

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO
ADULTO**

ANNA CAROLINA FARIA MOREIRA GOMES TAVARES

**AVALIAÇÃO DO COMPRIMENTO RELATIVO DO TELÔMERO EM PACIENTES COM
LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO E SUA ASSOCIAÇÃO COM
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E COGNIÇÃO**

**BELO HORIZONTE
2023**

ANNA CAROLINA FARIA MOREIRA GOMES TAVARES

**AVALIAÇÃO DO COMPRIMENTO RELATIVO DO TELÔMERO EM PACIENTES COM
LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO E SUA ASSOCIAÇÃO COM
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E COGNIÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Maria Kakehasi

Coorientadora: Profa. Dra. Gilda Aparecida Ferreira

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida Camargos Bicalho

**BELO HORIZONTE
2023**

T231a Tavares, Anna Carolina Faria Moreira Gomes.
Avaliação do comprimento relativo do Telômero em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico e sua associação com características clínicas e cognição [recursos eletrônicos]. / Anna Carolina Faria Moreira Gomes Tavares. - - Belo Horizonte: 2023.
142f.: il.
Formato: PDF.
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Adriana Maria Kakehasi
Coorientador (a): Gilda Aparecida Ferreira; Maria Aparecida Camargos Bicalho.
Área de concentração: Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Lúpus Eritematoso Sistêmico. 2. Telômero. 3. Envelhecimento. 4. Dissertação Acadêmica. I. Kakehasi, Adriana Maria. II. Ferreira, Gilda Aparecida. III. Bicalho, Maria Aparecida Camargos. IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. V. Título.

NLM: QZ 194

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO

FOLHA DE APROVAÇÃO

AVALIAÇÃO DO COMPRIMENTO RELATIVO DO TELÔMERO EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO E SUA ASSOCIAÇÃO COM CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E COGNIÇÃO

ANNA CAROLINA FARIA MOREIRA GOMES TAVARES

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia vinte e seis de outubro de dois mil e vinte e três, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes professores doutores:

Adriana Maria Kakehazi - Orientadora
UFMG

Maria Aparecida Camargos Bicalho - Coorientadora
UFMG

Gilda Aparecida Ferreira - Coorientadora
UFMG

Edgard Torres dos Reis Neto
UNIFESP

Izabela Guimarães Barbosa
UFMG

Belo Horizonte, 26 de outubro de 2023.



Documento assinado eletronicamente por Edgard Torres dos Reis Neto, Usuário Externo, em 03/11/2023, às 14:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Izabela Guimarães Barbosa, Professora do Magistério Superior, em 06/11/2023, às 09:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Adriana Maria Kakehazi, Subchefe de departamento, em 09/11/2023, às 16:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Gilda Aparecida Ferreira, Professora do Magistério Superior, em 14/11/2023, às 14:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Maria Aparecida Camargos Bicalho, Professora do Magistério Superior, em 18/11/2023, às 19:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 2729149 e o código CRC AF088D64.

Àqueles que me trazem à minha melhor versão,
Minha inspiração diária,
Com todo o meu amor,
Para Homero, Fernanda e Isabela.

AGRADECIMENTOS

A lista é grande. Fazer pesquisa no Brasil é uma arte feita a muitas mãos perseverantes. É impossível seguir sozinho. E eu não estive sozinha em nenhum minuto de minha caminhada ao longo destes mais de dois anos.

Meu primeiro grande agradecimento é para os pacientes. Sem eles, não seria possível. É emocionante ver o misto de generosidade e esperança em suas vontades de colaborar e se doar, o que nos torna, pesquisadores, eternamente responsáveis pelo que cativamos e despertamos nestas pessoas que estão sob os nossos cuidados.

Sigo agradecendo minhas orientadoras, que conceberam comigo este projeto, me deram asas para voar e solo firme para pousar. Para mim, é uma honra e um privilégio ter vocês comigo, trabalhar e aprender, todos os dias, com estas mulheres exímias, inteligentes, sábias, experientes, gentis e generosas, que torceram por mim e me incentivaram desde o começo, vibraram com cada vitória e me acalmaram em cada intempérie do caminho. Professora Adriana trouxe calma e serenidade para esta pessoa de mente inquieta e agitada. Foi luz em cada dificuldade e me orientou na direção dos caminhos certos a serem tomados. Professora Gilda, minha eterna referência e inspiração em lúpus eritematoso sistêmico, nossa relação amadureceu ao longo da jornada e pudemos sedimentá-la, de um jeito novo, com sabedoria e alegria. Professora Maria Aparecida colocou um arsenal à minha disposição, referência no estudo do telômero, acolheu meu anseio em estudar senescência nas doenças reumáticas, trazendo toda a sua expertise para o trabalho. Obrigada, queridas orientadoras, vocês são brilhantes! Toda a minha admiração por vocês!

Agradeço também a todos os demais envolvidos em todo o processo, em especial Carol Ruas, nossa ex-residente que me auxiliou na coleta dos dados, Carol Bolaños, que me ensinou tudo sobre o trabalho da bancada, desde a coleta de sangue até o processamento das amostras, Dani Valadão, por me acolher dentro do Laboratório de Medicina Molecular, Jéssica Martins, por me auxiliar na inclusão dos participantes do

grupo controle, e alunos de iniciação científica, que colaboraram durante a realização dos experimentos. O maior aprendizado que levo de vocês é que juntos somos mais fortes.

Aos membros de minha banca de qualificação, Profa. Dra. Débora Cerqueira Calderaro, Dr. Edgard Torres dos Reis Neto e Dra. Maria Fernanda de Brandão Resende Guimarães, por suas valiosas contribuições, que muito me auxiliaram na melhoria deste projeto nesta reta final.

Aos amigos que a Reumatologia me trouxe, em especial Fabrícia, Joana, Gustavo França e Gustavo Resende, por suas sábias palavras ao longo da caminhada, por todo o apoio nos momentos mais difíceis e por vibrarem comigo as minhas conquistas. Vocês foram uma sólida rede de apoio!

À Sociedade Brasileira de Reumatologia, por financiar este estudo, viabilizando sua execução.

Aos meus pais, Ailza e José, por terem me permitido chegar até aqui, terem dado todas as condições para eu ser quem eu quisesse na vida. Por terem regado a minha vida de muito amor, respeito, carinho e gentileza, e por terem me ensinado a ser quem eu sou. Por acolherem as minhas escolhas, mesmo sabendo que escolheriam diferente. Por me ensinarem a ter fé e por serem o meu maior exemplo de honestidade, resiliência, perseverança e generosidade.

Aos meus irmãos, Raphael e Thaís, que torcem por mim incondicionalmente, que me ensinaram a dividir e compartilhar, que me ensinaram que cada um tem a sua vez, e que se a gente unir forças podemos multiplicar. E agradeço por trazerem para a minha vida a Bruna e o Rafael, o Felipe, o Gabriel, a Olívia e o Antônio, juntos formamos um time de respeito!

Aos meus sogros, Solange e Homero, e aos meus cunhados, Tiago e Marcos, por serem a família que meu esposo me deu, por torcerem pelo sucesso dos meus projetos e estarem sempre em oração por mim, emanando boas energias, mesmo que à distância.

E, por fim, e mais importante, ao Homero, à Fernanda e à Isabela. Obrigada, Homero, por todo o seu apoio incondicional, por acolher minhas imperfeições com um sorriso no rosto, por acreditar em mim mesmo quando eu não estou acreditando, por estar sempre na primeira fileira aplaudindo de pé, pela compreensão com as minhas ausências, por seu exemplo de amor, fé, retidão, trabalho, temperança, por sua inteligência e suas palavras sábias que me auxiliam a encontrar os caminhos. E muito obrigada, minhas filhotas, Fernanda e Isabela, pelo novo sentido que deram à minha vida. Por serem minha maior razão para voltar para casa. Por ficarem pacientemente colorindo ao meu lado enquanto eu trabalho. Por todas as noites que preferem dormir nos meus braços do que no conforto da própria cama. Por nem saberem o que é mestrado mas entenderem que é algo importante para mim e comemorarem comigo. Por encherem o meu potinho de amor todos os dias, o que renova as minhas forças. Eu amo muito vocês, minha família!

Certa vez, li que não há tempo certo para se começar uma história. Não precisa ser no início do ano, na segunda-feira, no início da primavera ou pela manhã. O tempo certo para se começar uma história é na hora que você decide escrevê-la.

Eis a minha dissertação.

“Por oposição aos gerontologistas, que analisam a velhice como um processo biológico, eu estou interessado na velhice como um acontecimento estético. A velhice tem a sua beleza, que é a beleza do crepúsculo. A juventude eterna, que é o padrão estético dominante em nossa sociedade, pertence à estética das manhãs. As manhãs têm uma beleza única, que lhes é própria. Mas o crepúsculo tem um outro tipo de beleza, totalmente diferente da beleza das manhãs. A beleza do crepúsculo é tranquila, silenciosa – talvez solitária. No crepúsculo tomamos consciência do tempo. Nas manhãs o céu é como um mar azul, imóvel. No crepúsculo as cores se põem em movimento: o azul vira verde, o verde vira amarelo, o amarelo vira abóbora, o abóbora vira vermelho, o vermelho vira roxo – tudo rapidamente. Ao sentir a passagem do tempo nos apercebemos que é preciso viver o momento intensamente. *Tempus fugit* – o tempo foge – portanto, *carpe diem* – colha o dia. No crepúsculo sabemos que a noite está chegando. Na velhice sabemos que a morte está chegando. E isso nos torna mais sábios e nos faz degustar cada momento como uma alegria única. Quem sabe que está vivendo a despedida olha para a vida com olhos mais ternos...”

Trecho do livro *As cores do Crepúsculo: a Estética do Envelhecer*.

Rubem Alves, 2001

RESUMO

Introdução: telômeros são complexos proteicos localizados no topo de cada braço dos cromossomos, essenciais para a manutenção da estabilidade do genoma. O encurtamento dos telômeros é encontrado no envelhecimento fisiológico e na senescência relacionada ao lúpus eritematoso sistêmico (LES). **Objetivo:** comparar o comprimento relativo dos telômeros (CT) em pacientes com LES e controles; correlacionar o CT de pacientes com LES com desfechos clínicos, comorbidades e tratamentos. **Métodos:** estudo transversal comparando pacientes com LES e controles, com idade entre 18 e 60 anos, pareados por sexo e idade. Os dados clínicos e demográficos foram sexo, idade, escolaridade, classificação étnico-racial, comorbidades, medidas antropométricas e comprimento relativo do telômero, pela técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR). Esta técnica se baseia na determinação da média dos *cycle thresholds* (Cts), ou valor do ciclo limiar, que corresponde ao número do ciclo no qual a fluorescência gerada dentro de uma reação ultrapassa o limiar de fluorescência. A média dos Cts do DNA telomérico é normalizada pela média dos Cts do gene de cópia única (*36B4*) a fim de garantir o controle endógeno das reações e resulta no comprimento relativo dos telômeros. Além disso, para os casos, avaliamos manifestações clínicas e tratamentos anteriores e atuais, atividade da doença (SLEDAI-2K), dano (SLICC/ACR-DI), cognição (mini-exame do estado mental, teste de fluência, teste do relógio Schulman, lista de palavras do CERAD, fadiga (FACIT-Fadiga), depressão, ansiedade e estresse (DASS21) e atividade física (IPAQ-SF). As comparações das variáveis foram realizadas por meio do teste t de Student ou do teste de Mann-Whitney. As correlações foram avaliadas com o coeficiente de correlação de Spearman. As características com valor-p inferior a 0,25 na análise univariada foram inseridas no processo de ajuste do modelo multivariado inicial. Foram realizados cinco modelos de análise multivariada. Quando presente mais de uma característica cognitiva, foram incluídas no modelo separadamente mantendo no modelo inicial aquela com menor valor-p. Em seguida, foram acrescentadas todas as outras, aplicado o método *stepwise backward* e foram sendo retiradas uma a uma até que restaram no modelo final apenas aquelas com significância estatística (valor-p $\leq 0,05$). Por fim, objetivando

encontrar modelos alternativos, foi testada a troca da característica de cognição que permaneceu no modelo pelas demais que saíram na etapa I; foi testada também a inclusão uma a uma de todas as outras variáveis com valor-p inferior a 0,25 na univariada. As análises foram realizadas pelos programas R versão 3.6.3 e MINITAB. Foi considerado nível de significância de 5%. **Resultados:** Sessenta pacientes com LES e cinquenta e cinco controles foram incluídos. Entre os pacientes, 75% foram diagnosticados com LES na idade adulta, 25% diagnosticados na infância; 86,7% eram do sexo feminino (média de idade de 37 anos); 15% tinham síndrome antifosfolípida (SAF), 51,7% tinham história prévia de nefrite e 23,3% tinham envolvimento neuropsiquiátrico. Entre os controles, 87,3% eram do sexo feminino (média de idade de 38 anos). Não houve diferença entre os grupos quanto ao sexo ($p=0,924$) e idade ($p=0,737$). Pacientes com LES tiveram CT significativamente menor que os controles, com mediana de CT de 0,80 e 1,07, respectivamente ($p=0,005$). No modelo de regressão múltipla ($R^2=18,4\%$), os pacientes com SAF apresentaram telômeros mais longos quando comparados aos pacientes sem SAF ($p=0,007$). Em contrapartida, os pacientes com sintomas de ansiedade em grau moderado apresentaram CT menor ($p=0,015$) quando comparados aos pacientes sem sintomas de ansiedade ou com sintomas leves. Não houve associação com atividade de doença ou dano. **Conclusões:** este estudo mostrou que pacientes com LES possuem comprimento relativo de telômeros menores que os controles, como evidenciado em estudos prévios, assim como pacientes com LES e sintomas moderados de ansiedade, associação já descrita em outras populações. Não há dados na literatura que corroborem com o achado de telômeros mais longos em pacientes com LES e SAF, o que demanda estudos futuros para elucidar esta associação. Estudos longitudinais são essenciais para avaliar as implicações clínicas relacionadas ao CT.

Palavras-chave: lúpus eritematoso sistêmico; telômero; senescência; envelhecimento.

ABSTRACT

Introduction: telomeres are protein complexes located at the top of each arm of chromosomes, essential for maintaining the stability of the genome. Telomere shortening is found in physiological aging and senescence related to systemic lupus erythematosus (SLE). **Objective:** to compare the relative telomere length (TL) in SLE patients and controls; to correlate TL of SLE patients with clinical outcomes, comorbidities, and treatments. **Methods:** cross-sectional study comparing patients with SLE and controls, aged 18 to 60 years, matched by sex and age. Clinical and demographic data were sex, age, education level, ethnic-race classification, comorbidities, anthropometric measures and relative TL, assessed by the real-time polymerase chain reaction (qPCR). This technique is based on determining the average cycle thresholds (Cts), which corresponds to the cycle number in which the fluorescence generated within a reaction exceeds the fluorescence threshold. The average Cts of telomeric DNA is normalized by the average Cts of the single-copy gene (36B4) in order to guarantee endogenous control of reactions. Additionally, for cases, we evaluated previous and current clinical manifestations and treatments, disease activity (SLEDAI-2K), damage (SLICC/ACR-DI), cognitive assessment (mini-mental state examination, fluency test, Schulman clock test, word list), fatigue (FACIT-Fatigue), depression, anxiety and stress (DASS21), and physical activity (IPAQ-SF). Comparisons of variables were performed using Student's t-test or Mann-Whitney test. Correlations were evaluated with Spearman's correlation coefficient. Characteristics with a p-value lower than 0.25 in the univariate analysis were included in the adjustment process of the initial multivariate model. Five multivariate models were performed. When more than one cognitive characteristic was present, they were included in the model separately, keeping the one with the lowest p-value in the initial model. Then, all the others were added, the stepwise backward method was applied and they were removed one by one until only those with statistical significance ($p\text{-value} \leq 0.05$) remained in the final model. Finally, aiming to find alternative models, the exchange of the cognition characteristic that remained in the model for the others that left in stage I was tested; the inclusion one by one of all other variables with a p-value less than 0.25 in the univariate was also tested. The analyzes were made in the R version 3.6.3 and MINITAB programs.

A significance level of 5% was considered. **Results:** Sixty SLE patients and fifty-five controls were included. Among patients, 75% were diagnosed with SLE in adulthood, 25% diagnosed in childhood; 86.7% were female (average age 37 years); 15% had antiphospholipid syndrome (APS), 51.7% had a previous history of nephritis and 23.3% had neuropsychiatric involvement. Among controls, 87.3% were female (mean age 38 years). There was no difference between the groups regarding gender ($p=0.924$) and age ($p=0.737$). Patients with SLE had significantly lower TL than controls, with a median TL of 0.80 and 1.07, respectively ($p=0.005$). By the multiple regression model ($R^2=18.4\%$), patients with APS had longer telomeres when compared to patients without APS ($p=0.007$). On the other hand, patients with moderate anxiety symptoms had lower TL ($p=0.015$) when compared to patients without or with mild anxiety symptoms. There was no association with disease activity or damage. **Conclusions:** this study showed that patients with SLE have shorter telomeres than controls, as evidenced in previous studies, as well as patients with SLE and moderate symptoms of anxiety, an association already described in other populations. There are no data in the literature that corroborate the finding of longer telomeres in patients with SLE and APS, which requires future studies to elucidate this association. Longitudinal studies are essential to evaluate the clinical implications related to TL.

Keywords: systemic lupus erythematosus; telomere; senescence; aging.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama simplificado que descreve a estrutura do telômero e sua localização no cromossomo e na célula	27
Figura 2. Esquema simplificado representando o complexo shelterina	27
Figura 3. Ilustração da amplificação da reação pela PCR em tempo real	46
Figura 4. Box-plot representando a distribuição do comprimento relativo do telômero de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico em comparação com controles	60
Figura 5. Gráfico dos resíduos do modelo completo (n = 59)	63
Figura 6. Gráfico dos resíduos do primeiro modelo ajustado (n = 59)	66
Figura 7. Gráfico dos resíduos do segundo modelo ajustado (n = 59)	68
Figura 8. Gráfico dos resíduos do quarto modelo ajustado (n = 59)	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Mecanismos da inflamação e efeitos fisiopatológicos em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico	25
Tabela 2. Classificação da Gravidade dos Sintomas de Depressão, Ansiedade e Estresse de acordo com o Depression, Anxiety and Stress Score	41
Tabela 3. Classificação da prática de atividade física de acordo com International Physical Activity Questionnaire	42
Tabela 4. Iniciadores teloméricos específicos utilizados na reação de qPCR	45
Tabela 5. Características demográficas e clínicas de 60 pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e 55 controles	49
Tabela 6. Características clínicas dos 60 pacientes com lúpus eritematoso sistêmico	52
Tabela 7. Avaliação cognitiva, fadiga, depressão, ansiedade e estresse dos 60 pacientes com lúpus eritematoso sistêmico	57
Tabela 8. Classificação dos 60 pacientes com lúpus eritematoso sistêmico em relação à atividade física	59
Tabela 9. Comparações do comprimento relativo do telômero entre os pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e o grupo controle	59
Tabela 10. Análise univariada para o comprimento relativo do telômero (n=59) .	61
Tabela 11. Etapas para o ajuste do modelo multivariado de regressão linear (n=59, primeiro modelo)	65
Tabela 12. Etapas para o ajuste do modelo multivariado de regressão linear (n=59, segundo modelo)	67
Tabela 13. Etapas para o ajuste do modelo multivariado de regressão linear (n=59, terceiro modelo)	69

Tabela 14. Etapas para o ajuste do modelo multivariado de regressão linear (n=59, quarto modelo)	71
Tabela 15. Etapas para o ajuste do modelo multivariado de regressão linear (n=59, quinto modelo)	73
Tabela 16. Compilado de modelos multivariados de regressão linear iniciais e finais (n = 59)	74

LISTA DE SIGLAS

ACR: *American college of rheumatology*

AL: anticoagulante lúpico

aCL: anticorpo anticardiolipina

AR: artrite reumatoide

BAI: *Beck anxiety inventory*

BDI: *Beck depression inventory*

CAAE: certificado de apresentação de apreciação ética

CD: *cluster of differentiation*

CD: comprometimento cognitivo

CDC: *Center for Disease Control and Prevention*

CDs: células dendríticas

CERAD: *Consortium to establish a registry for Alzheimer's disease*

CT: comprimento do telômero

Cts: *cycle thresholds*

DA: doença de Alzheimer

DASS: *depression anxiety stress scale*

DI: *damage index*

dl: decilitros

DM: diabetes mellitus

DNA: *deoxyribonucleic acid* (ácido deoxirribonucleico)

DORIS: *Definitions of Remission in SLE*

DP: desvio-padrão

DPOC: doença pulmonar obstrutiva crônica

DRC: doença renal crônica

EDTA: *ethylenediaminetetraacetic acid*

EULAR: *European League Against Rheumatism*

FACIT: *functional assessment chronic illness therapy*

FISH: *fluorescence in situ hybridization* (fluorescência de hibridização *in situ*)

GPL ou MPL: unidades fosfolipídicas G ou M

HAS: hipertensão arterial sistêmica
HCl: ácido clorídrico
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC: intervalo de confiança
IgG: imunoglobulina G
IgM: imunoglobulina M
IL: interleucina
IMC: índice de massa corporal
IO: infecção oportunista
IPAQ: *international physical activity questionnaire*
ISSL: *inventory of stress symptoms of Lipp*
Kb: quilobases
Kg: quilogramas
LES: lúpus eritematoso sistêmico
LENP: lúpus eritematoso neuropsiquiátrico
M: molar
m²: metro ao quadrado
MA: Massachusetts
MEEM: mini-exame do estado mental
mg: miligramas
min: minutos
ml: mililitros
μl: microlitros
ng: nanogramas
nM: nanomolar
OMS: organização mundial da saúde
OR: *odds ratio*
PCR: reação em cadeia polimerase
PhGA: *physician global assessment*
REDCap: *Research Electronic Data Capture*
RPM: rotações por minuto

SAF: síndrome antifosfolípide
SASP: *senescence-associated secretory phenotype*
SB: *southern blotting*
SE: *standard error*
SF: *short form*
SLE: *systemic lupus erythematosus*
SLEDAI: *systemic lupus erythematosus disease activity index*
SLICC: *Systemic Lupus International Collaborating Clinics*
SNC: sistema nervoso central
STELA: *single telomere length analysis*
TCLE: termo de consentimento livre e esclarecido
TCR: *T cell receptor*
TEP: tromboembolismo pulmonar
TERC: *telomerase RNA componente*
TERT: *telomerase reverse transcriptase*
TKM: tris cloreto de potássio e de magnésio
TRF: *terminal restriction fragmentation*
Tregs: T regulatórias
TVP: trombose venosa profunda
TERT: *telomerase reverse transcriptase*
TGF- β : *transforming growth factor beta*
Th: *T helper*
TNF- α : fator de necrose tumoral alfa
UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais
USA: *United States of America*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
1.1 Lúpus Eritematoso Sistêmico	22
1.2 Senescência Celular e Imunossenescência	22
1.3 LES e Senescência Celular	24
1.4 Telômeros	26
1.4.1 Encurtamento dos telômeros e condições associadas	29
1.4.2 Técnicas para aferição do comprimento dos telômeros	30
1.5 Antecedentes Científicos	30
1.5.1 LES e Telômeros	30
1.5.2 LES, Imunossenescência e Cognição	31
1.6 Justificativa	32
2. OBJETIVOS	32
2.1 Objetivo Primário	32
2.2 Objetivos Secundários	33
3. MÉTODOS	33
3.1 Desenho do Estudo	33
3.2 Amostra (n)	35
3.3 Avaliação de Atividade de Doença	35
3.4 Avaliação de Dano	35
3.5 Diagnóstico de Nefrite Lúpica e LENP	36
3.6 Presença de SAF	36
3.7 Avaliação de Infecções Graves	37
3.8 Número de Internações Hospitalares por Infecção	38
3.9 Presença de Comorbidades	38
3.10 Presença de Neoplasias	38
3.11 Avaliação Cognitiva	38
3.12 Avaliação de Sintomas de Depressão, Ansiedade e Estresse	40
3.13 Avaliação de Fadiga	41
3.14 Avaliação de Atividade Física	41

3.15 Avaliação Laboratorial	42
3.15.1 Extração do DNA genômico	42
3.15.2 Quantificação das Amostras de DNA	44
3.15.3 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR)	44
3.16 Análise Estatística	46
4. RESULTADOS	47
4.1 Características da Amostra	48
4.2 Comprimento Relativo do Telômero	59
4.3 Análise Univariada e Multivariada	60
5. DISCUSSÃO	77
6. ARTIGO	82
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	108
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109
9. APÊNDICES	117
I. Critérios Classificatórios Systemic Lupus International Collaborating Clinics (SLICC) 2012	117
II. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	119
III. Ficha Clínica	123
IV. SLEDAI-2K	127
V. SLICC-DI	129
VI. Mini Exame do Estado Mental	132
VII. Teste do Relógio de Schulman	133
VIII. Lista de Palavras do CERAD	134
IX. Depression, Anxiety, Stress Scale	135
X. Functional Assessment Chronic Illness Therapy – Fatigue Scale	136
XI. Questionário Internacional de Atividade Física – IPAQ Versão Curta	137
10. ANEXOS	139
I. Folha de Aprovação no Comitê de Ética e Pesquisa	139
II. Critérios Classificatórios EULAR / ACR de 2019	140
III. Functional Assessment of Chronic Illness Therapy (FACIT) Licensing.....	141

1. INTRODUÇÃO

1.1 Lúpus Eritematoso Sistêmico

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença inflamatória autoimune crônica, com fenótipo clínico muito variado. Caracteriza-se pela hiperativação de células B, deposição de imunocomplexos, elevada produção de autoanticorpos e dano multi-orgânico¹. Sua etiopatogênese envolve múltiplos fatores entre eles a predisposição genética, a regulação epigenética pós-transcricional, o desbalanço hormonal, os estímulos ambientais como infecções e agentes físicos, e o estresse psíquico. Nos Estados Unidos, segundo dados publicados no ano de 2016, a prevalência da doença era, aproximadamente, 241 pessoas por 100.000 habitantes^{2; 3}. Ao redor do mundo, as maiores incidências estimadas estão na América do Norte (23,2/100.000 pessoas/ano) e as menores na África (0,3/100.000 pessoas/ano)^{3; 4}. No Brasil, a prevalência estimada é de 150.000 a 300.000 adultos com LES, com incidência aproximada de 98/100.000 pessoas/ano^{4; 5}. Afeta mais mulheres que homens (6:1), mais pretos que brancos, com maior incidência entre a terceira e a sétima décadas de vida em mulheres, e entre a quinta e sétima décadas em homens, predominando em adultos jovens⁴. A doença que se inicia antes dos 18 anos é chamada de lúpus juvenil ou pediátrico e representa 10-20% dos casos de LES nos Estados Unidos. O lúpus eritematoso sistêmico juvenil é mais grave, com mais altos índices de atividade de doença, mais reativações, maior dano e maiores taxas de hospitalização, quando comparado com o lúpus de início na idade adulta^{2; 6}.

