C, Caldés T, et al. Changes in the expression of plasma proteins associated with thrombosis in BRCA1 mutation carriers. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2012;138(5):867–75.
 139. Monteiro JP, Cunha DF da, Cunha SF de C da, Santos VM dos, Silva-Vergara ML, Correia D, et al. Resposta de fase aguda, subnutrição e estado nutricional do ferro em adultos com AIDS. *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. SBMT; 2000 Apr [cited 2015 Apr 12];33(2):175–80. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822000000200003&lng=en&nrm=iso&tlng=pt
 140. KLKB1 kallikrein B, plasma (Fletcher factor) 1 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [cited 2015 Apr 7]. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=kallikrein+B%2C+plasma+\(Fletcher+factor\)+1+provided+by+HGNC](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=kallikrein+B%2C+plasma+(Fletcher+factor)+1+provided+by+HGNC)
 141. Sainz IM, Pixley RA, Colman RW. Fifty years of research on the plasma kallikrein-kinin system: from protein structure and function to cell biology and in-vivo pathophysiology. *Thromb Haemost* [Internet]. 2007 Jul [cited 2015 Apr 7];98(1):77–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17597995>
 142. Schmaier AH. Assembly, activation, and physiologic influence of the plasma kallikrein/kinin system. *Int Immunopharmacol* [Internet]. 2008 Feb [cited 2015 Apr 7];8(2):161–5. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2266068&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

ntrez&rendertype=abstract

143. Merlo C, Wuillemin WA, Redondo M, Furlan M, Sulzer I, Kremer-Hovinga J, et al. Elevated levels of plasma prekallikrein, high molecular weight kininogen and factor XI in coronary heart disease. *Atherosclerosis* [Internet]. 2002 Apr [cited 2015 Apr 7];161(2):261–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11888508>
144. MacKenzie JA, Roosa KA, Gump BB, Dumas AK, Bendinskas KG. Plasma prekallikrein levels are positively associated with circulating lipid levels and the metabolic syndrome in children. *Appl Physiol Nutr Metab* [Internet]. 2010 Aug [cited 2015 Apr 7];35(4):518–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20725119>
145. Speidl WS, Kastl SP, Huber K, Wojta J. Complement in atherosclerosis: friend or foe? *J Thromb Haemost* [Internet]. 2011 Mar [cited 2015 Mar 21];9(3):428–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21155967>
146. Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol* [Internet]. 2010 Sep [cited 2014 Jul 11];11(9):785–97. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2924908&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
147. Duong PT, Collins HL, Nickel M, Lund-Katz S, Rothblat GH, Phillips MC. Characterization of nascent HDL particles and microparticles formed by ABCA1-mediated efflux of cellular lipids to apoA-I. *J Lipid Res* [Internet]. 2006 Apr [cited 2015 Apr 7];47(4):832–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16418537>
148. Gavish D, Oschry Y, Eisenberg S. In vivo conversion of human HDL3 to HDL2 and apoE-rich HDL1 in the rat: effects of lipid transfer protein. *J Lipid Res* [Internet]. 1987 Mar [cited 2015 Apr 7];28(3):257–67. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3572251>
149. Fielding CJ, Fielding PE. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J Lipid Res* [Internet]. 1995 Feb [cited 2015 Apr 7];36(2):211–28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7751809>
150. Lewis GF, Rader DJ. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circ Res* [Internet]. 2005 Jun 24 [cited 2015 Mar 11];96(12):1221–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15976321>
151. Ohashi R, Mu H, Wang X, Yao Q, Chen C. Reverse cholesterol transport and cholesterol efflux in atherosclerosis. *QJM* [Internet]. 2005 Dec [cited 2015 Apr 7];98(12):845–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16258026>
152. Tan KCB. Reverse cholesterol transport in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Obes Metab* [Internet]. 2009 Jun [cited 2015 Apr 7];11(6):534–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19175378>
153. van der Velde A-E. Reverse cholesterol transport: from classical view to new insights. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2010 Dec 21 [cited 2015 Apr 7];16(47):5908–15. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3007102&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