1.2 Senescência Celular e Imunossenescência

Envelhecimento ou *aging* é definido como o processo de degeneração progressiva e declínio funcional de órgãos e tecidos. Marcos do envelhecimento sabidamente conhecidos são a erosão do telômero, a instabilidade do genoma, desregulação gênica por alterações epigenéticas (como acetilação de histonas, metilação do DNA e remodelamento de cromatina), a perda da proteostase, a exaustão de células-tronco, a

disfunção mitocondrial, a senescência celular e o *inflammaging*⁷. As alterações da função imunológica relacionadas ao envelhecimento, chamada imunossenescência, se caracterizam pela habilidade reduzida em reconhecer novos antígenos e em manter a auto tolerância, e cursa com alterações estruturais do sistema imune, como a involução do timo, e disfunção das respostas imunes tanto inata quanto adaptativa^{7; 8; 9}. Mudanças na imunidade inata envolvem a redução no número de monócitos e células dendríticas (CDs) circulantes, declínio da atividade fagocítica dos macrófagos e neutrófilos, redução da expressão de receptores semelhantes a Toll, afetando vias de sinalização intracelular, e comprometimento na capacidade de apresentar antígenos pelas CDs¹⁰. Embora o envelhecimento afete globalmente as células do sistema imunológico, as células T parecem ser as mais afetadas. Uma característica marcante do envelhecimento é a perda progressiva da expressão da molécula coestimuladora CD28, importante para ativação e proliferação de linfócitos T⁷. Ocorrem ainda mudanças nos receptores de células T (TCR), além do acúmulo de células T senescentes e alterações no repertório de subpopulações de linfócitos. Nota-se redução de células T *naïves*, aumento de células T regulatórias – Tregs CD4⁺FoxP3⁺ – e expansão oligo clonal, com fenótipo efetor de memória pró-inflamatório, com baixa diversidade de receptores de membrana^{8; 10; 11; 12}.

Entre as funções tímicas estão a seleção negativa de células T auto reativas via apoptose e a produção de Tregs, diretamente relacionadas à supressão da auto reatividade para corrigir eventuais falhas na seleção negativa⁸. A perda destes mecanismos regulatórios e o conseqüente escape de células T auto reativas para a periferia, em associação ao acúmulo de células somáticas senescentes resultantes do processo de envelhecimento fisiológico, levam a um estado pró-inflamatório de baixo grau, mas acima do normal, condição chamada de fenótipo secretório associado à senescência (do inglês *SASP* – *senescence-associated secretory phenotype*), também denominada *inflammaging*⁹. Este ambiente inflamatório e o acúmulo de células somáticas senescentes (funcionalmente inertes, mas secretórias) predispõem a condições degenerativas, como o diabetes mellitus (DM) tipo II, a doença de Alzheimer (DA) e a aterosclerose^{8; 9}. Além disso, as células CD4⁺CD28⁻ estão aumentadas em condições inflamatórias crônicas como a artrite

reumatoide (AR), as doenças cardiovasculares, a doença renal crônica (DRC) e as infecções crônicas como a infecção pelo citomegalovírus¹².

Alguns outros mecanismos de senescência celular são sugeridos como o estresse oxidativo e as infecções crônicas, especialmente as virais. Ativação persistente do sistema imune por infecções virais crônicas, sejam ativas ou latentes, leva a um estado pró-inflamatório de baixo grau que causa exaustão funcional de linfócitos T, telomerase mal funcionante e consequente encurtamento do telômero^{8; 10; 13; 14}. O resultado mais deletério deste encurtamento precoce é a indução de células T senescentes, com incapacidade replicativa e resistentes à apoptose¹⁴. O estresse oxidativo prolongado e as espécies reativas de oxigênio estão relacionados ao encurtamento do telômero, possivelmente pela redução da atividade da telomerase, e fazem parte do mecanismo patogênico de diversas doenças, como aterosclerose, infarto do miocárdio e doenças imunomediadas, como a artrite reumatoide, a artrite idiopática juvenil e o LES, entre outras^{9; 15; 16}.

Como consequência, há pior resposta imune a novos antígenos, resposta prejudicada às vacinas, maior susceptibilidade a infecções e neoplasias, além de menor habilidade para distinguir antígenos próprios de antígenos não-próprios, levando à quebra da autotolerância^{8; 9; 11; 13; 15}.

1.3 LES e senescência celular

Muitas semelhanças são encontradas entre o processo fisiológico de envelhecimento e a senescência relacionada ao LES. Ocorrem mudanças no repertório de células imunes com diminuição de células T *naïve*, expansão oligoclonal de células T de memória e ativação de linfócitos B, levando à hipergamaglobulinemia e à produção de autoanticorpos^{8; 9; 13; 17}. Análise de biomarcadores de senescência em pacientes com LES demonstram aumento da subpopulação de linfócitos T senescentes (CD4⁺CD28⁻), além de aumento da razão IL-6/TGF- β que acarreta a produção de IL-22, polarizando a resposta celular T para o eixo Th17, perpetuando a inflamação (Tabela 1)⁹. Comparativamente, em idosos, a expressão de CD28 cai em 85-90% das células T CD4⁺

e em 40-50% das células T CD8⁺ ¹⁸. Ugarte e colegas avaliaram, em uma coorte de pacientes com LES, a associação entre células CD4⁺CD28⁻ e dano e encontraram uma associação estatisticamente significativa com dano ocular [1,051 (IC_{95%} 1,008–1,095; p=0,018)], dano renal [1,025 (IC_{95%} 1,006–1,044; p=0,009)], dano vascular periférico [1,056 (IC_{95%} 1,008–1,107; p=0,022)], dano cardiovascular [1,057 (IC_{95%} 1,019–1,096; p=0,003)] e falência gonadal precoce [1,026 (IC_{95%} 1,003–1,049; p=0,025)]¹².

Tabela 1. Mecanismos da inflamação e efeitos fisiopatológicos em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico

Bases moleculares da inflamação	Efeitos
Redução da expressão de receptores de membrana de células T	Aumento na susceptibilidade a infecções
Redução da relação células <i>naïve</i> /células de memória	Redução no reconhecimento de novos antígenos e aumento de anticorpos específicos
Redução de células angiogênicas CD4 ⁺ /CD28 ⁺ e aumento de células angiogênicas CD4 ⁺ /CD28 ⁻	Aumento do dano endotelial e morbidade cardiovascular
Desbalanço IL-6/TGF- β	Aumento de IL-22, autoimunidade
Aumento Th17	Aumento da inflamação

Adaptado: Tsai, C. Y. et al, 2019.

Além disso, estão presentes no LES outros marcadores de senescência celular como aumento de dano e reparo do DNA, aumento da produção de espécies reativas de oxigênio mediada pela disfunção mitocondrial e produção de citocinas pró-inflamatórias¹⁹. Os distúrbios funcionais das células imunes também podem potencializar o estresse oxidativo, assim como as disfunções mitocondriais, contribuindo para a capacidade reduzida de clarear as espécies reativas de oxigênio, aumentando o dano ao DNA e a autofagia, e, conseqüentemente, potencializando a senescência^{9; 19}. O dano endotelial, a aterosclerose acelerada e o risco cardiovascular aumentado são condições relacionadas ao LES e não explicadas somente por fatores de risco tradicionais. A inflamação crônica, a desregulação de citocinas e o perfil de subpopulações de células T alterado têm sido propostos como gatilhos para este desequilíbrio entre dano e reparo

endotelial²⁰. Além disso, a inflamação contribui também para a erosão do telômero, tanto pelo aumento do turnover celular, quanto pela interferência na ação da telomerase¹⁶.

A queda na timopoiese e as conseqüentes alterações funcionais do sistema imune, as alterações epigenéticas, a disfunção mitocondrial, a comunicação intracelular alterada e a instabilidade genômica secundária à erosão do telômero são condições presentes nos pacientes com LES e biomarcadores do processo de envelhecimento^{8; 11; 15}.

1.4 Telômeros

Telômeros são complexos proteicos, essenciais para manter a estabilidade do genoma. Localizam-se no topo de cada braço dos cromossomos e, em mamíferos, são compostos por sequências altamente conservadas de DNA (TTAGGG)_n, que variam desde 0,5 quilobases (kb) a mais de 20kb²¹, organizados em uma estrutura em forma de alça, chamada *T-loop* (Figura 1)¹⁶. Esta estrutura se liga a proteínas específicas, formando o complexo shelterina (Figura 2)¹⁶. Interações entre estas proteínas e o telômero permitem que as extremidades dos cromossomos sejam distinguidas de quebras de DNA¹⁸.

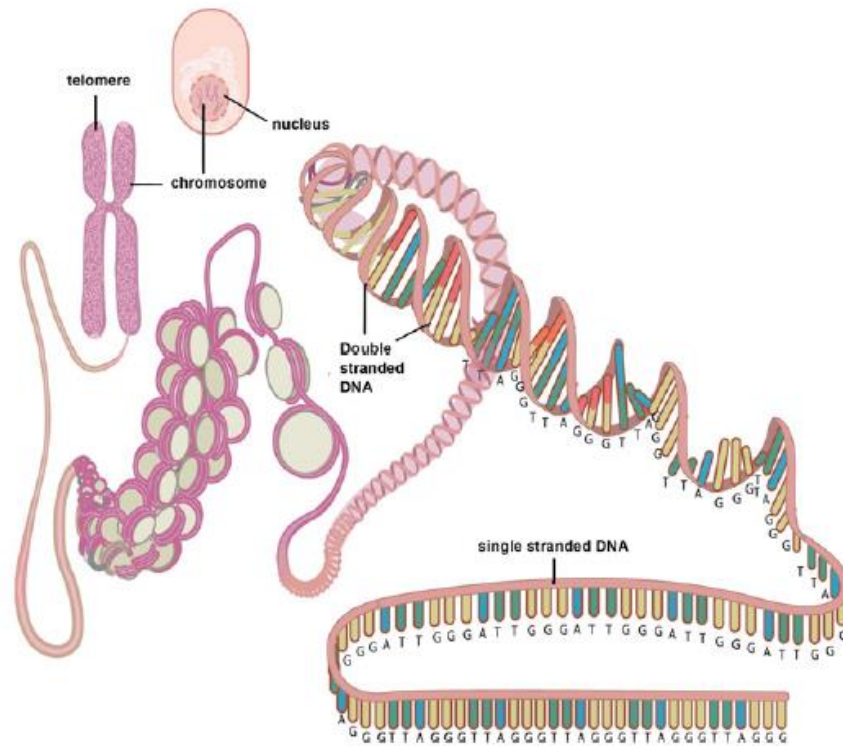


Figura 1. Diagrama simplificado que descreve a estrutura do telômero e sua localização no cromossomo e na célula. Fonte: Zhu H et al, 2011

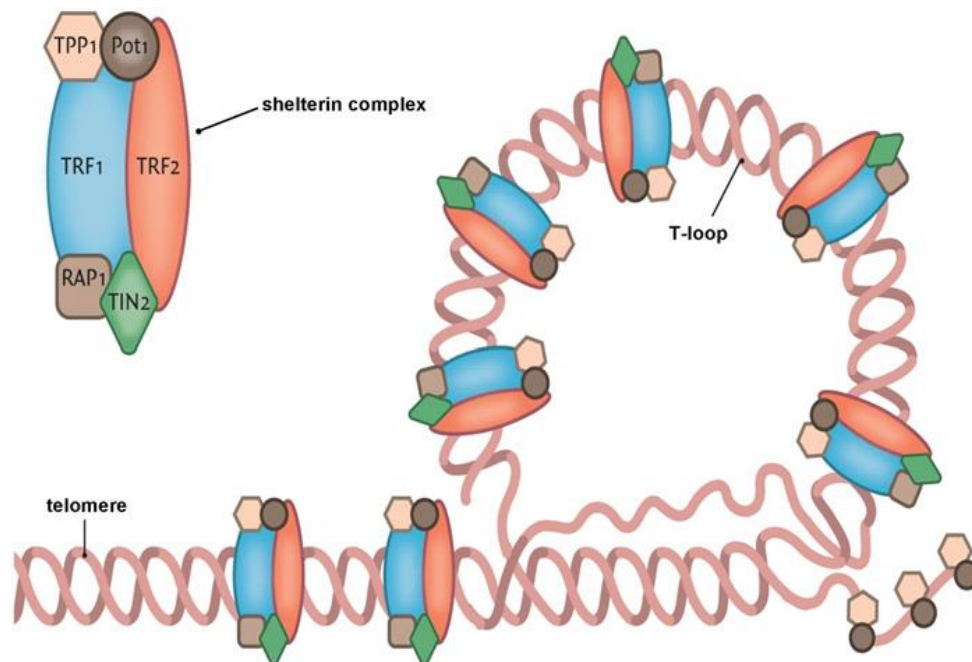


Figura 2. Esquema simplificado representando o complexo shelterina. Fonte: Zhu H et al, 2011

A estrutura do telômero foi inicialmente descrita por Hermann Muller, em 1938, seguido de Barbara McClintock, em 1941, através de seus estudos em *Drosophila* e milho, respectivamente²². O comprimento dos telômeros não é só geneticamente determinado, mas fatores externos como idade, estresse oxidativo, inflamação e resposta imunológica, tabagismo, etilismo, obesidade e alta replicação celular interferem na erosão telomérica^{15; 22; 23; 24; 25}. O comprimento do telômero é muito variável entre indivíduos de mesma idade e a depender do tecido humano avaliado, sendo o telômero mais longo na pele, no intestino, no cérebro entre outros.

Além disso, parece ser maior em afro-americanos que caucasianos, maior em mulheres que em homens¹⁶. Devido à incapacidade da DNA polimerase em replicar o fim da extremidade 3' da fita complementar de DNA, os telômeros encurtam naturalmente a cada ciclo celular, perdendo progressivamente 30-150 pares de bases a cada ciclo e, conseqüentemente, com o avançar da idade^{9; 15; 16; 26}.

Nas células com alta atividade mitótica, como as células-tronco, é importante que haja manutenção do tamanho do telômero e isto é possível através da ação da telomerase²⁶. A telomerase é um complexo ribonucleoproteico composto de uma subunidade catalítica transcriptase reversa (*TERT – telomerase reverse transcriptase*) que sintetiza novas repetições teloméricas a partir de uma fita molde do componente de RNA intrínseco (*TERC – telomerase RNA component*)^{16; 25}. Broer et al. descrevem que polimorfismos gênicos em *TERT* e *TERC* estão associados ao comprimento do telômero e à longevidade²⁵. A telomerase não está ativa na maior parte das células somáticas e, nestas células, o encurtamento ou a perda do telômero é um processo inexorável^{1; 26}.

A finitude da capacidade replicativa das células somáticas foi primeiramente reconhecida por Leonard Hayflick, nos anos 60 (limite de Hayflick)¹⁹, e atualmente é bem conhecido o papel da erosão do telômero no processo de envelhecimento. Quando o telômero se torna criticamente curto (≤ 5 quilobases em células de mamíferos²⁷), perde a capacidade de sustentar as proteínas especializadas do complexo shelterina, implicando instabilidade genômica e dano ao DNA, sinalizando a saída do ciclo mitótico e a entrada na

senescência (células inertes) ou na apoptose^{1; 26; 27}. O acúmulo de células senescentes acarreta a perda da capacidade de crescimento e reparo dos tecidos, assim como a liberação de proteases, fatores de crescimento e citocinas. À medida que o sistema imune envelhece pelos mecanismos descritos anteriormente, sua capacidade de “limpeza” das células senescentes também fica prejudicada²⁶. O encurtamento do telômero é considerado um biomarcador da senescência celular^{9; 22; 24; 28; 29}.

Diversos outros fatores podem impactar o comprimento dos telômeros. Hábitos de vida como tabagismo, inatividade física e a obesidade podem interferir em seu tamanho¹⁶. Em contrapartida, hábitos de vida saudáveis impactam positivamente no encurtamento do telômero e interferem na diminuição da incidência de doenças degenerativas, como o DM, a hipertensão arterial sistêmica (HAS) e as doenças cardiovasculares^{15; 16; 30}. Sabe-se também que o estresse físico e psíquico se relacionam diretamente com o estresse oxidativo e consequente redução da ação da telomerase e encurtamento acelerado do telômero¹⁶.

1.4.1 Encurtamento dos telômeros e outras condições relacionadas

Os distúrbios da biologia dos telômeros, também chamados de síndrome do telômero curto ou telomeropatias, são um grupo heterogêneo de doenças decorrentes de mutações que afetam os genes envolvidos na homeostase dos telômeros, implicando envelhecimento precoce, com várias manifestações como a anemia aplásica, a fibrose pulmonar, a cirrose hepática criptogênica e o aumento do risco de neoplasias³¹.

A disceratose congênita é uma herança recessiva ligada ao X, protótipo entre os distúrbios da biologia dos telômeros, primeiramente descrita por Ferdinand Zinsser, no início do século XX, e se manifesta com a tríade de pigmentação cutânea, distrofia ungueal e leucoplasia oral^{31; 32}. A fibrose pulmonar é a manifestação clínica mais comum entre estes distúrbios, com padrão de pneumonia intersticial usual³².

As características clínicas aparecem frequentemente na infância. Anormalidades na pigmentação da pele e a distrofia ungueal são as primeiras manifestações, geralmente em idade menor que 10 anos. Grande parte dos pacientes evolui com insuficiência medular até os 30 anos de idade. A expressão fenotípica é muito variável entre os pacientes, o que causa atraso diagnóstico³².

1.4.2 Técnicas para aferição do comprimento dos telômeros

Existem diversas técnicas para aferição do comprimento do telômero, incluindo *terminal restriction fragmentation (TRF)* – considerado padrão-ouro²¹ - medido por *Southern blotting (SB)*, reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), *single telomere length analysis (STELA)*, fluorescência quantitativa de hibridização *in situ (Q-FISH)* e *flow-FISH*, entre outras. A qPCR é uma das técnicas mais comumente empregadas por ser de fácil execução e por necessitar de pequena quantidade de DNA genômico, quando comparada a outras técnicas^{1; 22; 28}. Baseia-se na determinação da média dos *cycle thresholds (Cts)*, ou valor do ciclo limiar, que corresponde ao número do ciclo no qual a fluorescência gerada dentro de uma reação ultrapassa o limiar de fluorescência. A reação consiste em três etapas: desnaturação do DNA, anelamento das sequências iniciadores à sequência alvo a ser amplificada, e extensão pela enzima Taq DNA polimerase. A média dos Cts do DNA telomérico (T) é normalizada pela média dos Cts do gene de cópia única (S). Esse comprimento é mensurado a partir de duas reações de qPCR para cada amostra, com amplificação para a sequência telomérica e do gene *36B4*. O valor obtido através da razão entre as duas reações (razão T/S) se associa ao comprimento relativo médio dos telômeros da amostra com relação a uma população estudada^{21; 22; 33}.

1.5 Antecedentes científicos

1.5.1 LES e telômeros

O encurtamento dos telômeros em pacientes com LES já foi descrito. Lee e colaboradores, em meta-análise, mostrou a diferença entre o comprimento dos telômeros

de pacientes com LES quando comparados a controles (DP médio -0,835 IC95% -1,291 a -0,380, $p=0,0033$), a despeito de etnia, tamanho amostral e técnica utilizada na avaliação do comprimento do telômero¹. Bridges e colaboradores compararam o comprimento do telômero de pacientes com LES diagnosticado na idade adulta versus na faixa etária pediátrica e demonstrou que havia encurtamento mais pronunciado em pacientes com LES pediátrico e isto estava relacionado ao tempo de doença ($b = -0.008$; IC95%: -0.016 a -0.001 ; $p<0,001$)². Haque e colaboradores descreveram que pacientes com LES ($n=63$) apresentaram telômero menor quando comparados com indivíduos saudáveis ($n=63$) (mediana 0,97 - intervalo interquartil 0,47–1,57 versus mediana 1,53 - intervalo interquartil 0,82–2,29; $p=0.0008$, respectivamente), medidos através da técnica de qPCR²⁸. Fatores relacionados ao menor comprimento do telômero foram presença de anti-Ro ($\beta \pm SE -0,36 \pm 0,16$; $p=0,023$) e uso atual de corticoide ($\beta \pm SE 0,29 \pm 0,14$; $p=0,046$), e aumento do índice de massa corporal ($\beta \pm SE 0,07 \pm 0,01$; $P < 0.0001$), tabagismo ($\beta \pm SE 0,64 \pm 0,26$; $p=0,016$), e a presença de placas ateroscleróticas em carótidas ($\beta \pm SE 0,203 \pm 0,177$; $p=0,032$) foram associados ao maior comprimento do telômero. Não houve correlação com atividade de doença e dano²⁸.

Os telômeros são considerados marcadores de senescência celular, mas a definição do seu comprimento como biomarcador de mortalidade ou dano no LES requer avaliação longitudinal.

1.5.2 LES, imunossenescência e cognição

Estudos sobre a prevalência de comprometimento cognitivo no LES têm evoluído substancialmente, com prevalência relatada variando entre 14% e 75%³⁴. Déficits em atenção complexa, bem como déficits na aprendizagem e evocação verbal e não verbal, fluência verbal e não verbal, funções psicomotoras complexas, habilidades visuoespaciais e psicomotricidade são funções comprometidas no LES e frequentemente reportadas^{34; 35}. Maciel e colegas relatam frequência de 72,2% de disfunção cognitiva em 54 pacientes com LES, sendo a disfunção executiva a alteração mais proeminente nesta amostra³⁶. Santos e colegas encontraram comprometimento em pelo menos um domínio da cognição em 87,2% dos pacientes com LES juvenil, sendo a atenção (64,1%), a

memória (46,2%) e a função executiva (38,5%) os domínios mais afetados³⁷. Kalim e colegas evidenciaram correlação entre disfunção cognitiva, especialmente atenção e memória, e marcadores de imunossenescência em pacientes com LES. Houve uma correlação negativa entre células T de memória (CD4⁺CD45RO⁺) com memória ($r=-0,204$, $p=0,039$) e orientação visual e espacial ($r=-0,250$, $p=0,033$) no mini-exame do estado mental (MEEM). Além disso, marcadores de células T CD8⁺ senescentes (CD28⁻) tiveram uma significativa correlação negativa com atenção ($r=-0,255$, $p=0,024$) e memória ($r=-0,326$, $p=0,005$)³⁸.

1.6 Justificativa

A senescência relacionada ao LES ainda é assunto pouco discutido. Há carência de dados sobre o encurtamento dos telômeros em pacientes com LES e sua relação com desfechos clínicos. Não há dados sobre o encurtamento dos telômeros em pacientes com LES na população brasileira.

Portanto, o presente estudo foi desenvolvido para testar as seguintes hipóteses:

1. Hipótese nula: o comprimento relativo do telômero de pacientes com LES é igual ao comprimento relativo do telômero de indivíduos sem doenças inflamatórias crônicas imunomediadas;
2. Hipótese alternativa: o comprimento relativo do telômero de pacientes com LES é diferente do comprimento relativo do telômero de indivíduos sem doenças inflamatórias crônicas imunomediadas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo primário

O objetivo principal deste estudo é comparar o comprimento relativo do telômero de

pacientes com LES com um grupo controle, sem doenças inflamatórias crônicas imunomediadas.

2.2 Objetivos secundários

Caracterizar a população e correlacionar o comprimento relativo do telômero dos pacientes com LES com:

- Sexo;
- Idade;
- Diagnóstico de LES na infância versus LES na idade adulta;
- Tempo de doença, em anos, desde o diagnóstico até a data da inclusão;
- Tratamentos (anos de uso e dose acumulada de antimalárico, dose acumulada de glicocorticoide e dose acumulada de ciclofosfamida);
- Atividade da doença;
- Dano provocado pela doença;
- Diagnóstico de nefrite lúpica e lúpus neuropsiquiátrico (LENP);
- Presença de SAF;
- Número de infecções graves, desde o diagnóstico;
- Número de internações hospitalares por infecção;
- Presença de comorbidades;
- Presença de neoplasias;
- Presença de comprometimento cognitivo (CD);
- Presença de sintomas depressivos, ansiosos e estresse;
- Presença de fadiga;
- Prática de atividade física.

3. MÉTODOS

3.1 Desenho do Estudo

Trata-se de estudo transversal para o qual foram selecionados indivíduos com LES, que preencheram critérios classificatórios do *Systemic Lupus International Collaborating Clinics* (SLICC) 2012³⁹ (Apêndice I) e/ou dos *European League Against Rheumatism / American College of Rheumatology* (EULAR / ACR) de 2019⁴⁰ (Anexo II), e controles, com idade entre 18 e 60 anos, pareados por sexo e idade. Os participantes foram selecionados consecutivamente, entre fevereiro e outubro de 2022. Foram excluídos os indivíduos com infecção aguda ou crônica, gestantes e/ou lactantes, pacientes em terapia renal substitutiva, cirróticos, transplantados de medula óssea ou órgão sólido, pacientes com síndrome de sobreposição, à exceção da síndrome antifosfolípide (SAF) e síndrome de Sjögren secundária, pacientes com doenças inflamatórias crônicas imunomediadas não-reumáticas e pacientes com lesão estrutural em sistema nervoso central (SNC). Foram selecionados para o grupo controle os acompanhantes de pacientes atendidos no Hospital das Clínicas da UFMG, que não apresentavam doenças inflamatórias crônicas imunomediadas de qualquer natureza sabidamente conhecidas, além de não preencher os critérios de exclusão acima descritos.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (CAAE 50147321.9.0000.5149) (Anexo I) e todos os participantes concordaram e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Apêndice II) antes de qualquer procedimento do estudo.

Em visita única, foram coletados dados clínicos e demográficos de todos os participantes da pesquisa, mediante entrevista e revisão de prontuário (dos pacientes). Estes dados foram catalogados e armazenados no banco de dados REDCap (*Research Electronic Data Capture*, <https://project-redcap.org>). A classificação étnico-racial e os anos de escolaridade foram dados autodeclarados, conforme definição do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE)⁴¹.

Além do preenchimento da ficha clínica (Apêndice III), foi coletada amostra de sangue total de cada participante, para realização dos exames laboratoriais necessários, alvo de estudo desta pesquisa.