ntrez&rendertype=abstract

154. Lucisano Valim YM, Lachmann PJ. The effect of antibody isotype and antigenic epitope density on the complement-fixing activity of immune complexes: a systematic study using chimaeric anti-NIP antibodies with human Fc regions. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 1991 Apr [cited 2015 Mar 30];84(1):1–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1535367&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
155. Gasque P. Complement: a unique innate immune sensor for danger signals. *Mol Immunol* [Internet]. 2004 Nov [cited 2015 Jan 12];41(11):1089–98. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15476920>
156. Kohl J. The Role of Complement in Danger Sensing and Transmission. *Immunol Res* [Internet]. 2006 Jan [cited 2015 Apr 7];34(2):157–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16760575>
157. Hiemstra PS, Biewenga J, Gorter A, Stuurman ME, Faber A, van Es LA, et al. Activation of complement by human serum IgA, secretory IgA and IgA1 fragments. *Mol Immunol* [Internet]. 1988 Jun [cited 2015 Apr 7];25(6):527–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3173354>
158. Hiemstra PS, Gorter A, Stuurman ME, Van Es LA, Daha MR. Activation of the alternative pathway of complement by human serum IgA. *Eur J Immunol* [Internet]. 1987 Mar [cited 2015 Apr 7];17(3):321–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3569402>
159. Xu Y, Narayana S V, Volanakis JE. Structural biology of the alternative pathway convertase. *Immunol Rev* [Internet]. 2001 Apr [cited 2015 Apr 7];180:123–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11414354>
160. Ruggerenti P, Noris M, Remuzzi G. Thrombotic microangiopathy, hemolytic uremic syndrome, and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Kidney Int* [Internet]. 2001 Sep [cited 2015 Apr 7];60(3):831–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11532079>
161. Nangaku M, Nishi H, Fujita T. Pathogenesis and prognosis of thrombotic microangiopathy. *Clin Exp Nephrol* [Internet]. 2007 Jun [cited 2015 Apr 7];11(2):107–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17593509>
162. Polito MG, Kirsztajn GM. Thrombotic microangiopathies: thrombotic thrombocytopenic purpura / hemolytic uremic syndrome. *J Bras Nefrol 'orgão Of Soc Bras e Latino-Americana Nefrol* [Internet]. Jan [cited 2015 Apr 7];32(3):303–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21103695>
163. Asanuma Y, Chung CP, Oeser A, Shintani A, Stanley E, Raggi P, et al. Increased concentration of proatherogenic inflammatory cytokines in systemic lupus erythematosus: relationship to cardiovascular risk factors. *J Rheumatol* [Internet]. 2006 Mar [cited 2015 Mar 15];33(3):539–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16463434>
164. Hu S, Xu Q, Xiao W, Huang M. The expression of molecular chaperone HSP90 and IL-6 in patients with systemic lupus erythematosus. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* [Internet]. 2006 Jan [cited 2015 Sep 3];26(6):664–6.

Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17357483>

165. Yao X, Huang J, Zhong H, Shen N, Faggioni R, Fung M, et al. Targeting interleukin-6 in inflammatory autoimmune diseases and cancers. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2014 Feb [cited 2015 Mar 19];141(2):125–39. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24076269>

ANEXO A: Protocolo de pesquisa para participantes com LES.

FICHA DE ACOMPANHAMENTO GRUPO LÚPUS

Data da coleta: __/__/__;

Data do caso novo: __/__/__;

Data do início dos sintomas: __/__/__

1) Nome do Paciente:

2) Registro do Hospital das Clínicas: _____

3) Nome do responsável:

4) Critérios diagnósticos para o LES:

- ☐ Rash malar
- ☐ Rash discóide
- ☐ Fotossensibilidade
- ☐ Úlceras orais
- ☐ Artrite
- ☐ Serosite
- ☐ Alteração renal
- ☐ Alteração neurológica
- ☐ Alteração hematológica
- ☐ Alteração imunológica: {
 - ☐ Anti-DNA nativo
 - ☐ Anti-SM
 - ☐ ACA
 - ☐ PIL
- ☐ FAN

5) Comorbidades associadas ao LES (atual ou prévia):

- ☐ HAS controlada
- ☐ HAS não controlada

- ☐ Dislipidemia em tratamento dietético
- ☐ Dislipidemia em tratamento medicamentoso
- ☐ Dislipidemia não tratada
- ☐ Presença de anticorpo antifosfolípide
- ☐ Síndrome do anticorpo antifosfolípide
- ☐ Obesidade

6) Índice de dano cumulativo (SLICC/ACR-DI) Após o 6º mês de diagnóstico de LES: _____

7) Índice de atividade da doença (SLEDAI):

8) Estadiamento Puberal:

9) Medicamentos utilizados no momento:

MEDICAMENTO	DOSE/DOSE ACUMULADA	TEMPO DE USO
Prednisona		
Pulso de Metilprednisolona		
Azatioprina		
Micofenolato		
Metotretaxate		
Leflonomide		
Hidroxicloroquina		
Ciclofosfamida		
Anti-hipertensivos		
AAS		
Anticoagulante		
Estatina		

Ácido Fólico		
Cálcio		
Vitamina D		

Outros medicamentos: _____

10) Dados Antropométricos:

Dados	Peso	Estatura	IMC	Classificação IMC (OMS)	Circunferência da Cintura
Valores					
Unidades	Kg	metros	kg/m ²	Percentil	cm

11) Pressão arterial: _____

12) Dados laboratoriais:

Análises	Unidade	Resultados	Valores de Referência
Homocisteína	μmol/L		<12
Vitamina B12	pmol/L		128 - 648
Folato	ng/mL		3-17
PCR	mg/L		0,14 (mediana)
IL-6	pg/mL		3,4-5,9
TNF-α	pg/mL		8,1
MCP-1	Ng/mL		5
Leptina	ng/mL		0,5
Adiponectina	ng/mL		0,78
Grelina	pg/mL		0,6
Colesterol total	mg/dL		150-169 (limítrofe)
HDL	mg/dL		≥45
LDL	mg/dL		100-129 (limítrofe)

Triglicérides	mg/dL		100 – 129 (limítrofe)
Anti-DNA nativo			
C-3			
C-4			
Cilindrúria			
Hematúria			
Proteinúria			
Piúria			
Hemoglobina			
Hematócrito			
Plaquetas			
Leucócitos			

13) Proteínas expressas encontradas com a técnica da proteômica:

SLEDAI

ÍNDICE DE ATIVIDADE DA DOENÇA DO LÚPUS ERITEMATOSO
SISTÊMICO (SLEDAI) – BOMBARDIER et al. (1992)

MANIFESTAÇÃO	DEFINIÇÃO	PES O
CONVULSÃO	Excluir causas metabólicas, infecciosas ou drogas.	8
PSICOSE	Alteração da percepção da realidade, incluindo-se alucinações, ilusões, pensamentos desorganizados, catatonia. Excluir drogas e uremia.	8
SÍNDROME ORGÂNICO-CEREBRAL	Alteração mental com déficit de orientação, memória, julgamento e atenção, com dois de: fala incoerente, insônia, sonolência, hipo/hiperatividade motora. Excluir causas metabólicas, infecciosas ou drogas.	8
ALTERAÇÕES VISUAIS	Corpos cetóides ou hemorragias retinianas, exsudatos ou hemorragias de coróide, neurite óptica. Excluir causas infecciosas, drogas ou hipertensão.	8
ALTERAÇÕES DE NERVOS CRANIANOS	Neuropatia motora ou sensorial.	8
CEFALÉIA	Persistente, intensa tipo enxaqueca, não responsiva aos analgésicos narcóticos.	8
ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL	Excluir aterosclerose.	8
VASCULITES	Úlceras, gangrena, nódulos dolorosos, infarto sub ou peritúngueal, biópsia ou angiografia compatíveis.	8
ARTRITES	Dois ou mais articulações.	4
MIOSITES	Fraqueza ou dor muscular proximal com: elevação de enzimas musculares, eletromiografia ou biópsia compatíveis.	4
CILINDROS URINÁRIOS	Granulosos ou hemáticos.	4
HEMATÚRIA	Maior que 5 hemácias por campo. Excluir cálculos ou infecções.	4
PROTEINÚRIA	Maior que 0,5 g/dia de início recente ou aumento maior que 0,5 g/dia em relação aos valores anteriores.	4
LEUCOCITÚRIA	Maior que 5 leucócitos por campo. Excluir infecções.	4
ERITEMA MALAR		2
ALOPECIA	Perda anormal de cabelos, de forma localizada ou difusa.	2
ÚLCERAS DE MUCOSAS	Úlceras orais ou nasais.	2
PLEURITE	Dor pleurítica, com atrito ou derrame pleural ou espessamento pleural.	2
PERICARDITE	Dor pericárdica com atrito, derrame ou eletrocardiograma ou ecocardiograma compatíveis.	2
DIMINUIÇÃO DE COMPLEMENTO	Diminuição de C3, C4 ou CH50.	2
ANTI-DNA	Presença.	2
FEBRE	Temperatura maior que 38°C. Excluir infecções.	1
PLAQUETOPENIA	Menor que 100.000 plaquetas por mm³.	1
LEUCOPENIA	Menor que 3.000 leucócitos por mm³. Excluir drogas.	1
TOTAL		

Obs: válido para manifestações de início recente (dez dias anteriores à avaliação)

Pontuação do SLEDAI: _____

SLICC/ACR-DI

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

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

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

ANEXO B: Protocolo de pesquisa para participantes saudáveis.

FICHA DE ACOMPANHAMENTO GRUPO CONTROLE

Data da coleta: __/__/__;

Data de Nascimento: __/__/__

1) Nome do Paciente:

2) Registro da Vila Lobato: _____

3) Nome do responsável:

4) Estadiamento Puberal:

5) Medicamentos utilizados no momento:

6) Fumante? () Sim () Não

7) Dados Antropométricos:

Dados	Peso	Estatura	IMC	Classificação IMC (OMS)	Circunferência da Cintura
Valores					
Unidades	Kg	metros	kg/m ²	Percentil	cm

8) Pressão arterial: _____

9) Dados laboratoriais:

Análises	Unidade	Resultados	Valores de Referência
Homocisteína	μmol/L		<12
Vitamina B12	pmol/L		128 - 648
Folato	ng/mL		3-17
PCR	mg/L		0,14 (mediana)
IL-6	pg/mL		3,4-5,9
TNF-α	pg/mL		8,1
MCP-1	Ng/mL		5
Leptina	ng/mL		0,5
Adiponectina	ng/mL		0,78
Grelina	pg/mL		0,6
Colesterol total	mg/dL		150-169 (limítrofe)
HDL	mg/dL		≥45
LDL	mg/dL		100-129 (limítrofe)
Triglicérides	mg/dL		100 – 129 (limítrofe)
Anti-DNA nativo			
C-3			
C-4			
Cilindrúria			
Hematúria			
Proteinúria			
Piúria			
Hemoglobina			
Hematócrito			
Plaquetas			
Leucócitos			

10) Proteínas expressas encontradas com a técnica da proteômica:

ANEXO C: Termo de consentimento livre e esclarecido

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
DEPARTAMENTO DE PUERICULTURA E PEDIATRIA
Av. Bandeirantes, 3900. Cep 14049-900 – Ribeirão Preto – SP
Telefone: (16) 3602-2573 - FAX: (16) 3602-2700

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, PROFESSORA DOUTORA JACQUELINE PONTES MONTEIRO e a pós graduanda ROBERTA GARCIA SALOMÃO, pesquisadoras do Departamento de Puericultura e Pediatria da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP-SP), estamos desenvolvendo a pesquisa intitulada **“Homocisteína e Proteoma Plasmático no Lúpus Eritematoso Sistêmico Juvenil”**.