3.2 Amostra (n)

O cálculo amostral foi feito baseado em estudo que também avaliou o comprimento do telômero em pacientes com LES e controles saudáveis⁴². O cálculo foi realizado em calculadora *online*, disponível em: <https://clincalc.com/stats/samplesize.aspx>, avaliando dois grupos de estudo independentes, com uma variável contínua como *endpoint* primário, incluindo os parâmetros estatísticos do grupo de estudo (grupo 1) a média de comprimento do telômero de $4,38 \pm 3,58$ e da população de comparação (grupo 2) a média de 6,37, considerando $\alpha = 5\%$ e $\beta = 80\%$ (n casos = 51; n controles = 51).

3.3 Avaliação de Atividade de Doença

Atividade de doença foi avaliada através do *Systemic Lupus Disease Activity Index 2000 (SLEDAI-2K)* modificado⁴³ (Apêndice IV). Foram considerados em remissão clínica aqueles pacientes com *SLEDAI* igual a zero independente da sorologia, *Physician Global Assessment (PhGA)* < 0,5, podendo o paciente estar em uso de antimaláricos, prednisona $\leq 5\text{mg}/\text{dia}$ e/ou imunossupressores em doses estáveis incluindo imunobiológicos, conforme *Definitions of Remission in SLE (DORIS)*⁴⁴. Foram classificados como pacientes em baixa atividade de doença aqueles com *SLEDAI* ≤ 4 sem atividade renal, em SNC, cardiopulmonar e vasculite – e sem anemia hemolítica ou atividade do trato gastrointestinal e sem atividade nova desde a última avaliação e dose atual de prednisona (ou equivalente) $\leq 7,5\text{mg}$ e doses estáveis de imunossupressor, segundo critérios de baixa atividade de doença⁴⁵. Foram considerados pacientes com atividade crônica persistente aqueles ativos por mais de 6 meses e que não preencheram critérios para baixa atividade de doença. Foram considerados em exacerbação aqueles pacientes com manifestações clínicas e/ou laboratoriais novas de doença ou piora de atividade, que tenha ocorrido nos últimos 6 meses.

3.4 Avaliação de Dano

O dano provocado pela doença foi mensurado através do *Systemic Lupus International Collaborating Clinics / American College of Rheumatology Damage Index (SLICC/ACR - DI)*⁴⁶ (Apêndice V). Foi considerada ausência de dano *SLICC-DI* igual a zero e presença de dano, maior ou igual a 1.

3.5 Diagnóstico de Nefrite Lúpica e LENP

Foi considerada nefrite lúpica a presença de sedimento urinário ativo, definido por hematúria glomerular e/ou cilindros celulares, e/ou proteinúria ≥ 500 mg, medida em 24 horas, ou relação proteína/creatinina $\geq 0,5$, em amostra isolada de urina, e/ou biópsia renal compatível, conforme definição da Sociedade Brasileira de Reumatologia⁴⁷. Foram considerados com nefrite aqueles pacientes com sinais de nefrite ativa no momento da inclusão e aqueles com histórico prévio descrito no prontuário. Foi considerado lúpus neuropsiquiátrico as síndromes neurológicas do sistema nervoso central, periférico e autonômico, desde que excluídas outras causas, seguindo a definição do Colégio Americano de Reumatologia⁴⁸. Foram incluídos aqueles pacientes com histórico prévio de LENP descrito no prontuário.

3.6 Presença de SAF

Foram considerados aqueles pacientes com pelo menos um dos critérios clínicos e um dos critérios laboratoriais, como descrito por Sapporo e atualizado em Sydney⁴⁹:

1. Critérios clínicos:

1.1 Trombose vascular: um ou mais episódios clínicos de trombose arterial, venosa ou de pequenos vasos, em qualquer tecido ou órgão. A trombose deve ser confirmada por critérios validados (ou seja, resultados inequívocos de estudos de imagem ou histopatologia apropriados). Para confirmação histopatológica, a trombose deve estar presente sem evidência significativa de inflamação na parede do vaso;

1.2 Morbidade na gravidez: uma ou mais mortes inexplicáveis de um feto morfológicamente normal na ou após a 10ª semana de gestação, com morfologia fetal normal documentado por ultrassom ou por exame direto do feto, OU um ou mais nascimentos prematuros de um recém-nascido morfológicamente normal antes da 34ª semana de gestação devido à eclâmpsia ou pré-eclâmpsia grave ou insuficiência placentária OU três ou mais abortos espontâneos consecutivos e inexplicáveis antes da 10ª semana de gestação.

2. Critérios laboratoriais:

2.1 Anticoagulante lúpico (AL) presente no plasma, em duas ou mais ocasiões com pelo menos 12 semanas de intervalo;

2.2 Anticorpo anticardiolipina (aCL) do isotipo IgG e/ou IgM no soro ou plasma, presente em título médio ou alto (ou seja, >40 GPL ou MPL, ou > 99.º percentil), em duas ou mais ocasiões, com pelo menos 12 semanas de intervalo;

2.3 Anticorpo anti-b2 glicoproteína-I do isotipo IgG e/ou IgM no soro ou plasma (em título > percentil 99), presente em duas ou mais ocasiões, com pelo menos 12 semanas de intervalo, medido por um ELISA padronizado.

3.7 Avaliação de Infecções Graves e Oportunistas

Foram consideradas infecções graves aquelas que motivaram internação hospitalar, com ou sem passagem por Unidade de Terapia Intensiva, comprovadas por sumário de alta e descritas em prontuário médico, além das infecções oportunistas (IOs), presenciadas pela equipe assistente. Foram consideradas IOs aquelas que ocorrem mais gravemente e/ou mais frequentemente em indivíduos imunocomprometidos⁵⁰ e causadas por bactérias, fungos, vírus e parasitas, tais como tuberculose, sífilis, toxoplasmose, candidíase orofaríngea e esofageana, criptococose, infecção por *Pneumocystis jiroveci*, criptosporidiose, microsporidiose, aspergilose, doença invasiva por citomegalovírus,

infecções por herpes simples, infecções por vírus varicela-zóster, infecção pelo papilomavírus humano, leishmaniose e doença de Chagas, seguindo recomendações do *Center for Disease Control and Prevention (CDC)*^{51; 52}.

3.8 Número de Internações Hospitalares por Infecções

Foram consideradas as internações hospitalares comprovadas por sumário de alta ou que tenham sido presenciadas pela equipe médica assistente, desde o início do acompanhamento em nosso Serviço.

3.9 Presença de Comorbidades

Comorbidade foi definida como condição mórbida associada ao LES, com diagnóstico definitivo registrado em prontuário médico. As comorbidades avaliadas foram (1) hipertensão arterial sistêmica, (2) DM, (3) dislipidemia, (4) doença aterosclerótica (doença arterial coronariana, doença cerebrovascular e doença arterial periférica), (5) doença pulmonar crônica, (6) doença renal crônica não dialítica, (7) etilismo, (8) tabagismo, (9) insuficiência cardíaca e (10) obesidade. Doença renal crônica não dialítica foi definida como taxa de filtração glomerular $< 45\text{ml/min}/1,73\text{m}^2$ ⁵³. Etilismo foi definido como a ingestão de mais de três doses de álcool por dia ou mais de 21 doses por semana, como define a Organização Mundial de Saúde (OMS)⁵⁴. Foi considerado tabagismo qualquer carga tabágica. Foram considerados obesos aqueles indivíduos com índice de massa corpórea (IMC) maior ou igual a 30kg/m^2 , segundo a OMS.

3.10 Presença de Neoplasias

Foram consideradas as neoplasias com diagnóstico definitivo (histológico) registrado em prontuário.

3.11 Avaliação Cognitiva

Foram realizados, no momento da inclusão de cada paciente no estudo:

- MEEM: para triagem cognitiva, que avalia orientação temporal, espacial, atenção, linguagem, praxia (capacidade de executar, formular, coordenar e executar gestos), gnosia (percepção de estímulos auditivos e táteis)⁵⁵. Os pontos de corte e normalidade utilizados, corrigidos para anos de escolaridade foram: 0 a 3 anos ≥ 18 ; 4 a 7 anos ≥ 24 ; 8 anos ou mais ≥ 26 ⁵⁵ (Apêndice VI);

- Teste de fluência verbal: para avaliação da memória semântica (que se relaciona a fatos, conceitos, nomes de coisas e suas relações). Neste teste o indivíduo é solicitado a enumerar o máximo de animais e frutas que conhece e consegue lembrar, em um período de um minuto para cada uma das categorias⁵⁶. Os pontos de corte dependem da escolaridade (9 para indivíduos sem escolaridade e 13, com 8 anos ou mais de estudo);

- Teste do relógio de Schulman: para avaliação de habilidades visuais e espaciais (capacidade de realizar tarefas construtivas que envolvem coordenação entre a atividade manual e visual), praxia e funções executivas. No teste do relógio o paciente é orientado a desenhar um relógio com ponteiros e todos os números e marcar “11 horas e 10 minutos”^{57; 58}. São consideradas normais as gradações 4 ou 5 (Apêndice VII);

- Memória da lista de palavras do *Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease* (CERAD): avalia, de maneira fidedigna, o aprendizado e a memória episódica⁵⁹ (Apêndice VIII). É dividido em três etapas:

Três tentativas: avalia a curva de aprendizagem. O examinador lê em voz alta uma lista de 10 palavras a um ritmo de 2 segundos por palavra. Após a leitura é feita a evocação livre, por um período máximo de 90 segundos. O procedimento é repetido outras duas vezes. A pontuação é obtida pela soma das palavras evocadas nas três tentativas: espera-se que a soma das três tentativas seja maior ou igual a 14 palavras;

Evocação tardia da lista de palavras: avalia a capacidade de consolidação da memória de longo prazo. A evocação tardia da lista de palavras apresentada anteriormente é feita por período máximo de 90 segundos. Cada palavra lembrada corresponde a um ponto, sendo, portanto, a pontuação máxima de 10 pontos. Espera-se um escore maior ou igual a 4;

Reconhecimento da lista de palavras: após a evocação espontânea, as 10 palavras são apresentadas em meio a 10 distratores e o participante deve apontar quais são as palavras pertencentes à lista apresentada anteriormente. Cada "sim" e "não" corretos equivalem a um ponto, totalizando 20 pontos. O escore final é calculado subtraindo-se 10 do número de respostas corretas, evitando o efeito de acerto ao acaso. Portanto, o escore máximo final desse teste é 10 pontos. Espera-se um escore ≥ 8 palavras.

Foi considerada disfunção cognitiva o déficit em um ou mais dos seguintes domínios: atenção complexa, habilidades executivas (planejamento, organização e sequenciamento), memória (aprendizado e evocação), orientação visual e espacial, linguagem (fluência verbal) e psicomotricidade, conforme definição do Colégio Americano de Reumatologia^{34; 48}.

3.12 Avaliação de Sintomas de Depressão, Ansiedade e Estresse

Todos os pacientes foram avaliados quanto à presença de sintomas de depressão, ansiedade e estresse através do DASS-21. O DASS-21 é uma escala baseada em autorrelato do paciente, que contém três subescalas que são pontuadas de acordo com a escala Likert (0, 1, 2 e 3), variando de 0 ("não aconteceu comigo") a 3 ("aconteceu comigo a maior parte do tempo"). Cada subescala do DASS-21 é composta por sete ítems que avaliam cada domínio acima citado.

Sua versão original completa contém 42 perguntas (divididas em 14 perguntas para cada domínio)⁶⁰ mas sua versão curta (DASS-21) mantém boa acurácia em classificar os pacientes, sendo mais rápida de ser aplicada. Para a construção desta escala, outros

instrumentos já validados foram utilizados, como o *Beck Depression Inventory* – BDI^{61; 62} e o *Beck Anxiety Inventory* – BAI⁶³. Vignola e Tucci validaram esta escala para o português brasileiro⁶⁴.

Os pacientes são classificados quanto à presença de sintomas como normais ou graus leve, moderado, grave e muito grave (Tabela 2)⁶⁴. Na análise multivariada, os graus grave e muito grave foram analisados como um mesmo grupo, pela similaridade entre eles.

Tabela 2. Classificação da Gravidade dos Sintomas de Depressão, Ansiedade e Estresse de acordo com o *Depression, Anxiety and Stress Score*

	Z-Escore	Percentil	Depressão	Ansiedade	Estresse
Normal	<0,5	0-78	0-9	0-7	0-14
Leve	0,5-1,0	78-87	10-13	8-9	15-18
Moderado	1,0-2,0	87-95	14-20	10-14	19-25
Grave	2,0-3,0	95-98	21-27	15-19	26-33
Muito grave	>3,0	98-100	28+	20+	34+

3.13 Avaliação de Fadiga

A fadiga foi avaliada através da subescala (FACIT-Fatigue) do escore *Functional Assessment of Chronic Illness Therapy* (FACIT), validada em população de pacientes com LES⁶⁵. A pontuação total varia de 0 a 52, sendo que as pontuações mais altas denotam menos fadiga. O FACIT-Fatigue foi autorizado para utilização de sua versão em português para este estudo (<http://www.facit.org>) (Anexo III).

3.14 Avaliação de Atividade Física

Todos os pacientes responderam à versão curta do *International Physical Activity Questionnaire* (IPAQ), elaborado para ser aplicado em adultos entre 18 e 65 anos, baseado no auto-relato da atividade física nos últimos sete dias. A versão curta, composta

por nove itens, questiona sobre caminhada, atividades de intensidade moderada e vigorosa e tempo sentado, relativos aos últimos sete dias^{66; 67}. Os pacientes são classificados como representados na Tabela 3. Na análise multivariada, foram agrupadas as categorias sedentário / irregularmente ativos e ativos / muito ativos, pela similaridade entre as categorias.

Tabela 3. Classificação da prática de atividade física de acordo com *International Physical Activity Questionnaire*

Caminhada		Moderada		Vigorosa		Classificação
F	D	F	D	F	D	
-	-	-	-	-	-	Sedentário
4	20	1	30	-	-	Irregularmente ativo A
3	30	-	-	-	-	Irregularmente ativo B
3	20	3	20	1	30	Ativo
5	45	-	-	-	-	Ativo
3	30	3	30	3	20	Muito ativo
-	-	-	-	5	30	Muito ativo

F = frequência (dias); D = duração (minutos)

Fonte: IPAQ Brasil (www.celafiscs.com.br)

3.15 Avaliação Laboratorial

Foram coletados 5 ml de sangue total dos pacientes, em tubo gel. Após centrifugação a 4°C a 3.000 rpm por 15 minutos e posterior refrigeração entre 2°C e 8°C, foram realizados:

- Pesquisa do anticorpo anti-DNA dupla hélice, através de imunofluorescência indireta utilizando o antígeno de *Crithidia luciliae*;
- Dosagem das frações de complemento C3 e C4, através do método de turbidimetria.

Foram coletados 4 ml de sangue periférico em tubo contendo o anticoagulante EDTA. Após centrifugação a 4°C a 3.000 rpm por 15 minutos, as amostras foram levadas ao Laboratório de Medicina Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e armazenadas, em temperatura ambiente, para extração do

DNA genômico e posterior avaliação do comprimento relativo do telômero. Os procedimentos estão descritos a seguir.

3.15.1 Extração de DNA Genômico

O DNA foi extraído através do método salino, descrito por Lahiri e Numberger (1991)⁶⁸, modificado por Cavalli et al. (1996)⁶⁹ e Salazar et al. (1998)⁷⁰, como descrito a seguir. As amostras de sangue foram delicadamente homogeneizadas e em seguida foram transferidas para um tubo Falcon de 15 ml onde foi adicionado 4 ml de solução tampão TKM contendo 3% de Triton X-100 (concentração final de 15% de Triton) para lavagem do sangue, retirando o excesso de plasma e de hemácias de cada amostra. O volume de TKM-Triton (4,27 ml de TKM para 130 µl de Triton X-100 para 1 amostra) adicionado foi proporcional ao volume de sangue coletado e homogeneizado por inversão dos tubos cerca de 30 vezes para lise das membranas celulares dos leucócitos. Os tubos foram centrifugados a 1.200 g (força gravitacional) por 10 minutos a 22°C e o sobrenadante foi descartado ao final.

Os tubos, então contendo apenas o *pellet* (parte sedimentada contendo DNA), foram ressuspensos em 4 ml de TKM e agitados cerca de 30 vezes por inversão e, posteriormente, centrifugados a 1.200 g por 10 minutos a 22°C para separação dos leucócitos livres de hemácias. Este procedimento foi repetido três vezes. Em seguida foram adicionados 850 µl de solução TKM- SDS (800 µl para 50 µl de SDS 10% para 1 amostra) com posterior agitação manual para desfragmentação do *pellet* e incubação em “banho maria” a 55°C por 10 minutos com objetivo de se romper a membrana plasmática e nuclear dos leucócitos.

Após a incubação, os tubos foram agitados novamente e centrifugados a 400 g por 1 minuto para coleta do conteúdo e transferência para um micro tubo de 1,5 ml. Neste tubo foram adicionados 300 µl de solução de NaCl 6 molar (6M) de forma a homogeneizar a mistura por inversão lenta cerca de 10 vezes para auxiliar na dissociação das proteínas ligadas aos ácidos nucleicos (histonas), romper ligações iônicas nas cadeias

polipeptídicas e neutralizar a carga negativa do DNA permitindo que as moléculas de DNA presentes na solução se agregassem e formassem um precipitado visível em etanol. O tubo foi centrifugado a 12.000 g por 5 minutos a 22°C e seu conteúdo foi posteriormente transferido para um tubo final com tampa de rosca de 2 ml. Foram adicionados 450 µl de isopropanol ao sobrenadante e homogeneizados por inversão até a precipitação do DNA. Os tubos de 2 ml foram centrifugados a 16.000 g por 15 minutos a 22°C com posterior descarte do sobrenadante. Para lavagem do *pellet* foram adicionados 1 ml de etanol 70%. Os tubos foram centrifugados a 12.000g por 5 minutos a 22°C com descarte do sobrenadante ao final do processo. Esta etapa foi realizada duas vezes a fim de se eliminar o restante dos sais presentes no tubo que são solúveis no etanol e precipitação do DNA, que é insolúvel neste meio.

Por fim, os tubos foram mantidos por cerca de uma hora sobre papel toalha até a completa evaporação do álcool e ressuspensos em 400 µl TE (pH 8.0 5 ml Tris-HCl 1mM; 1 ml EDTA 0,5mM para 500ml de solução) para dissolução do DNA precipitado em “banho maria” a 55°C durante uma semana. Após este período as amostras foram armazenadas a 4°C.

3.15.2 Quantificação das Amostras de DNA

A quantificação e avaliação da qualidade do DNA foi realizada através do NanoDrop™ 2000/2000c (ThermoScientific®, Waltham, MA, USA) pelas razões de absorbância 260/280 e 260/230 e a concentração ajustada para a técnica de qPCR.

3.15.3 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR)

A Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) é uma técnica já padronizada no Laboratório de Medicina Molecular da Faculdade de Medicina da UFMG, onde foram realizados os experimentos.

As amostras de DNA obtidas pelo método de extração foram padronizadas para concentração final de 75 ng em 20 µl, sendo cada amostra analisada em triplicata. Para cada placa, três controles negativos foram incluídos para detectar presença de contaminação por erro de manipulação (controle sem amostra - NTC), controles sem iniciadores e sem Taq DNA polimerase (NPC).

Para a reação foi utilizado um mix (50 nM ROX, 0,2 x SYBR Green I (Invitrogen), Kit Invitrogen Platinum® Taq DNA polymerase 1,25 U; Buffer 1 x; MgCl₂ 2 ml, 0,2 mM de cada dNTP, 27 nM do iniciador direto telomérico e 90 nM do reverso) contendo os reagentes que foram subdivididos em dois tubos - um para o par de iniciadores para o DNA telomérico e outro para o gene constitutivo 36B4³³ (Tabela 4). As reações foram realizadas em duas placas de 96 poços (uma para cada gene) com volume final de 50 µl por poço.

Tabela 4. Iniciadores teloméricos específicos utilizados na reação de qPCR

Genes	Iniciadores	
	Direto (5' → 3')	Reverso (3' → 5')
Telômero	GGTTTTTGAGGGTGAGGGT GAGGGTGAGGGTGAGGGT	TCCCGACTATCCCTATCCC TATCCCTATCCCTATCCCTA
36B4	CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC	CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA

36B4: gene constitutivo

Os ciclos foram programados para 95°C por 10 minutos para ativação da Taq polimerase em ambas as amplificações tanto para o gene constitutivo quanto para o produto telomérico. Para a PCR do telômero foram utilizados 18 ciclos de 95°C por 15 segundos e 54°C durante 2 minutos, e para as reações do 36B4, 30 ciclos de 95°C durante 15 segundos, e 58°C durante 1 minuto. As leituras de fluorescência foram feitas por aparelho de PCR em tempo real ABI 7500 PCR da Applied Biosystems® (7500 Real-Time CR System; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e os Cts para cada triplicata foram analisados ao final. As amostras que apresentaram desvio padrão superior a 0,25 foram repetidas.

Os resultados das médias dos Cts, tanto teloméricos quanto do gene *36B4*, foram obtidos ao final das reações e normalizados pela média geométrica dos Cts através do cálculo $2^{-(Ct(\text{Telômeros}) - Ct(36B4))}$ que determina a quantidade de ciclos a mais que o gene *36B4* de cópia única necessita para alcançar a fluorescência máxima³³. Este valor relativo final foi utilizado para comparação entre os grupos estudados (Figura 3).

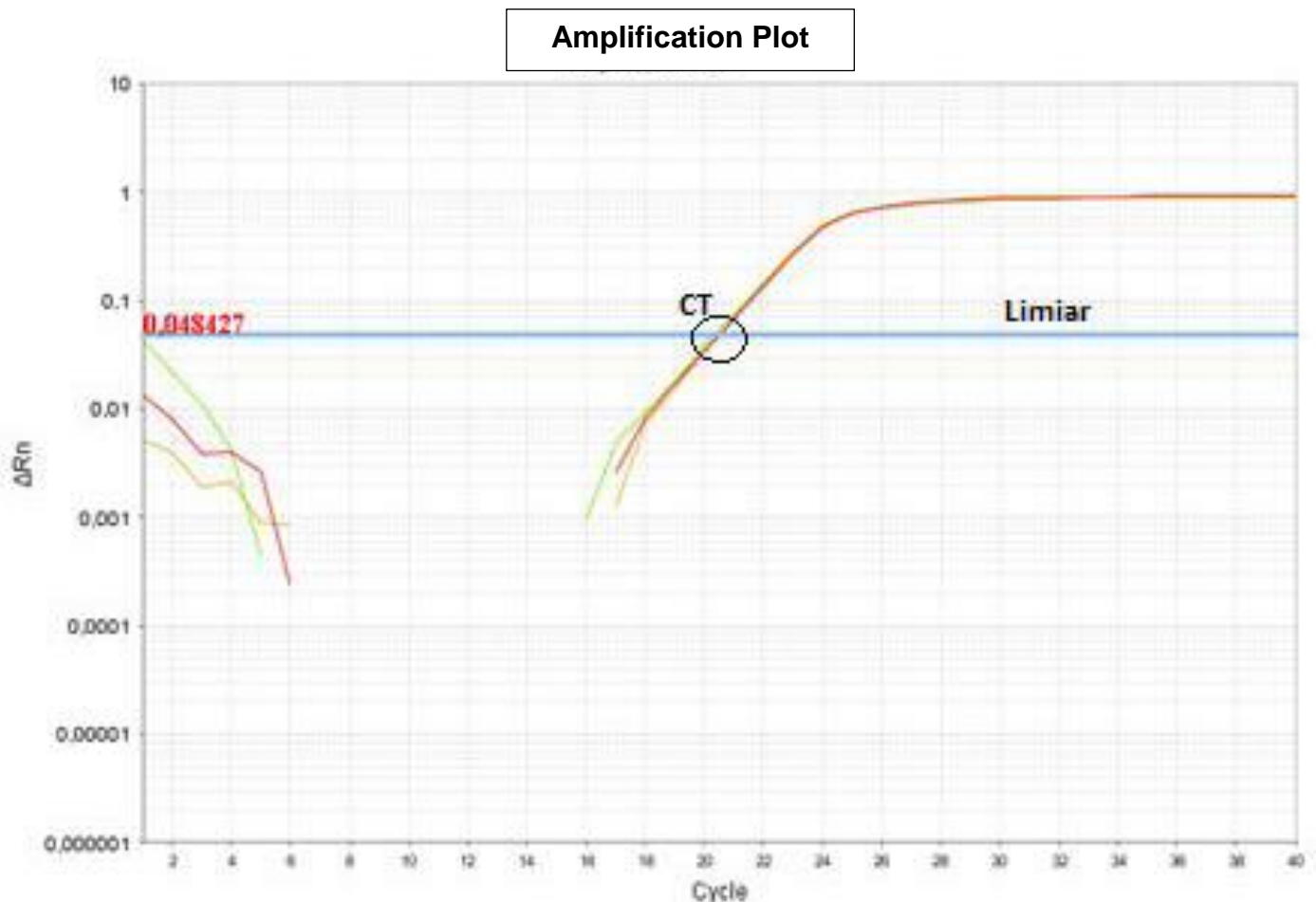


Figura 3. Ilustração da amplificação da reação pela PCR em tempo real

CT: *Cycle thresholds*

3.16 Análise Estatística

Os resultados foram obtidos utilizando frequências e porcentagens para as características qualitativas e medidas de tendência central (média e/ou mediana) e medidas de dispersão (desvio-padrão) para as quantitativas. As comparações do

comprimento relativo do telômero e demais variáveis foram realizadas a partir do teste t-Student, quando as suposições de normalidade e homoscedasticidade foram satisfeitas, e Mann-Whitney, caso contrário. A normalidade foi avaliada por meio do teste Shapiro-Wilk e homoscedasticidade, pelo teste Levene. A comparação entre os sexos e os grupos foi realizada a partir do teste de duas proporções.

Para a análise univariada foi realizado um ajuste de modelo de regressão linear entre cada uma das características de interesse (caracterização da amostra, comorbidades, história progressiva de nefrite e LENP, doses acumuladas, atividade de doença, dano, cognição, fadiga, depressão, ansiedade, estresse e atividade física) e a variável resposta “comprimento relativo do telômero”.

As características com valor p inferior a 0,25 na análise univariada foram inseridas no processo de ajuste do modelo multivariado inicial. Foram realizados cinco processos de modelagens. Quando presente no modelo inicial mais de uma característica cognitiva, elas foram modeladas separadamente mantendo no modelo inicial apenas aquela com menor valor p. Em seguida, foram acrescentadas a ela todas as outras e foi aplicado o método *stepwise backward*, ou seja, estas características foram incluídas no modelo inicial e foram retiradas uma a uma até que restaram no modelo final apenas aquelas com significância estatística ($p \leq 0,05$).

A adequação do modelo de regressão linear foi avaliada a partir da análise dos resíduos. Destaca-se que o grau de depressão, ansiedade e estresse, assim como atividade física tiveram as categorias agrupadas nessas análises.

As correlações foram avaliadas a partir do cálculo do coeficiente de correlação de Spearman.

As análises foram realizadas nos programas R versão 3.6.3 e MINITAB. Foi considerado nível de significância de 5%.

4. RESULTADOS

4.1 Características da amostra

Foram avaliados 60 pacientes com LES e 55 controles. Entre os pacientes, 45 (75%) tiveram o diagnóstico na idade adulta e 15 (25%), na faixa etária pediátrica, com tempo médio (DP) de diagnóstico de 12 (5,8) anos; 52 (86,7%) eram do sexo feminino, com média de idade de 37 (11,5) anos (Tabela 5); 56,7% tinha até duas comorbidades. Entre os controles, 48 (87,3%) eram do sexo feminino, com média de idade de 38 (10,5) anos e 89,1% não apresentavam comorbidades. Não houve diferença estatística entre os grupos, considerando sexo e idade ($p=0,923$ e $p=0,737$, respectivamente). Houve diferença estatística na classificação etnico-racial e na presença de comorbidades entre os grupos ($p=0,026$ e $p<0,05$, respectivamente). As características da amostra estão descritas na tabela 5.

Tabela 5. Características demográficas e clínicas de 60 pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e 55 controles

Características	Casos (n=60)	Controles (n=55)	Valor-p
Categoria, n (%)			
<i>Pediátrico</i>	15 (25)	-	-
<i>Adulto</i>	45 (75)	-	-
Sexo, n (%)			0,924*
<i>Feminino</i>	52 (86,7)	48 (87,3)	-
Idade em anos, média (DP) / mediana (mínimo-máximo)	37 (11,5) / 35 (19-60)	38 (10,5) / 37 (18-60)	0,737**
Classificação étnico-racial, n (%)			0,026*
<i>Branca</i>	17 (28,3)	10 (18,2)	-
<i>Preta</i>	14 (23,3)	9 (16,4)	-
<i>Parda</i>	28 (46,7)	29 (52,7)	-
<i>Amarela</i>	0 (0)	7 (12,7)	-
<i>Indígena</i>	1 (1,7)	0 (0)	-
Anos de estudo, n (%)			0,855*
<i>1 a 3</i>	3 (5)	0 (0)	-
<i>4 a 7</i>	8 (13,3)	11 (20,4)	-
<i>8 a 10</i>	5 (8,4)	6 (11,1)	-
<i>11 a 14</i>	36 (60)	24 (44,4)	-
<i>15 ou mais</i>	8 (13,3)	13 (24,1)	-
Dados antropométricos, média (DP) / mediana (mínimo-máximo)			
<i>Peso</i>	73,04 (17,19) / 69 (44-139)	71,29 (14,00) / 72(40-105)	0,552**
<i>IMC, em Kg/m²</i>	28,03 (6,31) / 28 (17-51)	27,48 (5,36) / 28 (17-46)	0,620**
Comorbidades, n (%)			<0,005*
<i>Nenhuma</i>	25 (41,7)	49 (89,1)	-
<i>Até 2</i>	35 (58,3)	6 (10,6)	-
<i>3 ou mais</i>	3 (5)	0 (0)	-
Comorbidades, n (%)			
<i>Diabetes mellitus</i>	6 (10)	2 (3,6)	-
<i>Dislipidemia</i>	11 (18,3)	1 (1,8)	-
<i>DPOC</i>	3 (5)	0 (0)	-

Tabela 5. Continua...

Características			
<i>DRC</i>	2 (3,3)	0 (0)	-
<i>HAS</i>	13 (21,7)	5 (9,1)	-
<i>Obesidade</i>	18 (30)	15 (27,3)	
<i>Tabagismo</i>	6 (10)	3 (5,5)	-
<i>Etilismo</i>	1 (1,7)	0 (0)	
<i>Neoplasia</i> ***	1 (1,7)	0 (0)	-

Os dados da tabela estão apresentados como n (%), média (DP), mediana (valores mínimo e máximo).

cm: centímetros; DP: desvio-padrão; DPOC: doença pulmonar crônica; DRC: doença renal crônica; IMC: índice de massa corporal; HAS: hipertensão arterial sistêmica; kg: quilogramas; m²: metro ao quadrado.

*U de Mann-Whitney; **Teste-T; ***Carcinoma in situ de vulva

No momento da inclusão, 35 (58,3%) pacientes estavam sem atividade clínica e laboratorial, 4 (6,7%) em baixa atividade de doença (65% da amostra em remissão clínica ou em baixa atividade de doença), 8 (13,3%) em atividade crônica persistente há 21 meses, em média, 12 (20%) com nefrite ativa e com média de *SLEDAI-2K* de 4 (4,14).

Em relação ao tratamento, 45 (75%) em uso de antimalárico (sulfato de hidroxicloroquina ou difosfato de cloroquina), 34 (56,7%) em uso de prednisona e 36 (60%) com dose estável de imunossupressor há, pelo menos, seis meses (Tabela 6).

Vinte e sete pacientes (45,0%) apresentaram infecção grave e/ou oportunística ao longo do curso da doença, sendo que 16 (26,7%) pacientes necessitaram de internação hospitalar.

Tabela 6. Características clínicas dos 60 pacientes com lúpus eritematoso sistêmico

Características	
Diagnóstico	
<i>Tempo do diagnóstico em anos, média (DP) / mediana (mínimo-máximo)</i>	12 (5,8) / 11 (1-27)
<i>Tempo do diagnóstico em anos, n (%)</i>	
<i>Até 5 anos</i>	9 (15)
<i>Entre 6 e 10 anos</i>	20 (33,3)
<i>Acima de 10 anos</i>	31 (51,7)
<i>Idade ao diagnóstico (anos), média (DP) / mediana (mínimo-máximo)</i>	25 (10,1) / 22 (6-53)
<i>Idade do início dos sintomas (anos), média (DP) / mediana (mínimo-máximo)</i>	24 (11,2) / 23 (6-52)
Síndrome Antifosfolípide, n (%)	9 (15)
<i>Evento gestacional</i>	2 (3,3)
<i>Evento venoso</i>	9 (15)
<i>TVP</i>	8 (13,3)
<i>TEP</i>	2 (3,3)
Infecções, n (%)	27 (45)
<i>Número de infecções/paciente, média (DP) / mediana (mínimo-máximo)</i>	0,78 (1,26) / 0 (0-6)
<i>Internações hospitalares por infecção, n (%)</i>	16 (26,7)
<i>Número de internações/paciente, média (DP) / mediana (mínimo-máximo)</i>	0,32 (0,46) / 0 (0-5)
Manifestações acumuladas*, n (%)	
<i>Alterações mucocutâneas</i>	50 (83,3)
<i>Alterações articulares</i>	49 (81,7)
<i>Acometimento cardiopulmonar</i>	18 (30)
<i>Nefrite</i>	31 (51,7)
<i>Número de episódios, média (DP) / mediana (mínimo-máximo)</i>	1,4 (0,66) / 1 (1-3)
<i>Idade do primeiro episódio (anos), média (DP) / mediana (mínimo-máximo)</i>	31 (9,5) / 30 (13-50)
<i>Tempo desde o primeiro episódio (anos), média (DP) / mediana (mínimo-máximo)</i>	8 (6,16) / 8 (1-25)
<i>Acometimento neuropsiquiátrico</i>	14 (23,3)
<i>Número de episódios, média (DP) / mediana (mínimo-máximo)</i>	0,3 (0,61) / 1 (0,6)
<i>Idade do primeiro episódio (anos), média (DP) / mediana (mínimo-máximo)</i>	23 (9,46) / 22 (6-40)
<i>Tempo desde o primeiro episódio (anos), média (DP) / mediana (mínimo-máximo)</i>	8 (4,15) / 7 (2-16)

Tabela 6. Continua...

Características	
<i>Alterações hematológicas¹</i>	48 (80)
<i>Vasculite cutânea</i>	17 (28,3)
Manifestações atuais, n (%)	
<i>Alterações mucocutâneas</i>	5 (8,3)
<i>Alterações articulares</i>	5 (8,3)
<i>Alterações cardiopulmonares</i>	7 (11,7)
<i>Nefrite</i>	12 (20)
Atividade de doença, n (%)	
<i>Remissão clínica**</i>	35 (58,3)
<i>Tempo de remissão clínica em meses, média (DP) / mediana (mínimo-máximo)</i>	38 (37,8) / 20 (3-129)
<i>Baixa atividade de doença</i>	4 (6,7%)
<i>Tempo de baixa atividade de doença em meses, média (DP) / mediana (mínimo-máximo)</i>	12 (12,8) / 9 (0-30)
<i>Exacerbação</i>	13 (21,7)
<i>Atividade crônica persistente</i>	8 (13,3)
<i>Tempo de atividade crônica persistente em meses, média (DP) / mediana (mínimo-máximo)</i>	21 (20,4) / 12 (2-65)
SLEDAI-2K, média (DP) / mediana (mínimo-máximo)	
<i>Diagnóstico</i>	11 (6,1) / 10 (2-25)
<i>Inclusão</i>	4 (4,14) / 2 (0-18)
<i>PGA</i>	0,25 (0,55) / 0 (0-2)
SLICC-DI, média (DP) / mediana (mínimo-máximo)	
<i>Inclusão</i>	1 (1,55) / 1 (0-6)
C3 (mg/dl), média (DP) / mediana (mínimo-máximo)	104 (30) / 106 (31-172)
C4 (mg/dl), média (DP) / mediana (mínimo-máximo)	20 (12) / 17 (2-54)
Anti-DNA nativo, n (%)	31 (51,7)
Tratamento prévio, n (%)	
<i>Antimalárico</i>	60 (100)
<i>Azatioprina</i>	44 (73,3)

Tabela 6. Continua...

Características	
<i>Belimumabe</i>	1 (1,7)
<i>Ciclosporina</i>	19 (31,7)
<i>Dapsona</i>	4 (6,7)
<i>Imunoglobulina Humana Endovenosa</i>	6 (10)
<i>Leflunomida</i>	3 (5)
<i>Metotrexato</i>	29 (48,3)
<i>Micofenolato de mofetila ou de sódio</i>	16 (26,7)
<i>Prednisona</i>	60 (100)
<i>Pulsoterapia</i>	
<i>Metilprednisolona</i>	36 (60)
<i>Ciclofosfamida</i>	42 (70)
<i>Rituximabe</i>	7 (11,7)
<i>Talidomida</i>	1 (1,7)
<i>Sem imunossupressão</i>	0 (0)
Tratamento atual, n (%)	
<i>Antimalárico</i>	45 (75)
<i>Azatioprina</i>	12 (20)
<i>Ciclosporina</i>	11 (18,3)
<i>Dapsona</i>	1 (1,7)
<i>Leflunomida</i>	1 (1,7)
<i>Metotrexato</i>	11 (18,3)
<i>Micofenolato de mofetila ou de sódio</i>	12 (20)
<i>Prednisona</i>	
≤ 7,5 mg	17 (28,3)
> 7,5 mg	11 (18,3)
<i>Pulsoterapia</i>	
<i>Ciclofosfamida</i>	3 (5)
<i>Rituximabe</i>	4 (6,7)

Tabela 6. Continua...

Características	
<i>Talidomida</i>	1 (1,7)
<i>Sem imunossupressão</i>	2 (3,3)
<i>Imunossupressor estável (6 meses)</i>	36 (60)
Doses acumuladas, média (DP) / mediana (mínimo–máximo)	
<i>Antimalárico (anos de uso)</i>	10 (5,71) / 9 (1-26)
<i>Antimalárico (em mg)</i>	1.266.205 (1.649.784) / 990.737 (244.626-12.778.589)
<i>Corticosteroide (em mg)</i>	44.809 (33.516,47) / 37.088 (3.600-202.522)
<i>Ciclofosfamida (em mg)</i>	6.216 (5618,68) / 6.600 (800-23.600)

Os dados da tabela estão apresentados como n (%), média (DP), mediana (valores mínimo e máximo).

DP: desvio-padrão; mg: miligramas; mg/dl: miligramas por decilitros; *PGA: Physician Global Assessment; SLEDAI-2K: Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index - 2000; SLICC-DI: Systemic Lupus International Collaborating Clinics – Damage Index*; TEP: tromboembolismo pulmonar; TVP: trombose venosa profunda.

*Manifestações do LES acumuladas desde o diagnóstico até o período de inclusão no estudo.

**Remissão clínica de acordo com *DORIS*.

¹Anemia hemolítica autoimune, leucopenia, plaquetopenia

Na avaliação cognitiva, 37 (61,7%) pacientes apresentaram alterações no MEEM. Trinta e oito (63,3%) dos pacientes tiveram, pelo menos, um teste cognitivo alterado (Tabela 7). No que tange a presença de sintomas de depressão, ansiedade e estresse, avaliados pelo *DASS21*, 25 (41,6%) pacientes apresentaram sintomas de depressão moderada a muito grave; 12 (20%), sintomas de ansiedade moderada e 15 (25%), grave a muito grave; e 33 (55%) apresentaram algum grau de estresse, variando de leve a muito grave (Tabela 7).

Tabela 7. Avaliação cognitiva, fadiga, depressão, ansiedade e estresse dos 60 pacientes com lúpus eritematoso sistêmico

Características	
MEEM, n (%), média (DP), mediana (mínimo-máximo)	37 (61,7) / 26 (2,67) / 27(19-30)
<i>Atenção e Cálculo</i>	24 (40) / 3 (1,79) / 3 (0-5)
<i>Cognição geral, n (%)</i>	13 (21,7)
<i>Orientação espacial, n (%)</i>	2 (2,7)
<i>Orientação temporal, n (%)</i>	2 (2,7)
Fluência verbal, n (%)	9 (15)
<i>Animais, média (DP), mediana (mínimo-máximo)</i>	18 (5,93) / 18 (9-35)
<i>Frutas, média (DP), mediana (mínimo-máximo)</i>	15 (4,38) / 15 (8-27)
Relógio de Schulman, n (%), média (DP), mediana (mínimo-máximo)	15 (25) / 3 (1,32) / 4 (0-5)
Lista de palavras CERAD, n (%), média (DP), mediana (mínimo-máximo)	
<i>3 tentativas</i>	15 (25) / 19 (3,68) / 19 (10-26)
<i>Evocação</i>	12 (20) / 6 (2,22) / 6 (2-10)
<i>Reconhecimento de palavras</i>	1 (1,7) / 9 (1,43) / 9 (5-10)
Testes de cognição alterados*, n (%)	38 (63,3)
FACIT – Fadigue, média (DP), mediana (mínimo-máximo)	36 (12,47) / 38 (2-52)
DASS21, média (DP), mediana (mínimo-máximo)	42 (34,18) / 36 (0-42)
Depressão, média (DP), mediana (mínimo-máximo)	15 (14) / 12 (0-42)
<i>Normal, n (%)</i>	27 (45)
<i>Leve, n (%)</i>	8 (13,3)
<i>Moderada, n (%)</i>	8 (13,3)
<i>Grave, n (%)</i>	1 (1,7)
<i>Muito grave, n (%)</i>	16 (26,7)
Ansiedade, média (DP), mediana (mínimo-máximo)	11 (10,9) / 8 (0-40)
<i>Normal, n (%)</i>	29 (48,3)
<i>Leve, n (%)</i>	4 (6,7)
<i>Moderada, n (%)</i>	12 (20)
<i>Grave, n (%)</i>	5 (8,3)
<i>Muito grave, n (%)</i>	10 (16,7)

Tabela 7. Continua...

Características	
Estresse, média (DP), mediana (mínimo-máximo)	16 (12,2) / 14 (0-42)
<i>Normal, n (%)</i>	27 (45)
<i>Leve, n (%)</i>	12 (20)
<i>Moderada, n (%)</i>	7 (11,7)
<i>Grave, n (%)</i>	8 (13,3)
<i>Muito grave, n (%)</i>	6 (10)

Os dados da tabela estão apresentados como n de pacientes (%), média (DP), mediana (valores mínimo e máximo).

DP: desvio-padrão; DASS: *Depression Anxiety Stress Scale*; FACIT: *Functional Assessment of Chronic Illness Therapy*;

MEEM: mini-exame do estado mental

*Considerado pelo menos um teste cognitivo alterado

Em relação à atividade física, observou-se que 45 pacientes (75% da amostra) foram classificados como ativos e apenas 3 (5%), como sedentários, como explicitado na tabela 8.

Tabela 8. Classificação dos 60 pacientes com lúpus eritematoso sistêmico em relação à atividade física

Características, n (%)	
<i>Muito ativo</i>	4 (6,7%)
<i>Ativo</i>	45 (75%)
<i>Irregularmente ativo A</i>	5 (8,3%)
<i>Irregularmente ativo B</i>	3 (5%)
<i>Sedentário</i>	3 (5%)

4.2 Comprimento relativo do telômero

Os pacientes do grupo LES apresentaram mediana de comprimento relativo do telômero de 0,80, enquanto os participantes do grupo controle apresentaram mediana de 1,07. Os pacientes do grupo controle apresentaram a mediana do comprimento do telômero 0,27 maior que a do grupo caso (IC_{95%}: 0,07 a 0,38; p=0,005). Não houve diferença estatística entre o comprimento do telômero dos pacientes com LES de início na infância e daqueles com início na idade adulta (Tabela 9 e Figura 4). Na execução dos experimentos, do total de participantes incluídos (73 casos e 64 controles), houve perda de 13 casos e 9 controles (16,05% do total da amostra).

Tabela 9. Comparações do comprimento relativo do telômero entre os pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e o grupo controle

Características	Casos (n = 60)	Controles (n = 55)	Valor-p
CT	0,91 (0,51) / 0,80 (0,29-2,94)	1,10 (0,45) / 1,07 (0,38-2,32)	0,005*
Comparação dos casos			0,591*
CT LES juvenil	0,83 (0,45) / 0,70 (0,33-1,95)	-	-
CT LES adulto	0,93 (0,54) / 0,82 (0,29-2,94)	-	-

Os dados da tabela estão apresentados como média (DP), mediana (valores mínimo e máximo). CT: comprimento do telômero; LES: lúpus eritematoso sistêmico

*U de Mann-Whitney

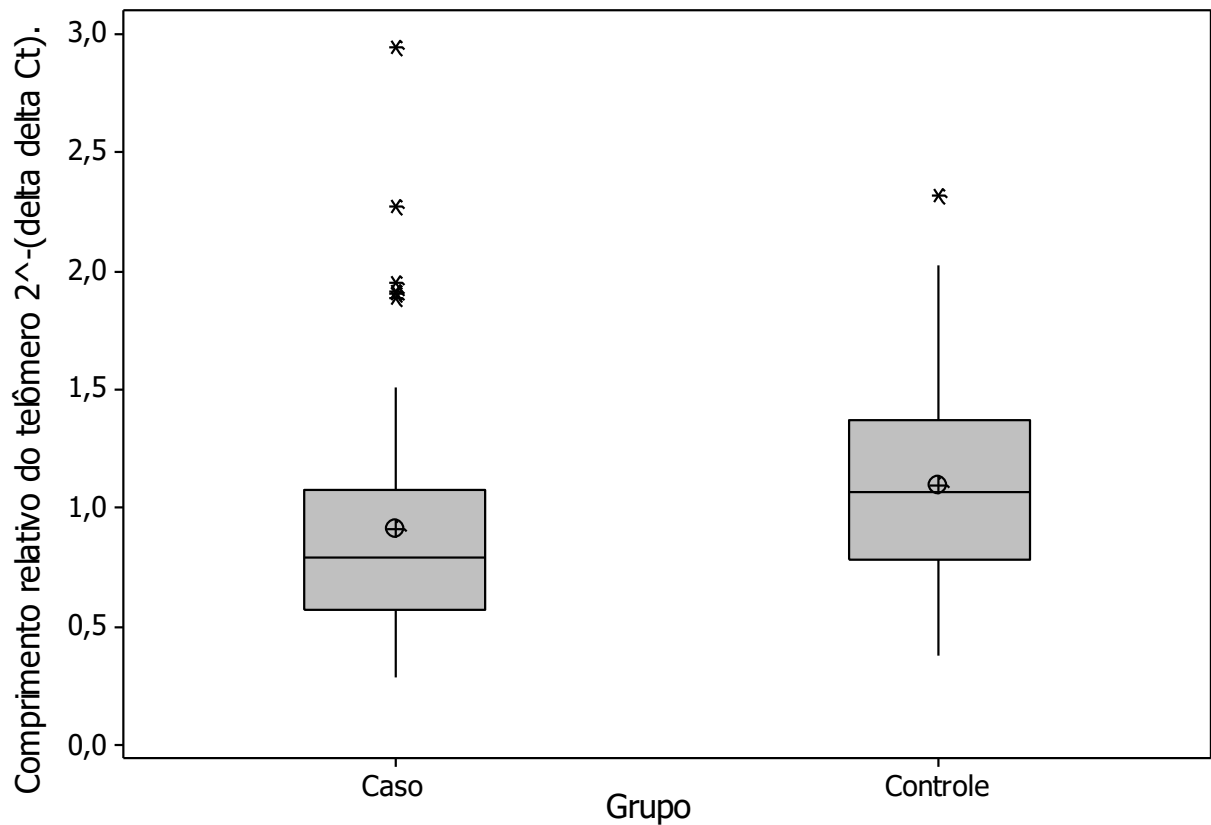


Figura 4. *Box-plot* representando a distribuição do comprimento relativo do telômero de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico em comparação com controles

4.3 Análise univariada e multivariada

A Tabela 10 mostra a análise univariada para o comprimento relativo do telômero dos 59 pacientes com LES. Após avaliação dos resíduos (não normais) (Figura 5), optou-se pela exclusão do outlier mais extremo, com valor do comprimento relativo do telômero igual a 2,94. As variáveis com valores de p inferiores a 0,25 foram indicadas para compor os modelos multivariados de regressão linear.

Tabela 10 – Análise univariada para o comprimento relativo do telômero (n = 59)

Características	Coefficiente	IC_{95%}	Valor-p	
Caracterização da amostra				
Sexo (feminino)	-0,007	-0,373; 0,358	0,969	
Idade	0,006	-0,005; 0,016	0,274	
Tempo do diagnóstico (anos)	0,017	-0,003; 0,036	0,102	
Tempo do diagnóstico (anos)				
	<i>Entre 6 e 10 anos</i>	0,058	-0,306; 0,423	0,750
	<i>Acima de 10 anos</i>	0,203	-0,138; 0,544	0,237
Idade ao diagnóstico (anos)	0,002	-0,009; 0,014	0,691	
IMC (kg/m ²)	0,001	-0,018; 0,021	0,889	
Número de comorbidades				
	<i>Até 2 comorbidades</i>	-0,042	-0,294; 0,210	0,738
	<i>2 ou mais comorbidades</i>	-0,106	-0,603; 0,391	0,671
Etilismo	-0,313	-1,225; 0,599	0,495	
Tabagismo	-0,094	-0,518; 0,330	0,660	
Presença de SAF	0,392	0,080; 0,704	0,015	
Número de infecções desde o diagnóstico	-0,057	-0,150; 0,036	0,226	
Infecções (SIM)	-0,167	-0,401; 0,067	0,158	
Número de internações hospitalares por infecção desde o diagnóstico	-0,053	-0,173; 0,067	0,381	
Internações hospitalares (SIM)	-0,140	-0,409; 0,129	0,301	
História pregressa				
Nefrite	-0,032	-0,268; 0,204	0,786	
LENP	-0,190	-0,463; 0,083	0,169	
Tratamento				
Antimalárico – anos de uso	0,010	-0,011; 0,032	0,330	
Antimalárico – dose acumulada (em mg)	-4,68E-08	-1,18E-07; 2,41E-08	0,191	
Corticosteroide – dose acumulada (em mg)	-1,04E-06	-4,58E-06; 2,50E-06	0,560	
Ciclofosfamida – dose acumulada (em mg)	-1,02E-05	-3,31E-05; 1,27E-05	0,376	
Atividade e dano				
SLEDAI-2K – diagnóstico	0,006	-0,014; 0,026	0,532	
SLEDAI-2K – inclusão	-0,007	-0,035; 0,022	0,646	
SLICC-DI – inclusão	0,010	-0,066; 0,086	0,786	
Cognição, fadiga, depressão, ansiedade e estresse				
MEEM	0,004	-0,003; 0,083	0,066	
Relógio de Schulman	-0,064	-0,151; 0,024	0,152	
Fluência - Animais	-0,017	-0,037; 0,002	0,082	
Fluência - Frutas	-0,003	-0,031; 0,025	0,828	
Lista de palavras				
	<i>Aprendizagem</i>	0,003	-0,029; 0,036	0,829
	<i>Evocação</i>	-0,008	-0,061; 0,045	0,761
	<i>Reconhecimento</i>	0,019	-0,063; 0,101	0,645

Tabela 10 – Continua...

Características	Coeficiente	IC_{95%}	Valor-p	
Atenção e cálculo	0,055	-0,010; 0,120	0,096	
Orientação espacial (SIM)	-0,448	-1,090; 0,194	0,168	
Orientação temporal (SIM)	-0,221	-0,973; 0,531	0,559	
Atenção e cálculo (SIM)	-0,125	-0,363; 0,114	0,299	
Cognição geral (SIM)	-0,134	-0,417; 0,149	0,346	
Aprendizagem (SIM)	-0,095	-0,365; 0,176	0,487	
Fluência (SIM)	-0,180	-0,505; 0,146	0,274	
Relógio (SIM)	-0,058	-0,329; 0,213	0,671	
Teste cognitivo alterado	-0,088	-0,334; 0,158	0,478	
FACIT - Fatigue	-0,006	-0,015; 0,004	0,227	
DASS21	3,06E-04	-0,004; 0,003	0,861	
Depressão	3,66E-05	-0,008; 0,009	0,993	
Classificação				
	<i>Moderada</i>	-0,204	-0,560; 0,152	0,257
	<i>Grave ou muito grave</i>	-0,020	-0,289; 0,249	0,882
Ansiedade	0,002	-0,008; 0,013	0,650	
Classificação				
	<i>Moderada</i>	-0,353	-0,645; 0,061	0,019
	<i>Grave ou muito grave</i>	0,056	-0,214; 0,326	0,679
Estresse	-0,003	-0,013; 0,007	0,552	
Classificação				
	<i>Moderada</i>	-0,411	-0,771; 0,050	0,026
	<i>Grave ou muito grave</i>	-0,078	-0,352; 0,196	0,572
Atividade física				
	<i>Irregularmente ativo</i>	-0,161	-0,499; 0,178	0,346
	<i>Sedentário</i>	0,422	-0,106; 0,950	0,115

DASS: Depression Anxiety Stress Score; IC: intervalo de confiança; IMC: índice de massa corporal; LENP: lúpus eritematoso neuropsiquiátrico; SAF: síndrome antifosfolípide; SLEDAI: Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index; SLICC: Systemic Lupus International Collaborating Clinics – Damage Index.