O objetivo da pesquisa é identificar proteínas plasmáticas que estão relacionadas a fatores ou grupo de fatores de risco que podem ajudar a prever quais pacientes terão eventos cardiovasculares ateroscleróticos precoces a fim de auxiliar no regime terapêutico em uma população de crianças e adolescentes portadores de lúpus eritematoso sistêmico, os indivíduos sem a presença desta patologia participarão para fins de comparação dos resultados dos exames laboratoriais. Será necessário a coleta de sangue para análises laboratoriais. O único risco que o projeto oferece é de uma punção venosa; os benefícios são fornecer biomarcadores específicos para evoluções no regime terapêutico do lúpus eritematoso sistêmico além de, proteínas relacionadas a fatores de risco ou a grupo e fatores de risco para auxiliar a prever quais pacientes terão eventos cardiovasculares ateroscleróticos precocemente.

EU _____

RG: _____, abaixo assinado, responsável por _____,

confirmando ter recebido todas as informações sobre a pesquisa a ser desenvolvida e, ciente dos direitos abaixo relacionados, autorizo sua participação e também, os direitos da entrevista e do levantamento de dados para serem divulgados em eventos científicos e periódicos.

Este documento oferece as seguintes garantias ao paciente e seu responsável:

- Os indivíduos colaboradores desta pesquisa irão receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a dúvidas acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros relacionados com a pesquisa;
- A liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem que isso traga qualquer prejuízo para o entrevistado;
- A segurança de que serão preservadas a identidade e privacidade do entrevistado;
- O compromisso de me valer da legislação em caso de danos;
- A garantia de que não haverá riscos e nem desconfortos, ou gastos de qualquer natureza;
- A garantia de seguir todas as exigências que constam na Resolução 196/96, de 10 de outubro de 1996, que regulamenta o desenvolvimento de pesquisas envolvendo seres humanos e prevendo que todo o indivíduo menor de idade deve possuir um termo de consentimento de seu representante legal para participar como sujeito da pesquisa. Telefone para dúvidas: (16)3602-2478.

Participante da pesquisa

Roberta Garcia Salomão

Assinatura do responsável

ANEXO D: Foto representativa da imunodepleção das proteínas mais abundantes (Albumina e IgG).

ANEXO E: Porcentagem de cobertura da identificação das proteínas diferencialmente expressas entre os clusters CMPM, LMPM e LPPM pelo Scaffold.

APOA1_HUMAN (100%), 30,778.5 Da

Apolipoprotein A-I OS=Homo sapiens GN=APOA1 PE=1 SV=1

25 exclusive unique peptides, 42 exclusive unique spectra, 908 total spectra, 180/267 amino acids (67% coverage)

MKAAVLTLAV	LFLTGSQARH	FWQQDEPPQS	PWDRVKDLAT	VYVDVLKDSG
RDYVSQFEGS	ALGKQLNLKL	LDNWDSVTST	FSKLREQLGP	VTQEFWDNLE
KETEGLRQEM	SKDLEEVKAK	VQPYLDDFQK	KWQEEEMELYR	QKVEPLRAEL
QEGARQKLHE	LQEKLSPLGE	EMRDRARAHV	DALRTHLAPY	SDELRLQRLAA
RLEALKENG	ARLAEYHAKA	TEHLSTLSEK	AKPALEDLRQ	GLLPVLESFK
VSFLSALEEY	TKKLNLTQ			

A2MG_HUMAN (100%), 163,289.9 Da

Alpha-2-macroglobulin OS=Homo sapiens GN=A2M PE=1 SV=3

69 exclusive unique peptides, 112 exclusive unique spectra, 1292 total spectra, 842/1474 amino acids (57% coverage)