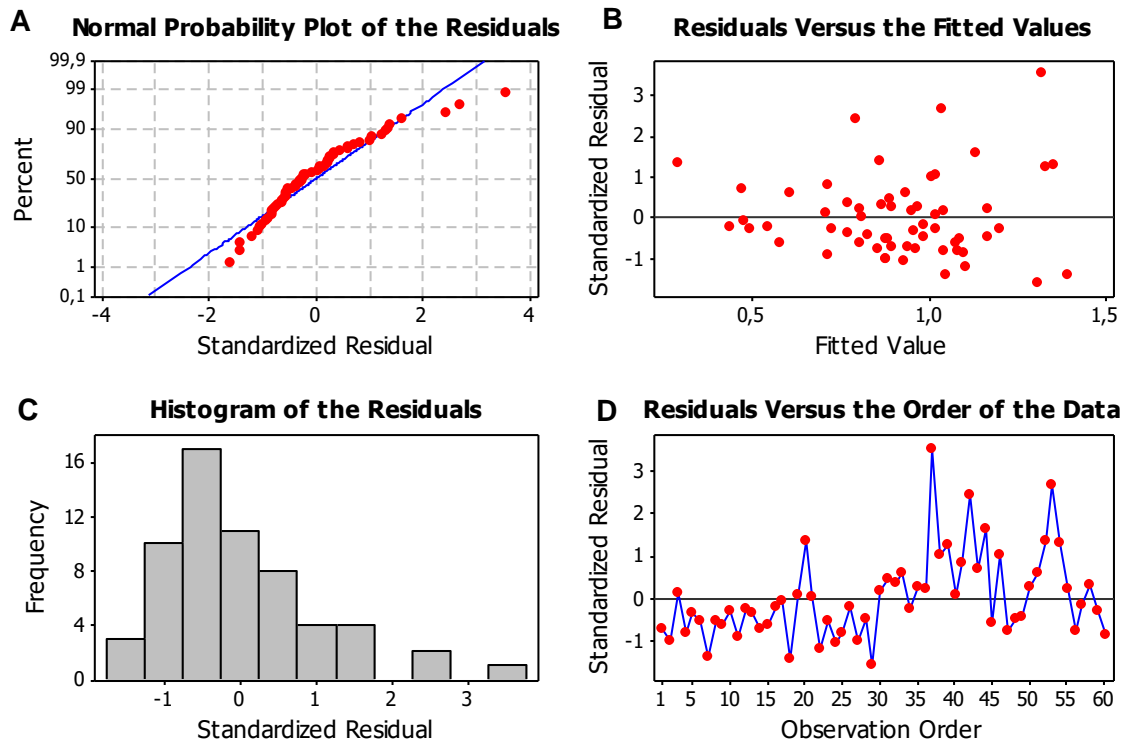


Figura 5. Gráfico dos resíduos do modelo completo (n=60)

A. Gráfico de probabilidade normal dos resíduos; B. Resíduos versus valores ajustados; C. Histograma dos resíduos; D. Resíduos versus ordem dos dados.

Na análise multivariada, foram realizados cinco modelos, cada um contendo características específicas.

No primeiro processo de ajuste do modelo multivariado, com a exclusão de atenção e cálculo e mantendo as demais características cognitivas, foram inseridos os itens: tempo do diagnóstico, SAF (sim), infecções (sim), história pregressa de LENP (sim), dose acumulada de antimalárico, MEEM, relógio de Schulman, fluência – animais, orientação espacial, FACIT – Fadiga, grau de ansiedade, grau de estresse e Atividade física. As etapas do ajuste do modelo final de regressão linear são apresentadas na tabela 12. Permaneceram no modelo as características: SAF, fluência – animais e grau da ansiedade (tabela 13).

Os pacientes com SAF apresentaram comprimento relativo do telômero, em média, 0,432 (IC_{95%}: 0,145 a 0,718; p=0,004) maior do que os pacientes sem SAF; a cada 10 unidades a mais no teste de fluência – animais o comprimento do telômero diminui, em média, 0,21 (IC_{95%}: -0,38 a -0,03; p=0,022); os pacientes com grau de ansiedade moderada apresentaram comprimento relativo do telômero, em média, 0,381 (IC_{95%}: -0,648 a -0,114; p=0,006) menor do que os pacientes sem ansiedade ou com grau leve. Para os pacientes com ansiedade grave ou muito grave não foi observada diferença com significância estatística no comprimento relativo do telômero quando comparado aos pacientes sem ansiedade ou com grau leve (valor-p=0,546).

Após a análise dos resíduos observou-se que o modelo está bem ajustado (figura 6).

Tabela 11. Etapas para o ajuste do modelo multivariado de regressão linear (n = 59, primeiro modelo)

Características	Valores-p das etapas do ajuste																	
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI	XVII	XVIII
Tempo do diagnóstico	X	0,480	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	0,532	X	X	X	X	X
SAF	X	0,08	0,064	0,048	0,063	0,044	0,024	0,003	0,004	0,006	0,010	0,010	0,008	0,007	0,004	0,006	0,012	0,007
Infecções (SIM)	X	0,226	0,249	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	0,394	X	X	X	X
HP LENP	X	0,170	0,174	0,239	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	0,239	X	X	X
Antimalárico	X	0,174	0,190	0,201	0,215	0,215	X	X	X	X	X	X	X	X	X	0,387	X	X
MEEM	0,034	X	X	X	X	X	X	X	X	0,094	X	X	X	X	X	X	X	X
Relógio de Schulman	0,053	X	X	X	X	X	X	X	X	X	0,314	X	X	X	X	X	X	X
Fluência - Animais	0,032	0,062	0,053	0,068	0,063	0,035	0,028	0,025	0,022	X	X	X	0,026	0,019	0,021	0,026	0,023	0,043
Orientação espacial	0,099	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	0,138	X	X	X	X	X	X
FACIT - Fadiga	X	0,047	0,041	0,042	0,032	0,029	0,044	0,131	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Grau da ansiedade																		
Moderada	X	0,150	0,126	0,071	0,049	0,027	0,032	0,002	0,006	0,039	0,014	0,009	0,010	0,015	0,017	0,005	0,049	0,016
Grave ou muito grave	X	0,898	0,915	0,865	0,807	0,694	0,891	0,611	0,546	0,282	0,634	0,557	0,530	0,467	0,405	0,698	0,458	0,425
Grau do estresse																		
Moderada	X	0,290	0,227	0,199	0,073	0,064	0,078	X	X	X	X	X	X	X	X	X	0,230	X
Grave ou muito grave	X	0,524	0,452	0,352	0,172	0,157	0,206	X	X	X	X	X	X	X	X	X	0,811	X
Atividade física																		
Irregularmente ativo	X	0,998	0,895	0,832	0,787	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	0,778
Sedentário	X	0,147	0,173	0,200	0,355	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	0,344
R² ajustado																		24,6

FACIT: *functional assessment chronic illness therapy*; HP: história pregressa; LENP: lúpus eritematoso neuropsiquiátrico;

MEEM: mini-exame do estado mental; SAF: síndrome antifosfolípide; X: não incluído na etapa.

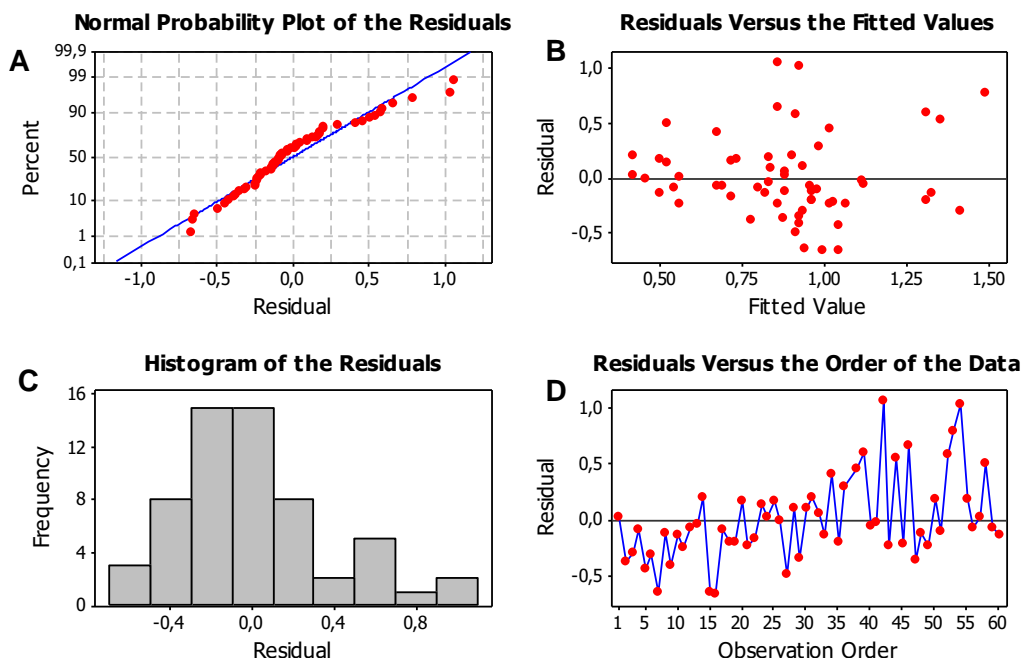


Figura 6. Gráfico dos resíduos do primeiro modelo ajustado (n=59)

A. Gráfico de probabilidade normal dos resíduos; B. Resíduos versus valores ajustados; C. Histograma dos resíduos; D. Resíduos versus ordem dos dados.

No segundo processo de ajuste do modelo multivariado, mantendo apenas MEEM e excluindo as demais características cognitivas, foram inseridos os itens: tempo do diagnóstico, SAF, infecções, história progressa de LENP, dose acumulada de antimalárico, MEEM, FACIT – Fatigue, grau da ansiedade, grau do estresse e atividade física. As etapas do ajuste do modelo final de regressão linear são apresentadas na tabela 12. Permaneceram no ajuste final as características: SAF ($IC_{95\%}$ 0,120; 0,715; $p=0,010$) e grau da ansiedade ($IC_{95\%}$ -0,620; -0,069; $p=0,030$), com ajuste adequado (Figura 7).

Tabela 12. Etapas para o ajuste do modelo multivariado de regressão linear (n = 59, segundo modelo)

Características	Valores-p das etapas do ajuste															
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI
Tempo do diagnóstico	0,444	X	X	X	X	X	X	X	X	0,456	X	X	X	X	X	X
SAF	0,119	0,086	0,067	0,078	0,053	0,070	0,007	0,006	0,007	0,013	0,010	0,007	0,011	0,006	0,02	0,013
Infecções (SIM)	0,349	0,388	X	X	X	X	X	X	X	X	0,575	X	X	X	X	X
HP LENP	0,305	0,320	0,393	X	X	X	X	X	X	X	X	0,279	X	X	X	X
Antimalárico	0,142	0,155	0,163	0,168	0,171	0,172	X	X	X	X	X	X	0,326	X	X	X
MEEM	0,288	0,262	0,241	0,144	0,174	X	X	X	X	X	X	X	X	0,094	X	X
FACIT - Fadigue	0,075	0,069	0,070	0,065	0,056	0,023	X	0,122	X	X	X	X	X	X	X	X
Grau da ansiedade																
Moderada	0,320	0,286	0,199	0,178	0,097	0,052	0,015	0,006	0,015	0,025	0,030	0,038	0,013	0,039	0,09	0,038
Grave ou muito grave	0,879	0,852	0,888	0,900	0,927	0,778	0,410	0,710	0,410	0,397	0,367	0,303	0,570	0,282	0,34	0,284
Grau do estresse																
Moderada	0,267	0,203	0,180	0,081	0,067	0,062	X	X	X	X	X	X	X	X	0,23	X
Grave ou muito grave	0,605	0,528	0,452	0,318	0,268	0,131	X	X	X	X	X	X	X	X	0,77	X
Atividade física																
Irregularmente ativo	0,773	0,651	0,604	0,540	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	0,726
Sedentário	0,094	0,113	0,130	0,193	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	0,181
R² ajustado																18,4

FACIT: *functional assessment chronic illness therapy*; HP: história pregressa; LENP: lúpus eritematoso neuropsiquiátrico;

MEEM: mini-exame do estado mental; SAF: síndrome antifosfolípide; X: não incluído na etapa.

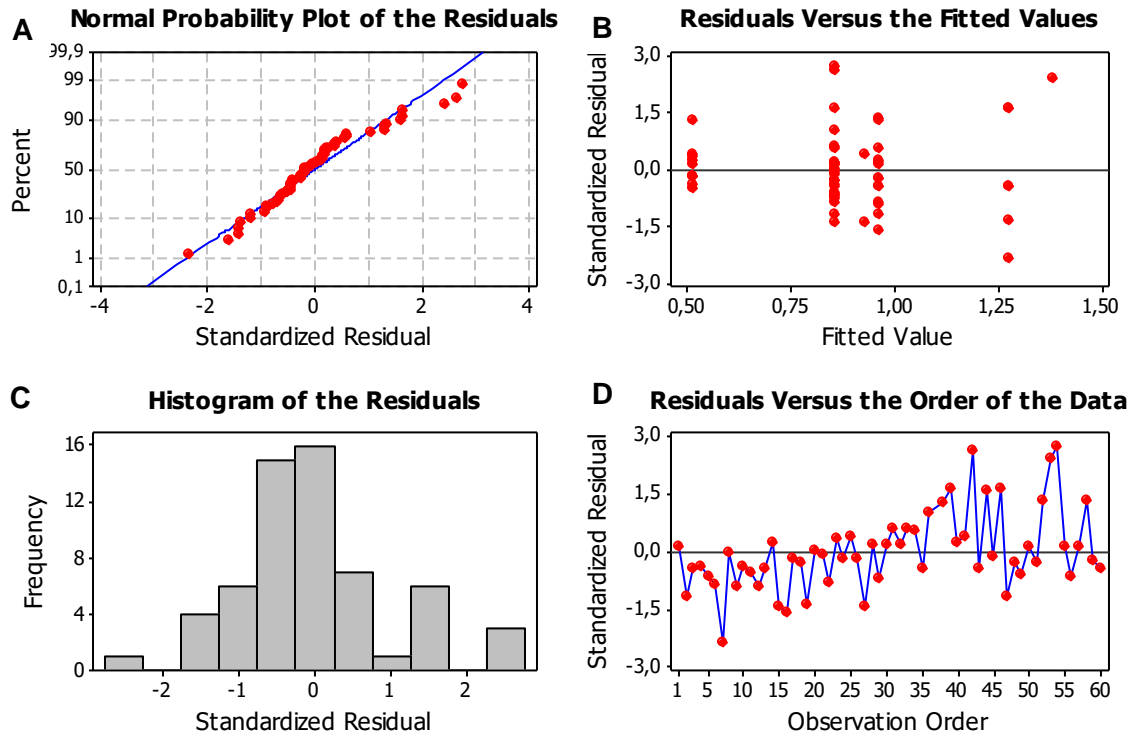


Figura 7. Gráfico dos resíduos do segundo modelo ajustado (n=59)

A. Gráfico de probabilidade normal dos resíduos; B. Resíduos versus valores ajustados; C. Histograma dos resíduos; D. Resíduos versus ordem dos dados.

No terceiro processo de ajuste do modelo multivariado, com a exclusão de MEEM e mantendo as demais variáveis de avaliação de cognição, foram inseridos os itens: tempo do diagnóstico, SAF, infecções, HP LENP, dose acumulada de antimalárico, atenção e cálculo, relógio de Schulman, fluência – animais, orientação espacial, FACIT – Fadiga, grau da ansiedade, grau do estresse e atividade física. As etapas do ajuste do modelo final de regressão linear são apresentadas na tabela 13. Permaneceram no modelo as mesmas características do primeiro modelo: SAF ($IC_{95\%}$ 0,145; 0,718, $p=0,004$), fluência – animais ($IC_{95\%}$ -0,038; -0,003; $p=0,022$) e grau da ansiedade ($IC_{95\%}$ -0,648; -0,114; $p=0,006$).

Tabela 13. Etapas para o ajuste do modelo multivariado de regressão linear (n = 59, terceiro modelo)

Características	Valores-p das etapas do ajuste																	
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI	XVII	XVIII
Tempo do diagnóstico	X	0,480	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	0,532	X	X	X	X	X
SAF	X	0,089	0,064	0,048	0,063	0,044	0,024	0,003	0,004	0,010	0,004	0,010	0,008	0,007	0,004	0,006	0,012	0,007
Infecções (SIM)	X	0,226	0,249	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	0,394	X	X	X	X
HP LENP	X	0,170	0,174	0,239	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	0,239	X	X	X
Antimalárico	X	0,174	0,190	0,201	0,215	0,215	X	X	X	X	X	X	X	X	X	0,387	X	X
Relógio de Schulman	0,072	X	X	X	X	X	X	X	X	0,314	X	X	X	X	X	X	X	X
Fluência - Animais	0,061	0,062	0,053	0,068	0,063	0,035	0,028	0,025	0,022	X	X	X	0,026	0,019	0,021	0,026	0,023	0,043
Atenção e cálculo	0,107	X	X	X	X	X	X	X	X	X	0,105	X	X	X	X	X	X	X
Orientação espacial	0,076	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	0,138	X	X	X	X	X	X
Facit - Figue	X	0,047	0,041	0,042	0,032	0,029	0,044	0,131	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Grau da ansiedade																		
Moderada	X	0,150	0,126	0,071	0,049	0,027	0,032	0,002	0,006	0,014	0,039	0,009	0,010	0,015	0,017	0,005	0,049	0,016
Grave ou muito grave	X	0,898	0,915	0,865	0,807	0,694	0,891	0,611	0,546	0,634	0,282	0,557	0,530	0,467	0,405	0,698	0,458	0,425
Grau do estresse																		
Moderada	X	0,290	0,227	0,199	0,073	0,064	0,078	X	X	X	X	X	X	X	X	X	0,230	X
Grave ou muito grave	X	0,524	0,452	0,352	0,172	0,157	0,206	X	X	X	X	X	X	X	X	X	0,811	X
Atividade física																		
Irregularmente ativo	X	0,998	0,895	0,832	0,787	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	0,778
Sedentário	X	0,147	0,173	0,200	0,355	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	0,344
R² ajustado																		24,6

FACIT: *functional assessment chronic illness therapy*; HP: história progressa; LENP: lúpus eritematoso neuropsiquiátrico;

SAF: síndrome antifosfolípide; X: não incluído na etapa.

No quarto processo de ajuste do modelo multivariado, mantendo apenas atenção e cálculo e excluindo as demais variáveis de avaliação cognitiva, foram inseridos os itens: tempo do diagnóstico, SAF, infecções, história pregressa de LENP, dose acumulada de antimalárico, atenção e cálculo, FACIT – Figueira, grau de ansiedade, grau de estresse e atividade física. As etapas do ajuste do modelo final de regressão linear são apresentadas na tabela 16.

Permaneceram no modelo as características: fadiga e grau do estresse (tabela 14). A cada 10 unidades a mais na fadiga, o comprimento do telômero diminuiu, em média, 0,17 (IC_{95%}: -0,29 a -0,05, p=0,006); os pacientes com grau de estresse moderado apresentaram comprimento relativo do telômero, em média, 0,594 (IC_{95%}: -0,957 a -0,230; p=0,003) menor do que os pacientes sem estresse ou com grau leve e os pacientes com grau de estresse grave ou muito grave apresentaram comprimento relativo do telômero, em média, 0,416 (IC_{95%}: -0,767 a -0,064; p=0,040) menor do que os pacientes sem estresse ou com grau leve.

Tabela 14. Etapas para o ajuste do modelo multivariado de regressão linear (n = 59, quarto modelo)

Características	Valores-p das etapas do ajuste															
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI	
Tempo do diagnóstico	0,465	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
SAF	0,103	0,074	0,082	0,062	X	0,065	0,038	0,074	X	X	X	X	X	X	X	
Infecções (SIM)	0,259	0,285	0,335	X	X	X	X	X	X	0,229	X	X	X	X	X	
HP LENP	0,357	0,376	X	X	X	X	X	X	X	X	0,619	X	X	X	X	
Antimalárico	0,131	0,143	0,147	0,156	X	0,143	X	X	X	X	X	0,100	X	X	X	
Atenção e cálculo	0,194	0,170	0,086	0,111	X	0,078	0,087	X	X	X	X	X	0,182	X	X	
FACIT - Fadiga	0,056	0,051	0,045	0,044	0,006	0,019	0,024	0,013	0,006	0,006	0,008	0,005	0,010	0,018	0,006	
Grau da ansiedade																
Moderada	0,350	0,317	0,276	0,176	X	X	X	X	X	X	X	X	X	0,108	X	
Grave ou muito grave	0,921	0,897	0,928	0,977	X	X	X	X	X	X	X	X	X	0,988	X	
Grau do estresse																
Moderada	0,261	0,199	0,090	0,086	0,002	0,010	0,014	0,008	0,002	0,003	0,006	0,001	0,046	0,020	0,005	
Grave ou muito grave	0,572	0,499	0,335	0,275	0,021	0,140	0,209	0,087	0,021	0,040	0,040	0,012	0,182	0,045	0,040	
Atividade física																
Irregularmente ativo	0,767	0,650	0,578	0,558	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	0,521	
Sedentário	0,084	0,100	0,152	0,163	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	0,132	
R² ajustado																15,9

FACIT: *functional assessment chronic illness therapy*; HP: história progressa; LENP: lúpus eritematoso neuropsiquiátrico; SAF: síndrome antifosfolípide; X: não incluído na etapa.

Após a análise dos resíduos observou-se que o modelo está bem ajustado (figura 8).

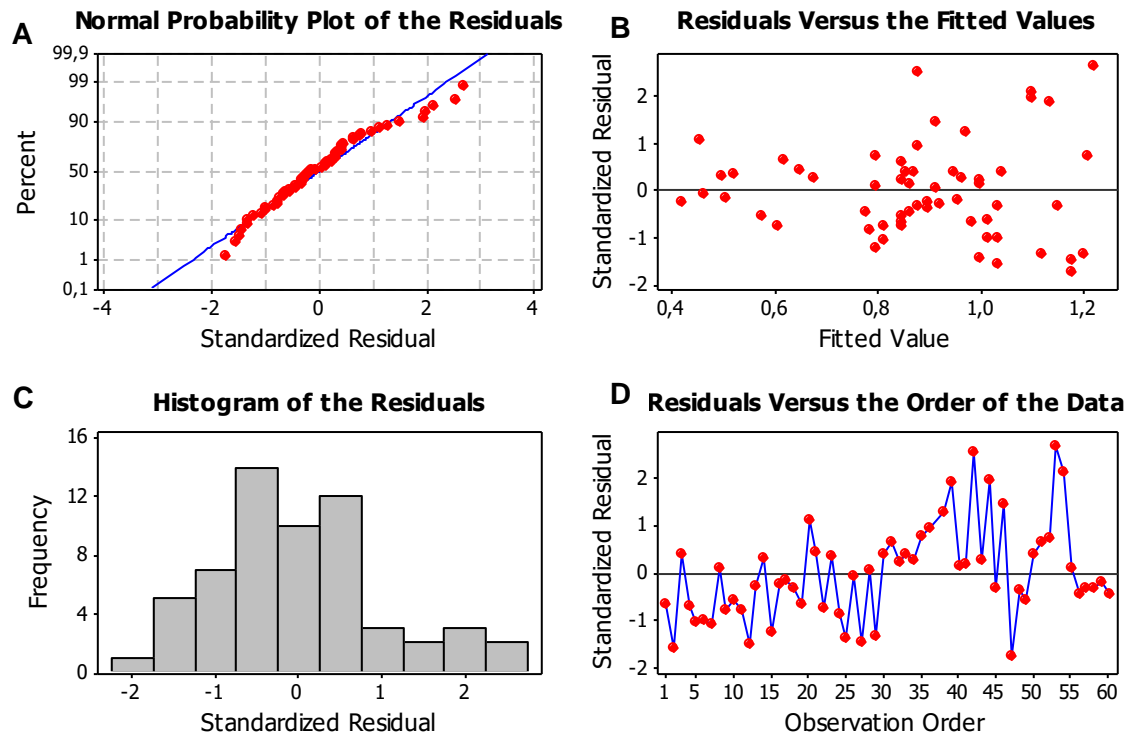


Figura 8. Gráfico dos resíduos do quarto modelo ajustado (n=59)

A. Gráfico de probabilidade normal dos resíduos; B. Resíduos versus valores ajustados; C. Histograma dos resíduos; D. Resíduos versus ordem dos dados.

No quinto processo de ajuste do modelo multivariado, excluindo a característica SAF, foram inseridos os itens: tempo do diagnóstico, infecções, história pregressa de LENP, dose acumulada de antimalárico, MEEM, atenção e cálculo, relógio de Schulman, fluência verbal – animais, orientação espacial, FACIT – Fatigue, grau da ansiedade, grau do estresse e atividade física. As etapas do ajuste do modelo final de regressão linear são apresentadas na tabela 18. Permaneceram no modelo as mesmas características do quarto modelo: fadiga ($IC_{95\%}$: -0,29 a -0,05, $p=0,006$) e grau de estresse ($IC_{95\%}$: -0,957 a -0,230; $p=0,003$) (tabela 15).

Tabela 15. Etapas para o ajuste do modelo multivariado de regressão linear (n = 59, quinto modelo)

Características	Valores-p das etapas do ajuste																		
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI	XVII	XVIII	
Tempo do diagnóstico	X	0,320	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	0,378	X	X	X	X	
Infecções (SIM)	X	0,161	0,183	0,256	0,236	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
HP LENP	X	0,227	0,246	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	0,619	X	X	X	
Antimalárico	X	0,093	0,103	0,117	0,113	0,115	X	X	X	X	X	X	X	X	X	0,100	X	X	
MEEM	0,162	X	X	X	X	X	X	X	X	0,163	X	X	X	X	X	X	X	X	
Relógio de Schulman	0,054	X	X	X	X	X	X	X	X	X	0,364	X	X	X	X	X	X	X	
Fluência - Animais	0,032	0,0900	0,078	0,074	0,040	0,055	0,046	0,070	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Atenção e cálculo	0,769	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	0,182	X	X	X	X	X	X	
Orientação espacial	0,100	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	0,108	X	X	X	X	X	
FACIT - Fatigue	X	0,023	0,019	0,015	0,013	0,012	0,021	0,009	0,006	0,015	0,008	0,010	0,007	0,009	0,008	0,005	0,018	0,006	
Grau da ansiedade																			
Moderada	X	0,240	0,208	0,138	0,086	0,050	0,065	X	X	X	X	X	X	X	X	X	0,108	X	
Grave ou muito grave	X	0,861	0,880	0,817	0,679	0,636	0,880	X	X	X	X	X	X	X	X	X	0,988	X	
Grau do estresse																			
Moderada	X	0,139	0,081	0,024	0,018	0,015	0,018	0,001	0,002	0,003	0,004	0,003	0,001	0,006	0,006	0,001	0,020	0,005	
Grave ou muito grave	X	0,256	0,173	0,069	0,054	0,035	0,048	0,020	0,021	0,072	0,021	0,046	0,016	0,038	0,040	0,012	0,045	0,040	
Atividade física																			
Irregularmente ativo	X	0,879	0,715	0,673	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	0,521	
Sedentário	X	0,122	0,158	0,288	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	0,132	
R² ajustado																			15,9

FACIT: *functional assessment chronic illness therapy*; HP: história progressa; LENP: lúpus eritematoso neuropsiquiátrico;

MEEM: mini exame do estado mental; SAF: síndrome antifosfolípide; X: não incluído na etapa.

Tabela 16. Compilado de modelos multivariados de regressão linear iniciais e finais (n = 59)

Características	Primeiro modelo				Segundo modelo			
	Modelo inicial		Modelo final		Modelo inicial		Modelo final	
	Coef. (IC _{95%})	p	Coef. (IC _{95%})	p	Coef. (IC _{95%})	p	Coef. (IC _{95%})	p
Tempo do diagnóstico	0,007 (-0,012; 0,026)	0,480	–	–	0,008 (-0,012; 0,027)	0,444	–	–
SAF	0,274 (-0,043; 0,591)	0,089	0,432 (0,145; 0,718)	0,004	0,256 (-0,069; 0,581)	0,119	0,418 (0,120; 0,715)	0,007
Infecções (SIM)	-0,135 (-0,357; 0,087)	0,226	–	–	-0,107 (-0,334; 0,120)	0,349	–	–
HP LENP	-0,199 (-0,487; 0,089)	0,170	–	–	-0,159 (-0,467; 0,149)	0,305	–	–
Antimalárico	-4,41E-08 (-1,09E-07; 2,02E-08)	0,174	–	–	-4,89E-08 (-1,15E-07; 1,69E-08)	0,142	–	–
MEEM	*	–	–	–	*	–	–	–
Relógio de Schulman	*	–	–	–	–	–	–	–
Fluência - Animais	-0,017 (-0,035; 0,001)	0,062	-0,021 (-0,038; -0,003)	0,022	–	–	–	–
Atenção e cálculo	–	–	–	–	–	–	–	–
Orientação espacial	*	–	–	–	–	–	–	–
FACIT - Fatigue	-0,013 (-0,026; -0,001)	0,047	–	–	-0,012 (-0,025; 0,001)	0,075	–	–
Grau da ansiedade								
Moderada	-0,231 (-0,549; 0,087)	0,150	-0,381 (-0,648; -0,114)	0,006	-0,164 (-0,493; 0,165)	0,320	-0,344 (-0,620; -0,069)	0,015
Grave ou muito grave	-0,022 (-0,362; 0,318)	0,898	0,075 (-0,174; 0,324)	0,546	0,027 (-0,325; 0,378)	0,879	0,106 (-0,151; 0,364)	0,410
Grau do estresse								
Moderada	-0,222 (-0,639; 0,195)	0,290	–	–	-0,239 (-0,669; 0,19)	0,267	–	–
Grave ou muito grave	-0,124 (-0,514; 0,266)	0,524	–	–	-0,105 (-0,511; 0,301)	0,605	–	–
Atividade física								
Irregularmente ativo	3,07E-04 (-0,312; 0,313)	0,998	–	–	-0,047 (-0,376; 0,281)	0,773	–	–
Sedentário	0,381 (-0,139; 0,901)	0,147	–	–	0,448 (-0,079; 0,974)	0,094	–	–
R² ajustado				26,4				18,4

*: testado, mas não incluído na etapa; -: não incluído na etapa; Coef.: coeficiente; HP: história progressa; FACIT: *functional assessment of chronic illness therapy*; IC: intervalo de confiança; LENP: lúpus eritematoso neuropsiquiátrico; MEEM: mini-exame do estado mental; P: valor-p; SAF: síndrome antifosfolípide.

Tabela 16. Continua...

Características	Terceiro modelo				Quarto modelo			
	Modelo inicial		Modelo final		Modelo inicial		Modelo final	
	Coef. (IC _{95%})	p	Coef. (IC _{95%})	p	Coef. (IC _{95%})	p	Coef. (IC _{95%})	p
Tempo do diagnóstico	0,007 (-0,012; 0,026)	0,480	–	–	0,007 (-0,012; 0,027)	0,465	–	–
SAF	0,274 (-0,043; 0,591)	0,089	0,432 (0,145; 0,718)	0,004	0,267 (-0,056; 0,591)	0,103	–	–
Infecções (SIM)	-0,135 (-0,357; 0,087)	0,226	–	–	-0,129 (-0,355; 0,098)	0,259	–	–
HP LENP	-0,199 (-0,487; 0,089)	0,170	–	–	-0,143 (-0,451; 0,166)	0,357	–	–
Antimalárico	-4,41E-08 (-1,09E-07; 2,02E-08)	0,174	–	–	-5,00E-08 (-1,15E-07; 1,55E-08)	0,131	–	–
MEEM	–	–	–	–	–	–	–	–
Relógio de Schulman	*	–	–	–	–	–	–	–
Fluência - Animais	-0,017 (-0,035; 0,001)	0,062	-0,021 (-0,038; -0,003)	0,022	–	–	–	–
Atenção e cálculo	*	–	–	–	0,043 (-0,023; 0,109)	0,194	–	–
Orientação espacial	*	–	–	–	–	–	–	–
FACIT - Fatigue	-0,013 (-0,026; -0,001)	0,047	–	–	-0,013 (-0,026; 3,29E-04)	0,056	-0,017 (-0,029; -0,005)	0,006
Grau da ansiedade								
Moderada	-0,231 (-0,549; 0,087)	0,150	-0,381 (-0,648; -0,114)	0,006	-0,154 (-0,482; 0,174)	0,350	–	–
Grave ou muito grave	-0,022 (-0,362; 0,318)	0,898	0,075 (-0,174; 0,324)	0,546	0,017 (-0,330; 0,364)	0,921	–	–
Grau do estresse								
Moderada	-0,222 (-0,639; 0,195)	0,290	–	–	-0,241 (-0,668; 0,185)	0,261	-0,594 (-0,957; -0,230)	0,002
Grave ou muito grave	-0,124 (-0,514; 0,266)	0,524	–	–	-0,113 (-0,513; 0,287)	0,572	-0,416 (-0,767; -0,064)	0,021
Atividade física								
Irregularmente ativo	3,07E-04 (-0,312; 0,313)	0,998	–	–	-0,048 (-0,372; 0,276)	0,767	–	–
Sedentário	0,381 (-0,139; 0,901)	0,147	–	–	0,457 (-0,064; 0,978)	0,084	–	–
R² ajustado				26,4				15,9

*: testado, mas não incluído na etapa; –: não incluído na etapa; Coef.: coeficiente; HP: história progressa; FACIT: *functional assessment of chronic illness therapy*; IC: intervalo de confiança; LENP: lúpus eritematoso neuropsiquiátrico; MEEM: mini-exame do estado mental; P: valor-p; SAF: síndrome antifosfolípide.

Tabela 16. Continua...

Características	Quinto modelo			
	Modelo inicial		Modelo final	
	Coef. (IC _{95%})	p	Coef. (IC _{95%})	p
Tempo do diagnóstico	0,01 (-0,01; 0,029)	0,320	–	–
SAF	–	–	–	–
Infecções (SIM)	-0,159 (-0,384; 0,066)	0,161	–	–
HP LENP	-0,178 (-0,471; 0,115)	0,227	–	–
Antimalárico	-5,49E-08 (-1,19E-07; 9,59E-09)	0,093	–	–
MEEM	*	–	–	–
Relógio de Schulman	*	–	–	–
Fluência - Animais	-0,016 (-0,034; 0,003)	0,090	–	–
Atenção e cálculo	*	–	–	–
Orientação espacial	*	–	–	–
FACIT - Fadiga	-0,015 (-0,028; -0,002)	0,023	-0,017 (-0,029; -0,005)	0,006
Grau da ansiedade				
Moderada	-0,189 (-0,51; 0,131)	0,240	–	–
Grave ou muito grave	-0,03 (-0,377; 0,316)	0,861	–	–
Grau do estresse				
Moderada	-0,309 (-0,723; 0,105)	0,139	-0,594 (-0,957; -0,230)	0,002
Grave ou muito grave	-0,218 (-0,601; 0,164)	0,256	-0,416 (-0,767; -0,064)	0,021
Atividade física				
Irregularmente ativo	-0,024 (-0,342; 0,294)	0,879	–	–
Sedentário	0,414 (-0,115; 0,944)	0,122	–	–
R² ajustado				15,9

*: testado, mas não incluído na etapa; –: não incluído na etapa; Coef.: coeficiente; HP: história pregressa; FACIT: *functional assessment of chronic illness therapy*; IC: intervalo de confiança; LENP: lúpus eritematoso neuropsiquiátrico; MEEM: mini-exame do estado mental; P: valor-p; SAF: síndrome antifosfolípide.

5. DISCUSSÃO

Pacientes com LES têm comprimento relativo do telômero menor que controles sem doenças inflamatórias crônicas e imunomediadas, o que foi encontrado em nosso estudo e em estudos publicados previamente^{1; 2; 28; 42; 71}. Este é o primeiro estudo que avalia o comprimento do telômero em pacientes com LES na população brasileira.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre o comprimento do telômero de pacientes com LES de início na idade adulta e LES de início na infância, possivelmente pelo tamanho da amostra de pacientes com LES pediátrico. Também não foi encontrada associação entre o tempo de diagnóstico e o CT, diferente de Bridges e colaboradores, que mostraram que não houve associação entre o diagnóstico na infância e CT mas houve associação inversa entre tempo de diagnóstico e comprimento do telômero quando se comparou os pacientes com lúpus diagnosticado na infância e os diagnosticados na idade adulta².

Discutindo ainda as características de nossa amostra, é importante ressaltar que o pareamento entre os grupos casos e controles foi homogêneo no que tange sexo e idade mas os grupos foram diferentes com significância estatística em relação à classificação étnico-racial e às comorbidades. Como já exposto anteriormente, sabe-se que comorbidades como DM, DAC, tabagismo e obesidade podem interferir no CT e este achado pode ter interferido nos resultados encontrados. Há poucos dados na literatura que discutem comparações interraciais do CT. Ainda não está claro se o CT está relacionado a condições de saúde associadas ao envelhecimento em populações multiétnicas. Brown e colegas demonstraram que o CT está associado a relativamente poucos indicadores de saúde entre brancos e não está associado a indicadores de saúde entre grupos negros ou latinos, sem diferença entre o CT e a etnia⁷².

Na análise de regressão múltipla, foram construídos cinco modelos, com o objetivo de encontrar o melhor modelo que explicasse as relações encontradas na análise univariada, além de minimizar interferências entre as variáveis cognitivas que estivessem inseridas em um mesmo modelo.

Consideramos o segundo modelo aquele que melhor explica estas associações, levando em consideração o fato de o MEEM ter sido o teste cognitivo mais alterado entre todos os avaliados e o achado de que 24 de 60 pacientes (40%) tiveram alterações na avaliação de atenção e cálculo, que se trata de uma subanálise do teste acima referido. Importante ressaltar que o MEEM é um teste de rastreio cognitivo global e, possivelmente, isto implicou o fato dele ser o teste mais alterado entre todos os outros.

Pacientes com SAF apresentaram comprimento do telômero maior que pacientes sem SAF. Não há dados na literatura que respaldem este achado, sendo necessários estudos adicionais, com amostra mais robusta, para avaliar esta associação.

Encontramos uma relação negativa direta entre a presença de sintomas ansiosos e o CT ($p=0,015$), relação já descrita em outros trabalhos, estudando outras populações^{73; 74}. Pousa, em sua metanálise, evidenciou sete estudos com relação negativa entre ansiedade e CT ($n=9.103$ pacientes)⁷³. Darrow e colegas observaram uma forte associação entre doenças psiquiátricas, incluindo estresse pós-traumático, depressão e ansiedade, e telômeros mais curtos⁷⁴. Os mecanismos propostos para esta associação incluem a disfunção mitocondrial e a inativação da telomerase¹³. Estima-se que, aproximadamente 10-25% dos adultos e 25-45% das crianças tenham envolvimento neuropsiquiátrico como manifestação clínica do LES, sendo o humor deprimido o sintoma mais comum⁶. Depressão e a ansiedade geralmente têm impactos importantes na saúde e bem-estar dos pacientes com LES, incluindo aumento da incidência de doenças cardiovasculares, diminuição da qualidade de vida e maior mortalidade⁷⁵. O sofrimento está diretamente relacionado à inflamação e ao estresse oxidativo, condições ligadas ao encurtamento dos telômeros^{16; 73} e também ao LES.

Na população estudada, 61,7% apresentou alteração na triagem cognitiva avaliada através do MEEM. Frequência alta de CD é descrita em diversos estudos^{76; 77; 78; 79}. Inconsistências na prevalência do CD entre os estudos são em grande parte metodológicas, incluindo diferenças entre as amostras estudadas, a utilização de

diferentes testes de avaliação, além da falta de uma definição acerca do termo disfunção cognitiva no LES^{35; 78}. Apesar da alta prevalência relatada, o rastreamento para disfunção cognitiva e uma avaliação cognitiva formal dos pacientes com LES ainda não estão incorporados na prática clínica³⁵ além de não haver uma bateria padrão-ouro. Escolhemos o MEEM como teste de triagem cognitiva por ser rápido e de fácil aplicabilidade. Em nosso estudo, não houve relação entre o CT e a presença de alterações nos testes cognitivos aplicados. No protocolo de avaliação cognitiva as funções executivas não foram avaliadas de forma mais detalhada assim como não houve avaliação neuropsicológica. O que determinou a escolha dos testes cognitivos foi a possibilidade de aplicação pelo médico assistente, como uma tentativa de desenhar um modelo de triagem clínica para encaminhamento ao especialista em neurocognição.

Não encontramos relação entre o comprimento relativo do telômero e atividade de doença, ao contrário do que demonstrou Wu e colegas⁷¹, assim como não encontramos relação com o dano causado pela doença. Haque e colegas encontraram um telômero mais longo em pacientes com LES em uso atual de esteroide, tabagistas e com mais alto IMC, em comparação com controles saudáveis²⁸. Em nosso estudo, não houve associação do CT com as comorbidades estudadas e nem com o tratamento avaliado (anos de uso de antimalárico, doses acumuladas de antimalárico, corticoide e de ciclofosfamida).

Por último, A qPCR é uma das técnicas mais comumente empregadas para análise do comprimento dos telômeros por ter mais simples execução e ser necessário pouco DNA genômico se comparada a outras técnicas, como o TRF por *southern blotting* (SB), fluorescência quantitativa de hibridização *in situ* (Q-FISH e *flow-FISH*) e análise do comprimento único de telômeros (STELA)⁸⁰. Além disso, é uma técnica já padronizada no Laboratório de Medicina Molecular da Faculdade de Medicina da UFMG, onde foram realizados os experimentos. A correlação entre as proporções relativas de T/S medidas por PCR quantitativo e os comprimentos medidos por TRF, considerado padrão-ouro^{21; 22}, reforça a ideia de que o método de qPCR mede com acurácia os comprimentos

relativos dos telômeros³³. É uma técnica, assim como as outras, com limitações. Requer amostras de DNA de alta qualidade (sem degradação) para que sua execução seja possível. Mesmo quando realizado por especialistas, pode haver variação, tanto diferenças na eficiência da amplificação quanto variação na medição entre as alíquotas²². Por ser um experimento que demanda alta pureza da amostra além de concentração adequada de DNA, houve perda de 14% da amostra, embora tenhamos mantido o número de participantes maior que aquele indicado pelo cálculo amostral.

As principais vantagens deste estudo são a inclusão de um número considerável de pacientes e controles, superior ao valor estimado no cálculo amostral, os dados terem sido coletados em uma população adscrita em hospital terciário, com boa qualidade de registro dos dados recuperados dos prontuários médicos e, por fim, a experiência do laboratório na realização da técnica do qPCR para avaliação do CT.

As principais limitações do presente estudo são a pequena representatividade de pacientes com LES pediátrico, comprometendo as análises comparativas entre os dois grupos de pacientes (pediátricos em relação ao LES de início na idade adulta), o desenho transversal do estudo pode ter impactado nos resultados das não associações entre atividade e dano pelo LES no CT. Além disso, no que tange o CD, não foi realizada bateria neuropsicológica e avaliação detalhada de funções executivas. Ressaltamos que o cálculo amostral foi realizado baseado em dados da literatura que compara o comprimento do telômero de pacientes e controles. Não houve um cálculo amostral para comparação das variáveis dos desfechos secundários e o CT, o que pode ter influenciado os resultados encontrados.

Concluindo, este estudo mostrou que pacientes com LES têm telômero mais curto que controles. Além disso, mostrou também que a presença de sintomas ansiosos está relacionada ao encurtamento dos telômeros. É preciso que tenhamos atenção especial para a presença de transtornos de humor em pacientes com LES, o que guarda relação direta com bem-estar, estresse oxidativo e inflamação. Pacientes com LES precisam ter um controle rigoroso da doença e comorbidades, minimizando seu impacto físico e

mental e, conseqüentemente, redução do dano e do aparecimento de novas comorbidades, como as doenças cardiovasculares, as infecções e as neoplasias.

6. ARTIGO

Telomere Length and Its Association with Clinical Characteristics and Cognition in Patients with Systemic Lupus Erythematosus: A Cross-Sectional Study

Anna Carolina F. M. G. Tavares^{1,2}, Maria Aparecida C. Bicalho^{1,4}, Carolina R. F. Santos², Jéssica M. Amaral¹, Ivonne Carolina B. Burgos⁵, Daniela V. F. Rosa⁵, Marco A. Romano-Silva⁵, Débora M. Miranda⁵, Gilda A. Ferreira^{1,2,3}, Adriana M. Kakehasi^{1,2,3}

Authorship affiliations:

¹Post Graduate Program in Sciences Applied to Adult Health Care, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil

²Rheumatology Service, University Hospital, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

³Department of Locomotor System, Faculty of Medicine, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

⁴Department of Clinical Medicine, Faculty of Medicine, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

⁵Neurotec R National Institute of Science and Technology (INCT-Neurotec R), Faculty of Medicine, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, Brazil

Corresponding author: Anna Carolina F. M. G. Tavares

Postal address: Professor Alfredo Balena Avenue, 190, Santa Efigênia District, ZIP Code 30.103-100, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

E-mail Address: annacgtavares@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1920-1115>

Abstract

Objectives: To compare the relative telomere length (TL) in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and controls and to correlate it with clinical characteristics, treatments, disease activity, and damage.

Methods: This cross-sectional study compared adult SLE patients and controls, from 18 to 60 years, matched by sex and age. Clinical and demographic data from all participants were collected, and relative TL was measured by qPCR. Previous and current clinical history, disease activity (SLEDAI-2K), damage (SLICC-DI), cognitive assessment (mini-mental state examination, verbal fluency, Schulman's clock test and CERAD word list), fatigue (FACIT-Fatigue), depression, anxiety, stress symptoms (DASS21), and physical activity (IPAQ-SF) from cases were analyzed. Variables were expressed by frequencies and percentages (qualitative), and mean or median and standard deviation (quantitative). Student's t or Mann-Whitney tests evaluated comparisons and Spearman's coefficient, the correlations (p -value $\leq 0,05$).

Results: Sixty SLE patients and 55 controls were included. SLE patients had a median TL of 0.80 versus 1.07 in the control group ($p=0.005$), even after adjustments for comorbidities. SLE patients with moderate anxiety symptoms had lower TL ($p=0.015$) when compared to patients without or with low-grade anxiety symptoms. An unexpected result was the longer telomere in patients with antiphospholipid syndrome (APS) patients compared to patients without APS ($p=0.007$). There was no association with disease activity or damage.

Conclusions: Brazilian SLE patients presented shorter telomeres than controls. Relative TL in SLE patients was associated with anxiety symptoms and APS. Longitudinal studies are essential to evaluate clinical implications related to TL.

Keywords: systemic lupus erythematosus; telomere; telomere shortening; senescence; aging.

Rheumatology key messages

- . SLE patients have shorter telomeres when compared to individuals without chronic inflammatory immune-mediated diseases.
- . Telomere shortening is probably related to anxiety symptoms in SLE, which have already been described in other populations.
- . A longer TL was observed in APS patients.

Introduction

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic autoimmune inflammatory disease with a diverse clinical phenotype. It is characterized by hyperactivation of B cells, deposition of immune complexes, excess of pathogenic autoantibodies, and multiorgan damage (1, 2).

Chronic immune activation can accelerate the immunosenescence and remodel the immune system. Many similarities are found between aging and SLE-related senescence. The immune cell repertoire changes and includes decreased naïve T cells and oligoclonal expansion of memory T cells (3-6). Analysis of senescence biomarkers in patients with SLE demonstrates an increase in the subpopulation of senescent T lymphocytes (CD4⁺CD28⁻). Additionally, in a cohort of patients with SLE, an association between CD4⁺CD28⁻ cells and ocular, kidney, peripheral vascular, and cardiovascular damages, as well as early gonadal failure was found (7).

Other markers of cellular senescence, such as increased cellular turnover, increased production of reactive oxygen species mediated by mitochondrial dysfunction, and production of pro-inflammatory cytokines, are present in SLE (8, 9).

Telomeres are protein complexes located at the top of each arm of chromosomes, essential for maintaining genome stability. In mammals, they comprise highly conserved DNA sequences (TTAGGG)_n (10, 11), but TL is not only genetically determined. Age, oxidative stress, inflammation, immune response to inflammation, smoking, alcoholism, obesity, and high cell replication are external factors that interfere with telomere erosion (12-15). Inflammation also contributes to telomere erosion by increasing cell turnover and interfering with telomerase's action (10).

Telomere shortening has been described in SLE patients (16, 17). In a meta-analysis, Lee et al. showed the difference between the TL of patients with SLE and controls (2). Bridges et al. compared the TL of patients with childhood SLE and adulthood SLE and demonstrated a more pronounced shortening in more prolonged disease (18). Haque et al. described shorter telomeres in SLE patients when compared to healthy individuals. Factors related to shorter TL were the presence of anti-Ro, current use of corticosteroids, and increased body mass index. Smoking and atherosclerotic plaques in carotid arteries were associated with longer TL. There was no correlation of TL with disease activity and damage (19).

Although the telomere shortening described in SLE, data on its relationship with clinical outcomes and treatments must be better studied. Telomeres are considered markers of cellular senescence, but defining their length as a biomarker of mortality or damage in SLE requires longitudinal evaluation.

The main objective of this study was to compare the relative TL of patients with SLE to the control group. The association of the relative TL with clinical and treatment parameters of SLE was also assessed.

Methods

Patients

This is a cross-sectional study in which SLE patients, according to the classification criteria of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics (SLICC) 2012 (20) and the European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology (EULAR/ACR) 2019 (21) aged 18 to 60 years, were matched by gender and age. Controls were patients' relatives without known chronic immune-mediated inflammatory diseases in addition to the exclusion criteria mentioned below. Participants were selected consecutively between February and October of 2022.

Exclusion criteria were acute or chronic infections, pregnant and nursing women, patients undergoing renal replacement therapy, cirrhosis, bone marrow or solid organ transplanted patients, non-rheumatic immune-mediated inflammatory diseases, patients with central nervous system (CNS) structural damage and overlap syndromes, except antiphospholipid syndrome (APS) and secondary Sjögren syndrome.

In a single visit, clinical and demographic data were collected from all research participants through interviews and medical records review (of the patients), and these data were stored in the REDCap database (Research Electronic Data Capture, <https://project-redcap.org>). Ethnic-racial classification and years of schooling were self-declared data, as defined by the Brazilian Institute of Geography and Statistics (22). A whole blood sample was collected from each participant.

The Ethics and Research Committee of the Federal University of Minas Gerais has approved the research protocol and written informed consent has been obtained from the subjects (or their legally authorized representative).

Clinical Assessment

Demographic characteristics (sex, age, ethnic-racial classification, years of schooling), anthropometric measures (weight and body mass index - BMI), and comorbidities, including smoking and alcohol intake and neoplasms, were evaluated from all participants. Clinical data from patients were also evaluated: duration (in years) of use of antimalarials, accumulated doses of antimalarials, glucocorticoids and cyclophosphamide; disease activity by the modified Systemic Lupus Disease Activity Index 2000 (SLEDAI-2K) (23); damage by Systemic Lupus International Collaborating Clinics / American College of Rheumatology Damage Index (SLICC/ACR - DI) (24); previous history of nephritis and neuropsychiatric lupus (NPSLE); association with APS; previous history of infections (number of severe infections since diagnosis and hospitalizations). Cognitive impairment was assessed by the mini-mental state examination (MMSE) (25), verbal fluency test (26), Schulman clock test (27), and Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD) word list (28). Authors assessed the presence of depressive, anxiety, and stress symptoms by the Depression Anxiety Stress Scale (DASS21) (29), fatigue was evaluated by the Functional Assessment Chronic Illness Therapy – Fatigue Scale (FACIT – Fatigue)

(30), the practice of physical activity by the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ) (31, 32).

Patients were considered in clinical remission when they fulfilled the Definitions of Remission in SLE (DORIS) criteria (33). Patients with SLEDAI ≤ 4 without renal, CNS, cardiopulmonary, and vasculitis activity – and hemolytic anemia or gastrointestinal tract activity and new activity since the last evaluation and current daily dose of prednisone (or equivalent) ≤ 7.5 mg and stable doses of immunosuppressant were considered in low disease activity (LDA) (34). Patients with persistent chronic activity were those active for more than six months and did not meet LDA criteria. Patients with new clinical or laboratory manifestations of the disease or worsening of activity in the last six months were considered to be exacerbating.

Laboratory Evaluation

A total blood sample of the patients was collected for dosages of anti-double strands DNA antibody through indirect immunofluorescence using the *Crithidia lucilliae* antigen, C3, and C4 complement fractions through the turbidimetry method and for extraction of genomic DNA by saline method and subsequent evaluation of relative TL through qPCR. The procedures are described below.