MGKNKLLHPS	LVLLLLLVLLP	TDA SVSGKPKQ	YMLVLPSSLH	TETTEKGCVL
LSYLNETHVT	SASLESVRGN	RSFLTDLAEAE	NDVLHCVAFA	VPKSSSNEEV
MFLTQVQKGP	TQEFKKRTTV	MVKNEDSLVF	VQTDKSIYKP	GQTVKFRVVS
MDENFHPLNE	LIPLVYIQDP	KGNRIAQWQS	FQLEGGGLKQF	SFPLSSEPFQ
GSYKVVVQKK	SGGRTEHPFT	VEEFVLQKFE	VQVTVPKIIT	ILEEEMNVSV
CGLYTYGKPV	PGHVTVSICR	KYSDASDCHG	EDSQAFCCKF	SGQLNSHGCF
YQQVKTKVFQ	LKRKEYEMKL	HTEAQIQEEG	TVVELTGRQS	SEITRTITKL
SFVKVDSHFR	QGIPFFGQVR	LVDGKGVPPI	NKVIFIRGNE	ANYYSNATTD
EHGLVQFSIN	TTNVMGTSLT	VRVNYKDRSP	CYGYQWVSEE	HEEAHTAYL
VFSPSKSFVH	LEPMSHELPC	GHTQTVQAHY	ILNGGTLGL	KKLSFYLLIM
AKGGIVRTGT	HGLLVKQEDM	KGHFSISIPV	KSDIAPVARL	LIYAVLPTGD
VIGDSAKYDV	ENCLANKVDL	SFSPQSLSLA	SHAHLRVTAA	PQSVCALRAV
DQSVLLMKPD	AELSASSVYN	LLPEKDLTGF	PGPLNDQDNE	DCINRHNVI
NGITYTPVSS	TNEKDMYSFL	EDMGLKAFNT	SKIRKPKMCP	QLQQYEMHGP
EGLRVGFYES	DVMGRGHARL	VHVEEPTTET	VRKYFPETWI	WDLVVVNSAG
VAEVGVTVPD	TITEWKAGAF	CLSEDAGLGI	SSTASLRAFQ	PPFVELTMPY
SVIRGEAFTL	KATVLNLYLPK	CIRVSVQLEA	SPAFLAVPVE	KEQAPHCICA
NGRQTVSWAV	TPKSLGNVNF	TVSAEALLESQ	ELCGTEVPSV	PEHGRKDTV
KPLLVEPEGL	EKETTFNSLL	CPSGGEVSEE	LSLKLPPNVV	EESARASVSV
LGDILGSAHQ	NTQNLQMPY	GCGEQNMVLF	APNIYVLDYL	NETQQLTPEI
KSKAIGYLTN	GYQRQLNKKH	YDGSYSTFGE	RYGRNQGNW	LTAFLVKTFA
QARAYIFIDE	AHITQALIW	SQRQKDNCGF	RSSGSLLNNA	IKGGVEDEV
LSAYITIAL	EIPLTVTHPV	VRNALFCLES	AWKTAQEGDH	GSHVYTKALL
AYAFALAGNQ	DKRKEVLKSL	NEEAVKCDNS	VHWERPQKPK	APVGHFYEPQ
APSAEVEMTS	YVLLAYLTAQ	PAPTSEDLTS	ATNIVKWITK	QQNAQGGFSS
TQDTVVALHA	LSKYGAATFT	RTGKAAQVTI	QSSGTFSSKF	QVDNNRRLLL
QQVSLPELPG	EYSMKVTGEG	CVYLQTSLSKY	NILPEKEEFP	FALGVQTLPO
TCDEPKAHTS	FQISLSVSYT	GSR SASNMAI	VDVKMVS GFI	PLKPTVKMLE

A1AT_HUMAN (100%), 46,737.9 Da

Alpha-1-antitrypsin OS=Homo sapiens GN=SERPINA1 PE=1 SV=3

27 exclusive unique peptides, 47 exclusive unique spectra, 619 total spectra, 264/418 amino acids (63% coverage)

MPSSVSWGIL	LLAGLCCLVP	VSLAEDPQGD	AAQKTDTS HH	DQDHPTFNKI
TPNLAEFAFS	LYRQLAHQSN	STNIFFSPVS	IATAFAMLSL	GTKADTHDEI
LEGLNFNLT	IPEAQIHGEG	QELLRTL NQP	DSQLQLTTGN	GLFLSEGLKL
VDKFLEDVKK	LYHSEAF TVN	FGDTEEA KKQ	INDYVEKGTQ	GKIVDLVKEL
FRDITVFALVN	YIFFK GKWER	PFEVKDTEEE	DFHVDQVTTV	KVPMMKRLGM
DNIQHCCKLS	SWVLLMKYLG	NATAIFFLPD	EGKLQHLENE	LTHDITTKFL
ENEDRRSASL	HLPKLSITGT	YDLKSVLGQL	GITKVF SNGA	DLSGVTEEAP
LKLSKAVHKA	VLTIDEKGTE	AAGAMFLEAI	PMSIPPEVKF	NKPFVFLMIE
QNTKSPFLMG	KVVNPTQK			

APOE_HUMAN (100%), 36,153.5 Da

Apolipoprotein E OS=Homo sapiens GN=APOE PE=1 SV=1

4 exclusive unique peptides, 5 exclusive unique spectra, 36 total spectra, 39/317 amino acids (12% coverage)

MKVLWAA LLV	TFLAGCQAKV	EQAVETEPEP	ELRQQTEWQS	GQRWELALGR
FWDYLRVWQT	LSEQVQEELL	SSQVDTMELRA	LMDETMKELK	AYKSELEEQ
TPVAEETRAR	LSKELQAAQA	RLGADME DVC	GRLVQYRGEV	QAMLGQSTEE
LRVRLASHLR	KLRKRLLRDA	DDLQKRLAVY	QAGAREGAER	GLSAIRERLG
PLVEQGRVRA	ATVGSLAGQP	LQERAQAWGE	RLRARMEEEM	SRTRDRLLDEV
KEQVAEVRAR	LEEQAQQIRL	QAEAFQARLK	SWFEPLVEDM	QRQWAGLVEK
VQAAVGTSA	PVPSDNH			