Extraction of genomic DNA

DNA was extracted using the saline method, described by Lahiri and Numberger (1991) (35), modified by Cavalli et al. (1996) (36) and Salazar et al. (1998) (37). Then, the samples were stored at 4°C.

DNA samples were quantified, and evaluation of the DNA quality was performed using the NanoDrop™ 2000/2000c (ThermoScientific®, Waltham, MA, USA) at the absorbance ratios 260/280 and 260/230 and the concentration adjusted for the qPCR technique.

We applied the Real-time Polymerase Chain Reaction (qPCR) technique, following the technique to analyze the relative length of telomeres described by Cawthon (38). This technique is based on determining the mean cycle thresholds (Cts), or cycle threshold value, which corresponds to the cycle number in which the fluorescence generated within a reaction exceeds the fluorescence threshold.

DNA samples were standardized to a final concentration of 75ng in 20µl, each analyzed in triplicate. For each plate, three negative controls were included to detect the presence of contamination due to handling error (no sample control - NTC), controls without primers, and Taq DNA polymerase (NPC).

Statistical Analysis

Results were obtained using frequencies and percentages for qualitative characteristics and measures of central tendency (mean and median) and dispersion (standard deviation) for quantitative ones. Comparisons of relative TL and other variables were performed

using the t-Student test when assumptions of normality and homoscedasticity were satisfied and the Mann-Whitney test otherwise. Normality was assessed using the Shapiro-Wilk test, and homoscedasticity was assessed using the Levene test. Comparisons between sexes and groups were performed using the two-proportion test.

The sample calculation was based on previous data from the literature, a study that evaluated TL in patients with SLE and healthy controls (16), considering $\alpha=5\%$ and $\beta=80\%$ (n cases = 51; n controls = 51).

For the univariate analysis, a linear regression model adjustment was performed between each of the characteristics of interest (sample characterization, comorbidities, previous history of nephritis and NPSLE, accumulated doses, disease activity, damage, cognition, fatigue, depression, anxiety, stress, and physical activity) and the response variable "relative TL."

Characteristics with a p-value of less than 0.25 in the univariate analysis were included in the adjustment process of the initial multivariate model (stepwise backward method). Characteristics with statistical significance remained in the final model (p-value ≤ 0.05). The adequacy of the linear regression model was evaluated from the residual analysis. The degree of depression, anxiety, and stress, as well as physical activity, had categories grouped for these analyses.

Correlations were evaluated based on the calculation of Spearman's correlation coefficient.

Analyzes were performed using R version 3.6.3 and MINITAB programs. A significance level of 5% was considered.

Results

Sample characteristics

Sixty SLE patients and 55 controls were included. In the case group, 45 (75%) were diagnosed in adulthood and 15 (25%) under 18 years, with a mean disease duration (SD) of 12 (5.8) years; 52 (86.7%) were female, with a mean age of 37 (11.5) years (Table 1). Among controls, 48 (87.3%) were female, with a mean age of 38 (10.5) years. Thirty-five (56.7%) patients had more than two comorbidities, and 49 (89.1%) controls had no comorbidities. There was no statistical difference between groups regarding sex and age (p=0.923 and p=0.737, respectively), but the groups were different considering comorbidities (p<0.005), as shown in Table 1 with other sample characteristics.

Table 1. Demographic and clinical characteristics of 60 patients with systemic lupus erythematosus and 55 controls

Characteristics	Cases (n=60)	Controls (n=55)	p-value
Sample, n (%)			
	<i>Pediatric</i> 15 (25)	-	-
	<i>Adulthood</i> 45 (75)	-	-
Sex, n (%)			0.924*
	<i>Female</i> 52 (86.7)	48(87.3)	-
Age (years), mean (SD) / median (minimum–maximum)	37 (11.5) / 35 (19-60)	38 (10,5) / 37 (18-60)	0.737**
Ethnic-racial classification, n (%)			0.026*
	<i>White</i> 17 (28.3)	10 (18.2)	-
	<i>Black</i> 14 (23.3)	9 (16.4)	-
	<i>Brown</i> 28 (46.7)	29 (52.7)	-
	<i>Yellow</i> 0 (0)	7 (12.7)	-
	<i>Indigenous</i> 1 (1.7)	0 (0)	-
Years of schooling, n (%)			0.855*
	<i>One to 3</i> 3 (5)	0 (0)	-
	<i>Four to 7</i> 8 (13.3)	11 (20.4)	-
	<i>Eight to 10</i> 5 (8.4)	6 (11.1)	-
	<i>Eleven to 14</i> 36 (60)	24 (44.4)	-
	<i>Fifteen or more</i> 8 (13.3)	13 (24.1)	-
Anthropometric data, mean (SD) / median (minimum-maximum)			
	<i>Weight</i> 73.04(17.19) /69(44-139)	71.29(14.00)/ 72(40-105)	0.552**
	<i>BMI, Kg/m²</i> 28.03 (6.31) / 28 (17-51)	27.48 (5.36) / 28 (17-46)	0.620**
Comorbidities, n (%)			<0.005*
	<i>None</i> 25 (41.7)	49 (89.1)	-
	<i>Up to 2</i> 35 (58.3)	6 (10.6)	-
	<i>Three or more</i> 3 (5)	0 (0)	-
Comorbidities, n (%)			
	<i>Obesity</i> 18 (30)	15 (27.3)	-
	<i>Hypertension</i> 13 (21.7)	5 (9.1)	-
	<i>Dyslipidemia</i> 11 (18.3)	1 (1.8)	-
	<i>Diabetes mellitus</i> 6 (10)	2 (3.6)	-
	<i>Smoking</i> 6 (10)	3 (5.5)	-
	<i>COPD</i> 3 (5)	0 (0)	-
	<i>CKD</i> 2 (3.3)	0 (0)	-
	<i>Alcoholism</i> 1 (1.7)	0 (0)	-
	<i>Neoplasm***</i> 1 (1.7)	0 (0)	-

Table data are presented as n (%), mean (SD), and median (minimum and maximum values). BMI: body mass index; CKD: chronic kidney disease; cm: centimeters; COPD: chronic lung disease; kg: kilograms; m²: meter squared; SD: standard deviation.

*U of Mann-Whitney; **T-Test; ***Carcinoma in situ of the vulva

Thirty-nine (65%) patients were in remission or LDA, 8 (13.3%) had persistent chronic activity for 21 months on average, and 12 (20%) had active nephritis, and mean SLEDAI-2K of 4. Regarding treatment, 36 (60%) were in a stable dose of immunosuppressant for at least six months. Twenty-seven (45.0%) patients had severe and opportunistic infections during the disease, with 16 (26.7%) patients requiring hospitalization (Table 2).

Table 2. Clinical characteristics of 60 patients with systemic lupus erythematosus

Characteristics	
Diagnosis	
Disease duration*, mean (SD) / median (minimum-maximum)	12 (5.8) / 11 (1-27)
Disease duration*, n (%)	
	<i>Up to five years</i> 9 (15)
	<i>Six to ten years</i> 20 (33.3)
	<i>More than ten years</i> 31 (51.7)
Age at diagnosis*, mean (SD) / median (minimum-maximum)	25 (10.1) / 22 (6-53)
Age at onset of symptoms*, mean (SD) / median (minimum-maximum)	24 (11.2) / 23 (6-52)
APS, n (%)	9 (15)
Gestational event	2 (3.3)
Venous event	9 (15)
DVT	8 (13.3)
PTE	2 (3.3)
Infections, n (%)	27 (45)
<i>Number of infections/patient, mean (SD) / median (minimum-maximum)</i>	0.78 (1.26) / 0 (0-6)
Hospitalizations per infection	16 (26.7)
<i>Number of hospitalizations/patient, mean (SD) / median (minimum-maximum)</i>	0.32 (0.46) / 0 (0-5)
Previous history, n (%)	
Mucocutaneous involvement	50 (83.3)
Joint involvement	49 (81.7)
Cardiopulmonar involvement	18 (30)
Nephritis	31 (51.7)
	<i>Number of episodes, mean (SD) / median (minimum-maximum)</i> 1.4 (0.66) / 1 (1-3)
	<i>Age at first episode*, mean (SD) / median (minimum-maximum)</i> 31 (9.5) / 30 (13-50)
	<i>Time since the first episode*, mean (SD) / median (minimum-maximum)</i> 8 (6.16) / 8 (1-25)
NPSLE	14 (23.3)
	<i>Number of episodes, mean (SD) / median (minimum-maximum)</i> 0.3 (0.61) / 1 (0,6)
	<i>Age at first episode*, mean (SD) / median (minimum-maximum)</i> 23 (9.46) / 22 (6-40)
	<i>Time since the first episode*, mean (SD) / median (minimum-maximum)</i> 8 (4.15) / 7 (2-16)
Hematological involvement	48 (80)
Cutaneous vasculitis	17 (28.3)
Current history, n (%)	
Mucocutaneous involvement	5 (8.3)
Joint involvement	5 (8.3)
Cardiopulmonar involvement	7 (11.7)
Nephritis	12 (20)
NPSLE	0 (0)
Cutaneous vasculitis	0 (0)
Disease activity	
Clinical remission, n (%)	35 (58.3)
	<i>Duration**, mean (SD) / median (minimum-maximum)</i> 38 (37.8) / 20 (3-129)
LDA, n (%)	4 (6.7%)
	<i>Duration**, mean (SD) / median (minimum-maximum)</i> 12 (12.8) / 9 (0-30)
Exacerbation, n (%)	13 (21.7)
Persistent chronic activity, n (%)	8 (13.3)
	<i>Duration**, mean (SD) / median (minimum-maximum)</i> 21 (20.4) / 12 (2-65)
SLEDAI-2K, mean (SD) / median (minimum-maximum)	
	<i>At diagnosis</i> 11 (6.1) / 10 (2-25)
	<i>In baseline</i> 4 (4.14) / 2 (0-18)

Table 2. Continue

PGA	0.25 (0.55) / 0 (0-2)
Damage	
SLICC-DI, mean (SD) / median (minimum-maximum)	1 (1.55) / 1 (0-6)
C3^{***}, mean (SD) / median (minimum-maximum)	104 (30) / 106 (31-172)
C4^{***}, mean (SD) / median (minimum-maximum)	20 (12) / 17 (2-54)
Anti-native DNA positivity, n (%)	31 (51.7)
Previous treatment, n (%)	
	<i>Antimalarials</i> 60 (100)
	<i>Prednisone</i> 60 (100)
	<i>Azathioprine</i> 44 (73.3)
	<i>Cyclophosphamide</i> 42 (70)
	<i>Methylprednisolone</i> 36 (60)
	<i>Methotrexate</i> 29 (48.3)
	<i>Cyclosporine</i> 19 (31.7)
	<i>Mycophenolate</i> 16 (26.7)
	<i>Rituximab</i> 7 (11.7)
	<i>Intravenous Human Immunoglobulin</i> 6 (10)
	<i>Dapsone</i> 4 (6.7)
	<i>Leflunomide</i> 3 (5)
	<i>Thalidomide</i> 1 (1.7)
	<i>Belimumab</i> 1 (1.7)
Current treatment, n (%)	
	<i>Antimalarials</i> 45 (75)
	<i>Prednisone ≤ 7,5 mg</i> 17 (28.3)
	<i>Azathioprine</i> 12 (20)
	<i>Mycophenolate</i> 12 (20)
	<i>Cyclosporine</i> 11 (18.3)
	<i>Methotrexate</i> 11 (18.3)
	<i>Prednisone > 7,5 mg</i> 11 (18.3)
	<i>Rituximab</i> 4 (6.7)
	<i>Cyclophosphamide</i> 3 (5)
	<i>Dapsone</i> 1 (1.7)
	<i>Leflunomide</i> 1 (1.7)
	<i>Thalidomide</i> 1 (1.7)
	<i>Belimumab</i> 0 (0)
Stable immunosuppressant for at least six months	36 (60)
None immunosuppressant	2 (3.3)
Accumulated doses, mean (SD) / median (minimum-maximum)	
	<i>Antimalarials*</i> 10 (5.71) / 9 (1-26)
	<i>Antimalarials****</i> 1.266.205 (1.649.784) / 990.737 (244.626-12.778.589)
	<i>Corticosteroids****</i> 44.809 (33.516,47) / 37.088 (3.600-202.522)
	<i>Cyclophosphamide****</i> 6.216 (5618.68) / 6.600 (800-23.600)

Table data are presented as n (%), mean (SD), and median (minimum and maximum values). APS: antiphospholipid syndrome; dl: deciliter; DVT: deep venous thrombosis; LDA: low disease activity; mg: milligrams; NPSLE: neuropsychiatric systemic lupus erythematosus; PGA: Physician Global Assessment; PTE: pulmonary thromboembolism; SD: standard deviation; SLEDAI-2K: Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index – 2000; SLICC-DI: Systemic Lupus International Collaborating Clinics – Damage Index.

*in years; **in months; ***in mg/dl; ****in mg

Thirty-seven (61.7%) patients had cognitive dysfunction, according to MMSE. Thirty-eight (63.3%) patients had at least one altered cognitive test. Regarding the presence of symptoms of depression, anxiety, and stress, 25 (41.6%) patients had depression symptoms from moderate to very severe grade; 12 (20%) patients had a moderate grade of anxiety symptoms, and 15 (25%), severe to very severe grade. Thirty-three (55%) patients had some degree of stress, ranging from mild to very severe. 45 (75%) patients were classified as active, considering IPAQ-SF (Table 3).

Table 3. Cognitive assessment, fatigue, depression, anxiety and stress and physical activity of 60 patients with SLE

Characteristics	
MMSE, n (%), mean (SD), median (minimum-maximum)	37 (61.7) / 26 (2.67) / 27(19-30)
Attention and calculation, n (%)	24 (40) / 3 (1.79) / 3 (0-5)
General cognition, n (%)	13 (21.7)
Spatial orientation, n (%)	2 (2.7)
Verbal fluency test, n (%)	9 (15)
Animals, mean (SD), median (minimum-maximum)	18 (5.93) / 18 (9-35)
Fruits, mean (SD), median (minimum-maximum)	15 (4.38) / 15 (8-27)
Shulman clock test, n (%), mean (SD), median (minimum-maximum)	15 (25) / 3 (1.32) / 4 (0-5)
CERAD word list, n (%), mean (SD), median (minimum-maximum)	
Three tries	15 (25) / 19 (3.68) / 19 (10-26)
Evocation	12 (20) / 6 (2.22) / 6 (2-10)
Words recognition	1 (1.7) / 9 (1.43) / 9 (5-10)
Altered tests*, n (%)	38 (63.3)
FACIT – Fatigue, mean (DP), median (minimum-maximum)	36 (12.47) / 38 (2-52)
DASS21, mean (SD), median (minimum-maximum)	42 (34.18) / 36 (0-42)
Depression, mean (SD), median (minimum-maximum)	15 (14) / 12 (0-42)
Grade of severity, n (%)	
Normal	27 (45)
Mild	8 (13.3)
Moderate	8 (13.3)
Severe and very severe	17 (28,4)
Anxiety, mean (SD), median (minimum-maximum)	11 (10.9) / 8 (0-40)
Grade of severity, n (%)	
Normal	29 (48.3)
Mild	4 (6.7)
Moderate	12 (20)
Severe and very severe	15 (25)
Stress, mean (SD), median (minimum-maximum)	16 (12.2) / 14 (0-42)
Grade of severity, n (%)	
Normal	27 (45)
Mild	12 (20)
Moderate	7 (11.7)
Severe and very severe	14 (23.3)
Physical activity	
Very active	4 (6.7%)
Active	45 (75%)
Irregularly active	8 (13.3%)
Sedentary	3 (5%)

Table data are presented as n (%), mean (SD), and median (minimum and maximum values). DASS: Depression Anxiety Stress Scale; FACIT: Functional Assessment of Chronic Illness Therapy; MMSE: mini-mental state examination; SD: standard deviation; SLE: systemic lupus erythematosus. *At least one altered cognitive test.

Relative TL

SLE patients had a median relative TL of 0.80, while controls had a median of 1.07. Controls had a median TL 0.27 greater than cases (95% CI: 0.07 to 0.38; $p=0.005$). There was no difference between the TL of patients with childhood-onset SLE and those in adulthood. Comparisons of relative TL are presented in Table 4 and illustrated in Figure 1.

Table 1. Comparisons of relative telomere length between patients and controls

Characteristics	Cases (n = 60)	Controls (n = 55)	p-value
TL, mean (SD), median	0.91 (0.51) / 0.80 (0.29-2.94)	1.10 (0.45) / 1.07 (0.38-2.32)	0.005*
Cases comparison			
Childhood-onset SLE	0.83 (0.45) / 0.70 (0.33-1.95)	-	0.591*
Adulthood-onset SLE	0.93 (0.54) / 0.82 (0.29-2.94)	-	

Table data are presented as n (%), mean (SD), and median (minimum and maximum values). SD: standard deviation; SLE: systemic lupus erythematosus; TL: telomere length. *U of Mann-Whitney

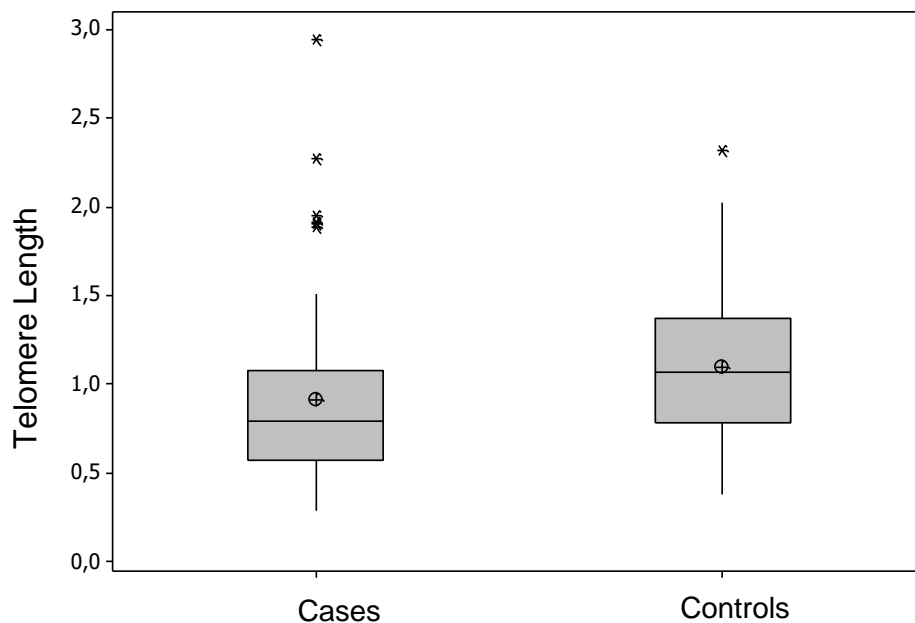


Figure 1. Box-plot representing the distribution of relative telomere length of patients with systemic lupus erythematosus compared to controls

Univariate and multivariate regression models

The most extreme outlier (TL=2.94) was excluded after evaluating the (non-normal) residues. Variables with p-values lower than 0.25 were indicated to compose the multivariate linear regression models.

All univariate analysis and residue evaluation data are available in the Supplementary material.

Variables with p-values lower than 0.25 in the univariate analysis were indicated to compose the multivariate linear regression models.

The first multivariate linear regression model was adjusted to evaluate the simultaneous effects of variables group (SLE vs. control), ethnic-racial classification, and comorbidities of the whole study population (114 participants) (predictor variables) on the relative TL outcome (dependent variable) (Table 5). The final model is composed only of the case group. SLE patients have a relative TL of 0.264 (CI 95% -0.432 to -0.096, $p=0.002$) lower than controls.

In the second multivariate linear regression model, maintaining just MMSE and excluding other cognitive characteristics, the following variables were inserted in the initial model: time since diagnosis, APS, infections, previous history of NPSLE, accumulated dose of antimalarials, MMSE, FACIT – Fatigue, degree of anxiety and stress symptoms and physical activity. APS (CI 95% 0.120; 0.715; $p=0.010$) and degree of anxiety (CI 95% -0.620; -0.069; $p=0.030$) remained in the final model (Table 6).

Patients with APS had a relative TL of 0.432 (CI 95% 0.145 to 0.718; $p=0.004$) longer than patients without APS; patients with a moderate degree of anxiety symptoms had a relative TL of 0.381 (CI 95% -0.648 to -0.114; $p=0.006$) shorter than patients without anxiety or with a mild degree. For patients with severe or very severe anxiety symptoms, no statistically significant difference was observed in the relative TL when compared to patients without anxiety or with mild degree ($p\text{-value}=0.546$).

Table 5 – Multivariate linear regression model for relative telomere length outcome (first model, $n = 114$)

Characteristics	Adjustment			
	Initial model		Final model	
	Coef. (CI _{95%})	p	Coef. (CI _{95%})	p
SLE patients	-0.182 (-0.386; 0.023)	0.081	-0.264 (-0.432; -0.096)	0.002
Ethnic-racial classification				
White	0.084 (-0.126; 0.294)	0.427	–	–
Black	0.097 (-0.129; 0.323)	0.397	–	–
Others	0.330 (-0.012; 0.672)	0.059	–	–
Comorbidities	-0.116 (-0.322; 0.089)	0.265	–	–
Adjusted R ²				8,3

Coef: coefficient; CI: confidence interval.

Table 6. Multivariate linear regression model for relative telomere length outcome (second model, n=59)

Characteristics	Initial model		Final model	
	Coef. (CI _{95%})	p	Coef. (CI _{95%})	p
Time of diagnosis	0.008 (-0.012; 0.027)	0.444	–	–
APS	0.256 (-0.069; 0.581)	0.119	0.418 (0.120; 0.715)	0.007
Infections	-0.107 (-0.334; 0.120)	0.349	–	–
NPSLE	-0.159 (-0.467; 0.149)	0.305	–	–
Antimalarials – accumulated dose	-4.89E-08 (-1.15E-07; 1.69E-08)	0.142	–	–
MMSE	0.024 (-0.021; 0.068)	0.288	–	–
FACIT – Fatigue	-0.012 (-0.025; 0.001)	0.075	–	–
Anxiety				
<i>Moderate</i>	-0.164 (-0.493; 0.165)	0.320	-0.344 (-0.620; -0.069)	0.015
<i>Severe or very severe</i>	0.027 (-0.325; 0.378)	0.879	0.106 (-0.151; 0.364)	0.410
Stress				
<i>Moderate</i>	-0.239 (-0.669; 0.19)	0.267	–	–
<i>Severe or very severe</i>	-0.105 (-0.511; 0.301)	0.605	–	–
Physical activity				
<i>Irregularly active</i>	-0.047 (-0.376; 0.281)	0.773	–	–
<i>Sedentary</i>	0.448 (-0.079; 0.974)	0.094	–	–
Adjusted R ²				18.4%

APS: antiphospholipid syndrome; Coef: coefficient; FACIT: functional assessment chronic illness therapy; IC: confidence interval; MMSE: mini-mental state exam; NPSLE: neuropsychiatric systemic lupus erythematosus.

Discussion

In our study, patients with SLE have a shorter relative TL than controls without immune-mediated inflammatory diseases. This is in agreement with previous studies (2, 16, 19) but it is the first study evaluating TL in Brazilian SLE patients and its association with clinical parameters as mood disorders and cognitive function.

There was no statistically significant difference between the TL of patients with adult-onset SLE and childhood-onset SLE, possibly due to the sample size of pediatric SLE patients. No association was found between the time of diagnosis and TL, unlike Bridges and collaborators (18), that showed an inverse association between the time of diagnosis and TL when comparing patients with childhood-onset lupus and those diagnosed in adulthood.

It is essential to highlight that there were no differences between groups regarding sex and age, but the groups were different concerning ethnic-racial classification and comorbidities. SLE patients had smaller TL even after adjustments for comorbidities in the first multivariate linear regression model. Little data discusses interracial comparisons of TL. Whether TL is related to health conditions associated with aging in a multiethnic population remains unclear. Brown and colleagues demonstrated that TL is associated with relatively few health indicators among whites and is not associated with health indicators among black or Latino groups, with no association between TL and ethnicity (39). The Brazilian population has mixed genetic background, and our results regarding the difference between groups in terms of ethnic-racial classification should be viewed with caution as they were self-reported.

In the multiple regression analysis, we found a direct negative relationship between anxiety symptoms and TL, which was already described in other studies evaluating other populations (40, 41). Pousa showed seven studies (n=9,103) with a negative relationship between anxiety and TL (40). Darrow and colleagues observed a strong association between psychiatric illnesses, including post-traumatic stress, depression, and anxiety, and shorter telomere length (41). It is estimated that 10-25% of adults and 25-45% of children have neuropsychiatric symptoms as a manifestation of SLE, and depressed mood is the most common one (42). Depression and anxiety usually have relevant impacts on SLE patients' health and well-being, including higher incidence of cardiovascular disease, low quality of life, and higher mortality (42). Emotional suffering is directly related to inflammation and oxidative stress, conditions linked to telomere shortening (10, 40) and SLE. Although the logistic regression model showed a relationship between the presence of anxious symptoms and telomere shortening, it is not possible to state a cause-effect relationship.

Furthermore, patients with APS had longer telomeres than patients without APS. No data in the literature supports this finding, requiring additional studies with a more robust sample to evaluate this association.

In the studied sample, 61.7% had altered cognitive function evaluated through the MMSE. It is a screening test to detect cognitive impairment. As a clinical tool, it can be used to detect cognitive losses, to follow-up diseases, and monitor treatment response (25). A high frequency of cognitive impairment in SLE is described in several studies (42-46). Inconsistencies in the prevalence of cognitive dysfunction among studies are primarily methodological, including samples, different assessment tests, and lack of a clear definition of cognitive dysfunction in SLE (43, 46). Despite the high reported prevalence, screening for cognitive dysfunction is not incorporated into clinical practice, and there is no definition of a gold standard cognitive battery (46). In our study, there was no relationship between TL and alterations in the cognitive tests.

We found no relationship between relative TL and disease activity, unlike Wu et al. (17) and damage. Haque and colleagues found a longer telomere in patients on current steroid use, smokers, and with higher BMI compared to healthy controls (19). Our study showed no association between TL and comorbidities or previous treatment. We chose antimalarials, glucocorticoids, and cyclophosphamide to study the relative TL because they are commonly used in SLE patients' treatment and related to damage, a clinical outcome of interest. Also, there was no relationship between disease duration and relative TL, unlike Bridges and colleagues, who showed an inverse association between diagnosis time and TL when comparing childhood-onset lupus versus adulthood-onset (18).