CO3_HUMAN (100%), 187,149.1 Da

Complement C3 OS=Homo sapiens GN=C3 PE=1 SV=2

82 exclusive unique peptides, 117 exclusive unique spectra, 940 total spectra, 1083/1663 amino acids (65% coverage)

MGPTSGPSLL	LLLLTHLPLA	LGSPMYSIT	PNILRLESEE	TMVLEAHDAQ
GDVPVTVTVH	DFFPGKKLVLS	SEKTVLTPAT	NHMGNTFTI	PANREFKSEK
GRNKFVTVQA	TFGTQVVEKV	VLVSLQSGYL	FIQTDKTIYT	PGSTVLRYIF
TVNHKLLPVG	RTVMVNIENP	EGIPVKQDSL	SSQNQLGVLP	LSWDIPELVN
MGQWKIRAYY	ENSPQQVFST	EFEVKEYVLP	SFEVIVEPTE	KFYIYNEKG
LEVITITARFL	YGKKVEGTAF	VIFGIQDGEQ	RISLPESLKR	IPIEDGSGEV
VLSRKVLLDG	VQNPRAEDLV	GKSLYVSATV	ILHSGSDMVQ	AERSGPIIVT
SPYQIHFTKT	PKYFKPGMPF	DLMVFTVNP	GSPAYRVPVA	VQGEDTVQSL
TQGDGVAKLS	INTHPSQKPL	SITVRTKKQE	LSEAEQATRT	MQALPYSTVG
NSNNYLHLSV	LRTELRLPGET	LNVNFLLRMD	RAHEAKIRYY	TYLIMNKGRL
LKAGRQVREP	GQDLVVLPLS	ITTDIFPSFR	LVAYYTLIGA	SGQREVVA
VWVDVKDSCV	GSLVVKSGQS	EDRPQVPQQQ	MTLKEGDHGG	ARVVLVAVDK
GVFVLNKKNK	LTQSKIWDVV	EKADIGCTPG	SGKDYAGVFS	DAGLTFTSSS
GQQTAQRREL	QCPQPAARRR	RSVQLTEKRM	DKVGKYPKEL	RKCCEDGMRE
NPMRFSCQRR	TRFISLGEAC	KKVFLDCCNY	ITELRRQHAR	ASHLGLARSN
LDEDIIAEEN	IVSRSEFPES	WLWNVEDLKE	PPKNGISTKL	MNIFLKDSIT
TWEILAVSMS	DKKGICVADP	FEVTVMQDFF	IDLRLPYSVV	RNEQVEIRAV
LYNYRQNL	KVRVELLHNP	AFCSLATTKR	RHQQTVTIPP	KSSLVPIYVI
VPLKTGLQEV	EVKAAVYHHF	ISDGVRSKSLK	VVPEGIRMNK	TVAVRTLDP
RLGREGVQEL	DIPPADLSDQ	VPDTESETRI	LLQGTVPVQAM	TEDAVIDAERL
KHLIVTPSGC	GEQNMIGMTP	TVIAVHYLDE	TEQWEKFGLE	KRQGALELIK
KGYTQQLAFR	QPSSAFAAFV	KRAPSTWLTA	YVVKVFSLAV	NLIAIDSQVL
CGAVKWLILE	KQKPDGVFQE	DAPVIHQEMI	GGLRNNNEKD	MALTAFLVIS
LQEAQDICEE	QVNSLPGSIT	KAGDFLEANY	MNLQRSYTVA	IAGYALAQMG
RLKGPLLNKF	LTTAKDKNRW	EDPGKQLYNV	EATSYALLAL	LQLKDFDFVP
PVVRWLNEQR	YYGGGYGSTQ	ATFMVFQALA	QYQKDAPDHQ	ELNLDVSLQL
PSRSSKITHR	IHWESASLLR	SEETKENEGF	TVTAEKGKQG	TLSVQVTMYHA
KAKDQLTCNK	FDLKVTIKPA	PETEKRPQDA	KNTMILEICT	RYRGDQDATM
SILDISMMTG	FAPDITDDLKQ	LANGVDRIYS	KYELDKAFSD	RNTLIIYLDK
VSHSEDDCLA	FKVHQYFNVE	LIQPGAVKVY	AYYNLEESCT	RFYHPEKEDG
KLNKLCDDEL	CRCAEENCFL	QKSDDKVTLE	ERLDKACEPG	VDDYVYKTRLV
KVQLSNDFDE	YIMAEIETIK	SGSDEVQVQG	QRTFISPIKC	REALKLEEK
HYLMWGLSSD	FWGEKPNLSY	IIGKDTWVEH	WPEEDECDQE	ENQKQCQDLG
AFTESMVVFG	CNP			

CERU_HUMAN (100%), 122,207.9 Da

Ceruloplasmin OS=Homo sapiens GN=CP PE=1 SV=1

17 exclusive unique peptides, 20 exclusive unique spectra, 141 total spectra, 309/1065 amino acids (29% coverage)

MKILILGIFL	FLCSTPAWAK	EKHYIIGIIE	TTWDYASDHG	EKKLISVDTE
HSNIYQLNGP	DRIGRLYKKA	LYLQYTDETF	RTTIEKPVWL	GFLGPIIKAE
TGDKVYVHLK	NLASRPYTFH	SHGITYYKEH	EGAIYPDNTT	DFQRADDKVY
PGEQYTYMLL	ATEEQSPGEG	DGNCVTRIYH	SHIDAPKDIA	SGLIGPLIIC
KKDSLDEKEE	KHIDREFVVM	FSVVDENFSW	YLEDNIKTYC	SEPEKVDKDN
EDFQESNRMY	SVNGYTFGSL	PGLSMCAEDR	VKWYLFMGMN	EVDVHAFFH
GQALTNNKYS	IDTINLFPAT	LFDYAMVAQN	PGEWMLSCQN	LNLHAKAGLQA
FFQVQECCNK	SSKDNIRGKH	VRHYIIAAEE	IWNYPAPSGI	DIFTKENLTA
PGSDSAVFFE	QGTTRIGGSY	KKLVYREYTD	ASFTNRKERG	PEEEHLGILG
PVIWAEVGD	IRVTFHNKGA	YPLSIEPIGV	RFNKNNEGTY	YSPNYNQPSR
SVPPSASHVA	PTETFTYEW	VPKEVGPTNA	DPVCLAKMY	SAVDPTKDF
TGLIGPMKIC	KKGSLHANGR	QKDVDFKEFY	FPTVFDENES	LLLEDNIRMF
TTAPDQVDKE	DEDFQESNM	HSMNGFMYGN	QPGLTMCCKG	SVVWYLFSA
NEADVHGIYF	SGNTYLWRGE	RRDTANLFPQ	TSLTLMWHPD	TEGTFNVECL
TTDHYTGGMK	QKYTVNQCR	QSEDSTFYLG	ERTYYIAAVE	VEWDVSPQRE
WEKELHHLQE	QNVSNAFLDK	GEFYIGSKYK	KVVYRQYTD	TFRVDPYVERK
EGEHLGILGP	QLHADVGDKV	KIIFKNMATR	PYSIHAGGVQ	TESSTVPTPL
PGETLTGVVK	IPERSGAGTE	DSACIPWAYY	STVDQVKDLY	SGLIGPLIVC
RRPYLKVFNP	RRKLEFALLF	LVFDENESWY	LDDNIKTYSD	HPEKVNKDDE
EFIESNKMHA	INGRMFGNLQ	GLTMHVGDV	NWYLMGMGNE	IDLHTVHFHG
HSFYQYKRGV	YSSDVFDIFP	GTYQTLEMF	RTPGIWL LHC	HVTDHIHAGM
ETTYTVLQNE	DTKSG			

FIBA_HUMAN (100%), 94,973.4 Da

Fibrinogen alpha chain OS=Homo sapiens GN=FGA PE=1 SV=2

31 exclusive unique peptides, 52 exclusive unique spectra, 470 total spectra, 365/866 amino acids (42% coverage)

MFSMRIVCLV	LSVVGTAWTA	DSGEGDFLAE	GGGVRGPRVV	ERHQSAACKDS
DWPFCSDEDW	NYKCPSGCRM	KGLIDEVNDQ	FTNRINKLKN	SLFEYQKNNK
DSHSLTTNIM	EILRGDFSSA	NNRDNTYNRV	SEDLRSRIEV	LKRKVIEKVQ
HIQLLQKNI	AQLVDMKRL	VLDIKIRSC	RGSCSRALAR	EVDLKDYEDQ
KQQLLEQVIAK	DLPLSRDRQH	LPIIKMKPVP	DLVPGNFKSQ	LQKVPEWKA
LTDMPQMRME	LERPGGNEIT	RGGSTSYGTG	SETESPRNPS	SAGSWNSGSS
PGSGTGNRNP	GSSGTGGTAT	WKPGSSSGPGS	TGSWNSGSSG	TGSTGNQNP
SPRPGSTGTW	NPGSSSERGSA	GHWTSESSVS	GSTGQWHS	GSFRPDSPGS
GNARPNPDW	GTFEVSGNV	SPGTRREYHT	EKLVTSGDK	ELRTGKEKVT
SGSTTTTRRS	CSKTVTKTVI	PGDGHKKEVTK	EVVTSEDGSD	CPEAMDGLTGL
SGIGTLDGFR	HRHPDEAAFF	DTASTGKTFP	GFFSPMLGEF	VGETESRGS
SGIFTNTKES	SSHHPGIAEF	PSRGKSSSY	KQFTSSTSYN	RGDSTFESKS
YKMADEAGSE	ADHEGTHSTK	RGHAKSRPVR	DCDDVLQTHP	SGTQSGIFNI
KLPGSSKIFS	VYCDQETSLG	GWLLIQQRMD	GSLNFRNTRW	DYKRGFGSLN
DEGEGEFWLG	NDYLHLLTQR	GSVLRVLEED	WAGNEAYAEY	HFRVGSSEAG
YALQVSSYEG	TAGDALIEGS	VEEGAETSH	NNMQFSTFDR	DADQWEENCA
EYVGGGWYIN	NCQAANLNGI	YYPGGSYDPR	NNSPYEIE	VVWVSFRGAD
YSLRAVRMKI	RPLVTQ			

HPT_HUMAN (100%), 45,204.9 Da

Haptoglobin OS=Homo sapiens GN=HP PE=1 SV=1

21 exclusive unique peptides, 35 exclusive unique spectra, 462 total spectra, 218/406 amino acids (54% coverage)

MSALGAVIAL	LLWGQLFAVD	SGNDVTDIAD	DGCPKPPEIA	HGYVEHSVRY
QCKNYKLR	EGDGVYTLND	KKQWINKAVG	DKLPECEADD	GCPKPPEIAH
GYVEHSVRYQ	CKNYKLRTE	GDGVYTLNNE	KQWINKAVGD	KLPECEAVCG
KPKNPANPVQ	RILGGHLDK	GSFPWQAKMV	SHHNLTTGAT	LINEQWLLTT
AKNLFNLHSE	NATAKDIAPT	LTLYVGKKQL	VEIEKVVLHP	NYSQVDIGLI
KLKQKVSVNE	RVMPICLPSK	DYAEVGRVGY	VSGWGRNANF	KFTDHLKYVM
LPVADQDQCI	RHYEGSTVPE	KKTPKSPVGV	QPILNEHTFC	AGMSKYQEDT
CYGDAGSAFA	VHDLEEDTWY	ATGILSFDKS	CAVAEYGVYV	KVTSIQDWVQ
KTIAEN				

HEMO_HUMAN (100%), 51,676.5 Da

Hemopexin OS=Homo sapiens GN=HPX PE=1 SV=2

19 exclusive unique peptides, 29 exclusive unique spectra, 278 total spectra, 226/462 amino acids (49% coverage)

MARVLGAPVA	LGLWSLCWSL	AIAATPLPPTS	AHGNVAEGET	KPDPDVTERC
SDGWSFDATT	LDDNGTMLFF	KGEFVWKSHK	WDRELISERW	KNFSPVDAA
FRQGHNSVFL	IKGDKVWVYP	PEKKEKGYPK	LLQDEFPGIP	SPLDAAVECH
RGECQAEGVL	FFQGDREWFV	DLATGTMKER	SWPAVGNCS	ALRWLGRYCY
FQGNQFLRFD	PVRGEVPPRY	PRDVRDYFMP	CPGRGHGHRN	GTGHGNSHH
GPEYMRCSPH	LVLSALTSDN	HGATYAFSGT	HYWRLDTSRD	GWHSWPIAHQ
WPQGPPSAVDA	AFSWEEKLYL	VQGTQVYVFL	TKGGYTLLVSG	YPKRLEKEVG
TPHGIILDSV	DAAFICPGSS	RLHIMAGRRL	WWLDLKSGAQ	ATWTELPWPH
EKVDGALCME	KSLGPNSCSA	NGPGLYLIHG	PNLYCYS DVE	KLNAAKALPQ
PQNVTSLLGC	TH			

TRFE_HUMAN (100%), 77,064.3 Da

Serotransferrin OS=Homo sapiens GN=TF PE=1 SV=3

48 exclusive unique peptides, 84 exclusive unique spectra, 1172 total spectra, 468/698 amino acids (67% coverage)

MRLAVGALLV	CAVLGLCLAV	PDKTVRWCAV	SEHEATKCQS	FRDHMKSVIP
SDGPSVACVK	KASYLDCIRA	IAANEADAVT	LDAGLVYDAY	LAPNNLKPVV
AEFYGSKEDP	QTFYAVAVV	KKDSGFQMNQ	LRGKKSCHTG	LGRSAGWNIP
IGLLYCDLPE	PRKPLEKAVA	NFFSGSCAPC	ADGTDFFPQLC	QLCPGCGCST
LNQYFGYSGA	FKCLKDGAGD	VAFVKHSTIF	ENLANKADRD	QYELLCLDNT
RKPVDEYKDC	HLAQVPSHTV	VARSMGGKED	LIWELLNQAQ	EHFGKDKSKE
FQLFSSPHGK	DLLFKDSAHG	FLKVPPRMDA	KMYLGYEYVT	AIRNLRREGTC
PEAPTDECKP	VKWCALSHHE	RLKCDWSVN	SVGKIECVSA	ETTEDCIAKI
MNGEADAMSL	DGGFVYIAGK	CGLVPVLAEN	YNKSDNCEDT	PEAGYFAIAV
VKKASASDLTW	DNLKGGKKSCH	TAVGRTAGWN	IPMGLLYNKI	NHCRFDEFFS
EGCAPGSKKD	SSLCKLCMGS	GLNLCEPNNK	EGYYGYTGAF	RCLVEKGDVA
FVKHQTV PQN	TGGKNPDPWA	KNLNEKDYEL	LCLDGTTRKPV	EEYANCHLAR
APNHAVVTRK	DKEACVHKIL	RQQQHLFGSN	VTDCSGNFCL	FRSEKDLLF
RDDTVCLAKL	HDRNTYEKYL	GEEYVKA VGN	LRKCSTSSLL	EACTFRRP