The main limitation of the present study is the small representation of patients with pediatric SLE, compromising the comparative analyses between the two groups of patients. Furthermore, the cross-sectional design of the study may have impacted the results of the lack of associations between activity and SLE damage in TL. Regarding the CD, a neuropsychological battery and a detailed assessment of executive functions were not performed. We emphasize that the sample size calculation was based on literature data that compared the TL of patients and controls. There was no sample size calculation to compare the secondary outcomes to TL, which may have influenced the results.

The main advantages of this study are the inclusion of a considerable number of patients and controls, higher than the value estimated in the sample calculation, the data collected from a population enrolled in a tertiary hospital, and the sound quality recording of data recovered from medical records.

Furthermore, our experience carrying out the qPCR technique to evaluate TL is reassuring. qPCR is one of the most used techniques for analyzing TL because it is simple to perform and requires little genomic DNA when compared to other techniques, such as TRF by southern blotting, quantitative fluorescence in hybridization situ (Q-FISH and flow-FISH), and analysis of the unique TL (STELA) (38, 47).

Conclusions

This study showed that patients with SLE have shorter telomeres than controls, independent of age at diagnosis. It also showed that anxious symptoms are related to telomere shortening. It is still necessary to study the impact of TL on clinical outcomes

such as disease activity, damage and comorbidities, such as cardiovascular diseases, infections, and neoplasms.

Statements**Funding**

The Brazilian Society of Rheumatology supported this study.

Conflict of interests

The authors declare that they have no competing interests.

Ethics

The Ethics and Research Committee of the Federal University of Minas Gerais has approved the research protocol, and written informed consent has been obtained from the subjects (or their legally authorized representative).

Data availability

The data underlying this article are available in the article and its online supplementary material.

Acknowledgments

Special thanks to the Brazilian Society of Rheumatology for financing this study, which would not have been possible without the funds granted by its Research Aid Fund.

Supplementary Material

Table 1 – Univariate analysis for relative telomere length of whole sample (n = 114)

Characteristics	Coefficient	CI _{95%}	p-value
Patients	-0.264	-0.432; -0.096	0.002
Sex (female)	-0.040	-0.306; 0.227	0.769
Age (years)	-0.002	-0.010; 0.006	0.624
Ethnic-racial classification			
<i>White</i>	-0.059	-0.156; 0.273	0.589
<i>Black</i>	0.089	-0.142; 0.319	0.448
<i>Others</i>	0.414	0.067; 0.761	0.020
Years of study			
<i>Zero to 3</i>	-0.163	-0.064; 0.316	0.501
<i>Four to 10</i>	-0.025	-0.226; 0.175	0.802
BMI (kg/m ²)	0.003	-0.013; 0.018	0.740
Comorbidities (yes)	-0.231	-0.406; -0.056	0.010
Comorbidities			
<i>Smoking (yes)</i>	-0.031	-0.373; 0.312	0.860
<i>Hypertension (yes)</i>	-0.068	-0.307; 0.172	0.576
<i>Diabetes mellitus (yes)</i>	-0.191	-0.531; 0.150	0.270
<i>Dyslipidemia (yes)</i>	0.028	-0.257; 0.313	0.847
<i>Obesity (yes)</i>	0.030	-0.147; 0.207	0.740
<i>CKD (yes)</i>	-0.041	-0.979; 0.896	0.931
<i>COPD (yes)</i>	-0.049	-0.595; 0.497	0.859

BMI: body mass index; CI: confidence interval; CKD: chronic kidney disease; COPD: chronic obstructive pulmonary disease.

Table 2 – Univariate analysis for relative telomere length of patients (n = 59)

Sample Characteristics	Coefficient	CI_{95%}	p-value
Sex (female)	-0.007	-0.373; 0.358	0.969
Age (years)	0.006	-0.005; 0.016	0.274
Time of diagnosis (years)	0.017	-0.003; 0.036	0.102
Time of diagnosis			
<i>Six to 10 years</i>	0.058	-0.306; 0.423	0.750
<i>More than 10 years</i>	0.203	-0.138; 0.544	0.237
Age at diagnosis (years)	0.002	-0.009; 0.014	0.691
BMI (kg/m ²)	0,001	-0,018; 0,021	0,889
Number of comorbidities			
<i>Up to 2</i>	-0.042	-0.294; 0.210	0.738
<i>Two or more</i>	-0.106	-0.603; 0.391	0.671
Alcohol intake	-0.313	-1.225; 0.599	0.495
Smoking	-0.094	-0.518; 0.330	0.660
APS	0.392	0.080; 0.704	0.015
Number of infections since diagnosis	-0.057	-0.150; 0.036	0.226
Infections (yes)	-0.167	-0.401; 0.067	0.158
Number of hospitalizations due to infections since diagnosis	-0.053	-0.173; 0.067	0.381
Hospitalizations (yes)	-0.140	-0.409; 0.129	0.301
Previous history			
Nephritis	-0.032	-0.268; 0.204	0.786
NPSLE	-0.190	-0.463; 0.083	0.169
Treatment			
Antimalarials – Years of use	0.010	-0.011; 0.032	0.330
Antimalarials – accumulated dose (in mg)	-4.68E-08	-1.18E-07; 2.41E-08	0.191
Corticosteroids – accumulated dose (in mg)	-1.04E-06	-4.58E-06; 2.50E-06	0.560
Cyclophosphamide – accumulated dose (in mg)	-1.02E-05	-3.31E-05; 1.27E-05	0.376
Disease activity and damage			
<i>SLEDAI-2K</i> at diagnosis	0.006	-0.014; 0.026	0.532
<i>SLEDAI-2K</i> in baseline	-0.007	-0.035; 0.022	0.646
<i>SLICC-DI</i> in baseline	0.010	-0.066; 0.086	0.786
Cognition, fatigue, depression, anxiety and stress symptoms			
MMSE	0.004	-0.003; 0.083	0.066
Schulman's clock	-0.064	-0.151; 0.024	0.152
Verbal fluency - animals	-0.017	-0.037; 0.002	0.082
Verbal fluency – fruits	-0.003	-0.031; 0.025	0.828
CERAD word list			
<i>Learning</i>	0.003	-0.029; 0.036	0.829
<i>Recall</i>	-0.008	-0.061; 0.045	0.761
<i>Recognition</i>	0.019	-0.063; 0.101	0.645
Attention and calculation	0.055	-0.010; 0.120	0.096
Spacial orientation (yes)	-0.448	-1.090; 0.194	0.168
Temporal orientation (yes)	-0.221	-0.973; 0.531	0.559

Table 2. Continue...

Attention and calculation (yes)		-0.125	-0.363; 0.114	0.299
General cognition (yes)		-0.134	-0.417; 0.149	0.346
Learning (yes)		-0.095	-0.365; 0.176	0.487
Verbal fluency (yes)		-0.180	-0.505; 0.146	0.274
Schulman's clock (yes)		-0.058	-0.329; 0.213	0.671
Altered cognitive test		-0.088	-0.334; 0.158	0.478
FACIT – Fatigue		-0.006	-0.015; 0.004	0.227
DASS21		3.06E-04	-0.004; 0.003	0.861
Depression		3.66E-05	-0.008; 0.009	0.993
Classification				
	<i>Moderate</i>	-0.204	-0.560; 0.152	0.257
	<i>Severe or very severe</i>	-0.020	-0.289; 0.249	0.882
Anxiety		0.002	-0.008; 0.013	0.650
Classification				
	<i>Moderate</i>	-0.353	-0.645; 0.061	0.019
	<i>Severe or very severe</i>	0.056	-0.214; 0.326	0.679
Stress		-0.003	-0.013; 0.007	0.552
Classification				
	<i>Moderate</i>	-0.411	-0.771; 0.050	0.026
	<i>Severe or very severe</i>	-0.078	-0.352; 0.196	0.572
Physical activity				
	<i>Irregularly active</i>	-0.161	-0.499; 0.178	0.346
	<i>Sedentary</i>	0.422	-0.106; 0.950	0.115

APS: antiphospholipid syndrome; BMI: body mass index; CERAD: Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease; CI: confidence interval; DASS: Depression Anxiety Stress Score; FACIT: Functional Assessment Chronic Illness Therapy; MMSE: mini-mental state examination; NPSLE: neuropsychiatric systemic lupus erythematosus; SLEDAI: Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index; SLICC: Systemic Lupus International Collaborating Clinics – Damage Index.

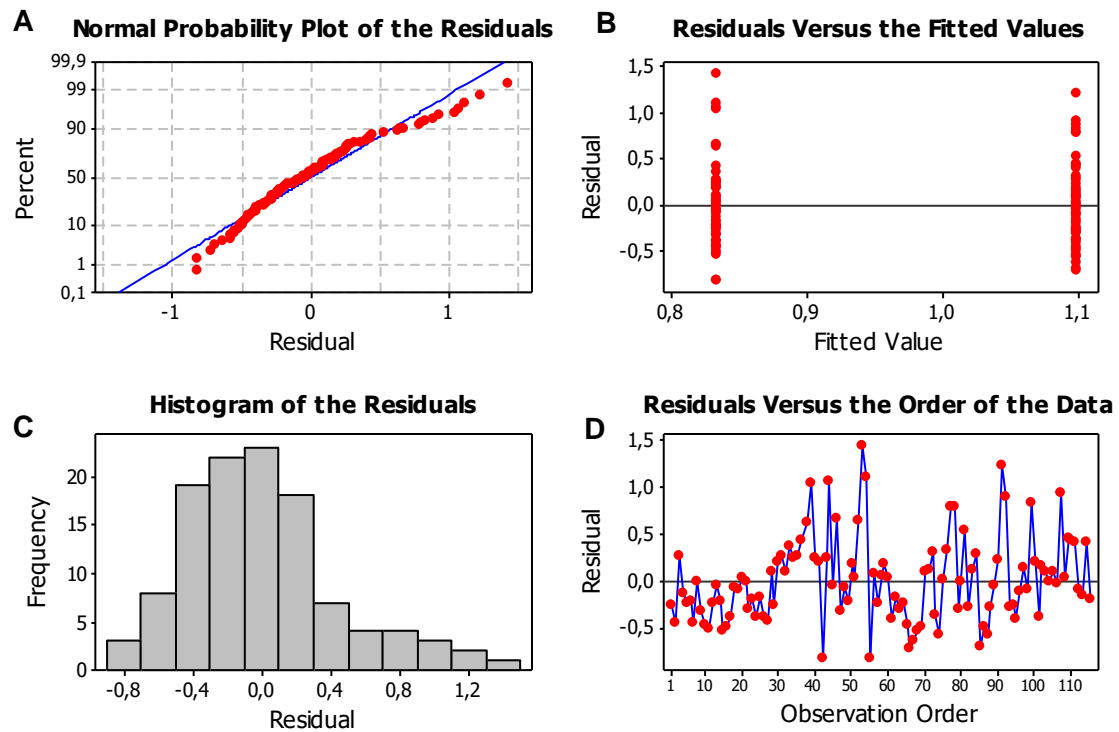


Figure 1. Adjusted model residuals plot ($n = 114$). A. Normal probability plot of the residuals; B. Residuals versus the fitted values; C. Histogram of the residuals; D. Residuals versus the order of the data.

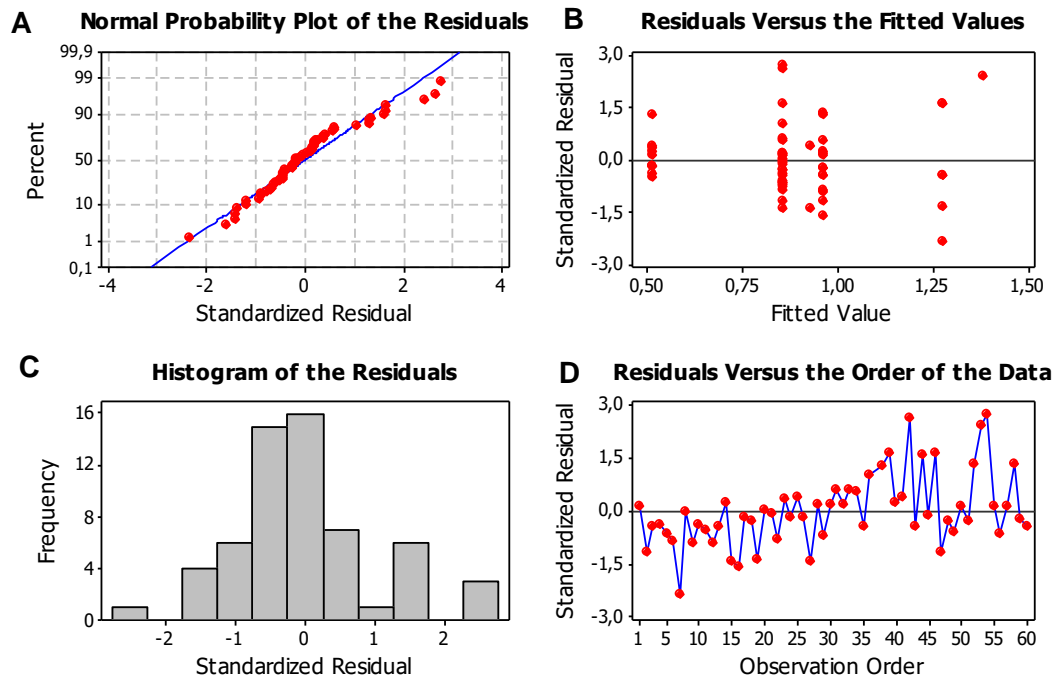


Figure 2. Adjusted model residuals plot ($n = 59$). A. Normal probability plot of the residuals; B. Residuals versus the fitted values; C. Histogram of the residuals; D. Residuals versus the order of the data.

REFERENCES:

1. Accapezzato D, Caccavale R, Paroli MP, Gioia C, Nguyen BL, Spadea L, et al. Advances in the Pathogenesis and Treatment of Systemic Lupus Erythematosus. *Int J Mol Sci.* 2023;24(7).
2. Lee YH, Jung JH, Seo YH, Kim JH, Choi SJ, Ji JD, et al. Association between shortened telomere length and systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Lupus.* 2017;26(3):282-8.
3. Thomas R, Wang W, Su DM. Contributions of Age-Related Thymic Involution to Immunosenescence and Inflammaging. *Immun Ageing.* 2020;17:2.
4. Tsai CY, Shen CY, Liao HT, Li KJ, Lee HT, Lu CS, et al. Molecular and Cellular Bases of Immunosenescence, Inflammation, and Cardiovascular Complications Mimicking "Inflammaging" in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Int J Mol Sci.* 2019;20(16).
5. Ridout KK, Levandowski M, Ridout SJ, Gantz L, Goonan K, Palermo D, et al. Early life adversity and telomere length: a meta-analysis. *Mol Psychiatry.* 2018;23(4):858-71.
6. Katz-Agranov N, Zandman-Goddard G. The microbiome links between aging and lupus. *Autoimmun Rev.* 2021;20(3):102765.
7. Ugarte-Gil MF, Sánchez-Zúñiga C, Gamboa-Cárdenas RV, Aliaga-Zamudio M, Zevallos F, Tineo-Pozo G, et al. Circulating CD4+CD28null and extra-thymic CD4+CD8+ double positive T cells are independently associated with disease damage in systemic lupus erythematosus patients. *Lupus.* 2016;25(3):233-40.
8. Gao L, Slack M, Barnas JL, McDavid A, Anolik J, Looney RJ. Cell Senescence in Lupus. *Curr Rheumatol Rep.* 2019;21(2):1.
9. López P, Rodríguez-Carrio J, Martínez-Zapico A, Caminal-Montero L, Suarez A. Senescent profile of angiogenic T cells from systemic lupus erythematosus patients. *J Leukoc Biol.* 2016;99(3):405-12.
10. Zhu H, Belcher M, van der Harst P. Healthy aging and disease: role for telomere biology? *Clin Sci (Lond).* 2011;120(10):427-40.
11. Aubert G, Hills M, Lansdorp PM. Telomere length measurement-caveats and a critical assessment of the available technologies and tools. *Mutat Res.* 2012;730(1-2):59-67.
12. Schellnegger M, Lin AC, Hammer N, Kamolz LP. Physical Activity on Telomere Length as a Biomarker for Aging: A Systematic Review. *Sports Med Open.* 2022;8(1):111.
13. Montpetit AJ, Alhareeri AA, Montpetit M, Starkweather AR, Elmore LW, Filler K, et al. Telomere length: a review of methods for measurement. *Nurs Res.* 2014;63(4):289-99.
14. Nguyen MT, Lycett K, Vryer R, Burgner DP, Ranganathan S, Grobler AC, et al. Telomere length: population epidemiology and concordance in Australian children aged 11-12 years and their parents. *BMJ Open.* 2019;9(Suppl 3):118-26.
15. Broer L, Codd V, Nyholt DR, Deelen J, Mangino M, Willemsen G, et al. Meta-analysis of telomere length in 19,713 subjects reveals high heritability, stronger maternal inheritance and a paternal age effect. *Eur J Hum Genet.* 2013;21(10):1163-8.
16. Skamra C, Romero-Diaz J, Sandhu A, Huang Q, Lee J, Pearce W, et al. Telomere length in patients with systemic lupus erythematosus and its associations with carotid plaque. *Rheumatology (Oxford).* 2013;52(6):1101-8.

17. Wu CH, Hsieh SC, Li KJ, Lu MC, Yu CL. Premature telomere shortening in polymorphonuclear neutrophils from patients with systemic lupus erythematosus is related to the lupus disease activity. *Lupus*. 2007;16(4):265-72.
18. Bridges J, Chung KW, Martz CD, Smitherman EA, Drenkard C, Wu C, et al. Leukocyte Telomere Length and Childhood Onset of Systemic Lupus Erythematosus in the Black Women's Experiences Living with Lupus Study. *ACR Open Rheumatol*. 2022;4(5):426-31.
19. Haque S, Rakieh C, Marriage F, Ho P, Gorodkin R, Teh LS, et al. Shortened telomere length in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2013;65(5):1319-23.
20. Petri M, Orbai AM, Alarcón GS, Gordon C, Merrill JT, Fortin PR, et al. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2012;64(8):2677-86.
21. Aringer M, Costenbader K, Daikh D, Brinks R, Mosca M, Ramsey-Goldman R, et al. 2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology Classification Criteria for Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatol*. 2019;71(9):1400-12.
22. Brasil. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios - PNAD. 2021. <https://www.ibge.gov.br/pnad>.
23. Gladman DD, Ibañez D, Urowitz MB. Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. *J Rheumatol*. 2002;29(2):288-91.
24. Gladman DD, Goldsmith CH, Urowitz MB, Bacon P, Fortin P, Ginzler E, et al. The Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology (SLICC/ACR) Damage Index for Systemic Lupus Erythematosus International Comparison. *J Rheumatol*. 2000;27(2):373-6.
25. Brucki SM, Nitrini R, Caramelli P, Bertolucci PH, Okamoto IH. [Suggestions for utilization of the mini-mental state examination in Brazil]. *Arq Neuropsiquiatr*. 2003;61(3B):777-81.
26. Henry JD, Crawford JR, Phillips LH. Verbal fluency performance in dementia of the Alzheimer's type: a meta-analysis. *Neuropsychologia*. 2004;42(9):1212-22.
27. Shulman KI. Clock-drawing: is it the ideal cognitive screening test? *Int J Geriatr Psychiatry*. 2000;15(6):548-61.
28. Bertolucci PH, Okamoto IH, Brucki SM, Siviero MO, Toniolo Neto J, Ramos LR. Applicability of the CERAD neuropsychological battery to Brazilian elderly. *Arq Neuropsiquiatr*. 2001;59(3-A):532-6.
29. Vignola RC, Tucci AM. Adaptation and validation of the depression, anxiety and stress scale (DASS) to Brazilian Portuguese. *J Affect Disord*. 2014;155:104-9.
30. Lai JS, Beaumont JL, Ogale S, Brunetta P, Cella D. Validation of the functional assessment of chronic illness therapy-fatigue scale in patients with moderately to severely active systemic lupus erythematosus, participating in a clinical trial. *J Rheumatol*. 2011;38(4):672-9.
31. Craig CL, Marshall AL, Sjöström M, Bauman AE, Booth ML, Ainsworth BE, et al. International physical activity questionnaire: 12-country reliability and validity. *Med Sci Sports Exerc*. 2003;35(8):1381-95.

32. Lee PH, Macfarlane DJ, Lam TH, Stewart SM. Validity of the International Physical Activity Questionnaire Short Form (IPAQ-SF): a systematic review. *Int J Behav Nutr Phys Act.* 2011;8:115.
33. van Vollenhoven RF, Bertsias G, Doria A, Isenberg D, Morand E, Petri MA, et al. 2021 DORIS definition of remission in SLE: final recommendations from an international task force. *Lupus Sci Med.* 2021;8(1).
34. Franklyn K, Lau CS, Navarra SV, Louthrenoo W, Lateef A, Hamijoyo L, et al. Definition and initial validation of a Lupus Low Disease Activity State (LLDAS). *Ann Rheum Dis.* 2016;75(9):1615-21.
35. Lahiri DK, Nurnberger JI. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res.* 1991;19(19):5444.
36. CAVALLI, A.S. et al. Apolipoprotein E genotyping in Brazilian normocholesterolemic individuals. *Clin Chem* v.42, p.298, 1996.
37. Salazar LA, Hirata MH, Cavalli SA, Machado MO, Hirata RD. Optimized procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. *Clin Chem.* 1998;44(8 Pt 1):1748-50.
38. Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(10):e47.
39. Brown L, García C, Ailshire J. Does Salivary Telomere Length Explain Race/Ethnic Differences in Aging? *Biodemography Soc Biol.* 2019;65(4):351-69.
40. Pousa PA, Souza RM, Melo PHM, Correa BHM, Mendonça TSC, Simões-E-Silva AC, et al. Telomere Shortening and Psychiatric Disorders: A Systematic Review. *Cells.* 2021;10(6).
41. Darrow SM, Verhoeven JE, Révész D, Lindqvist D, Penninx BW, Delucchi KL, et al. The Association Between Psychiatric Disorders and Telomere Length: A Meta-Analysis Involving 14,827 Persons. *Psychosom Med.* 2016;78(7):776-87.
42. Quilter MC, Hiraki LT, Korczak DJ. Depressive and anxiety symptom prevalence in childhood-onset systemic lupus erythematosus: A systematic review. *Lupus.* 2019;28(7):878-87.
43. Rayes HA, Tani C, Kwan A, Marzouk S, Colosimo K, Medina-Rosas J, et al. What is the prevalence of cognitive impairment in lupus and which instruments are used to measure it? A systematic review and meta-analysis. *Semin Arthritis Rheum.* 2018;48(2):240-55.
44. Leslie B, Crowe SF. Cognitive functioning in systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Lupus.* 2018;27(6):920-9.
45. Gwinnutt JM, Toyoda T, Barraclough M, Verstappen SMM, Hornberger M, MacGregor A. Cognitive impairment in the immune-mediated inflammatory diseases compared with age-matched controls: Systematic review and meta-regression. *Semin Arthritis Rheum.* 2023;58:152131.
46. Raghunath S, Glikmann-Johnston Y, Vincent FB, Morand EF, Stout JC, Hoi A. Patterns and prevalence of cognitive dysfunction in systemic lupus erythematosus. *J Int Neuropsychol Soc.* 2023;29(5):421-30.
47. Barrett JH, Iles MM, Dunning AM, Pooley KA. Telomere length and common disease: study design and analytical challenges. *Hum Genet.* 2015;134(7):679-89.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Inflamação, estresse oxidativo e aumento da replicação celular são os principais fatores ambientais associados ao encurtamento acelerado dos telômeros⁴², condições presentes no LES, tornando plausível o estudo deste fenômeno nesta população. Este é o primeiro estudo que avalia o comprimento relativo dos telômeros em pacientes com LES na população brasileira.

Esta é uma linha de pesquisa que se inicia com este trabalho mas existem perspectivas futuras de seguimento desta linha, com proposta de avaliação de polimorfismos gênicos da telomerase e anticorpos anti-telômero, como projeto de pesquisa de doutorado.

Por fim, estudos longitudinais são essenciais para avaliar desfechos clínicos possivelmente relacionados ao CT no LES, como doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, além de neoplasias, infecções e resposta vacinal.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- 1 LEE, Y. H. et al. Association between shortened telomere length and systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. **Lupus**, v. 26, n. 3, p. 282-288, Mar 2017. ISSN 1477-0962.
- 2 BRIDGES, J. et al. Leukocyte Telomere Length and Childhood Onset of Systemic Lupus Erythematosus in the Black Women's Experiences Living with Lupus Study. **ACR Open Rheumatol**, v. 4, n. 5, p. 426-431, May 2022. ISSN 2578-5745.
- 3 STOJAN, G.; PETRI, M. Epidemiology of systemic lupus erythematosus: an update. **Curr Opin Rheumatol**, v. 30, n. 2, p. 144-150, Mar 2018. ISSN 1531-6963.
- 4 REES, F. et al. The worldwide incidence and prevalence of systemic lupus erythematosus: a systematic review of epidemiological studies. **Rheumatology (Oxford)**, v. 56, n. 11, p. 1945-1961, Nov 01 2017. ISSN 1462-0332.
- 5 KLUMB, E. M. et al. The landscape of systemic lupus erythematosus in Brazil: An expert panel review and recommendations. **Lupus**, v. 30, n. 10, p. 1684-1695, Sep 2021. ISSN 1477-0962.
- 6 QUILTER, M. C.; HIRAKI, L. T.; KORCZAK, D. J. Depressive and anxiety symptom prevalence in childhood-onset systemic lupus erythematosus: A systematic review. **Lupus**, v. 28, n. 7, p. 878-887, Jun 2019. ISSN 1477-0962.
- 7 CHALAN, P. et al. Rheumatoid Arthritis, Immunosenescence and the Hallmarks of Aging. **Curr Aging Sci**, v. 8, n. 2, p. 131-46, 2015. ISSN 1874-6128.
- 8 THOMAS, R.; WANG, W.; SU, D. M. Contributions of Age-Related Thymic Involution to Immunosenescence and Inflammaging. **Immun Ageing**, v. 17, p. 2, 2020. ISSN 1742-4933.
- 9 TSAI, C. Y. et al. Molecular and Cellular Bases of Immunosenescence, Inflammation, and Cardiovascular Complications Mimicking "Inflammaging" in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. **Int J Mol Sci**, v. 20, n. 16, Aug 09 2019. ISSN 1422-0067.

- 10 OH, S. J.; LEE, J. K.; SHIN, O. S. Aging and the Immune System: the Impact of Immunosenescence on Viral Infection, Immunity and Vaccine Immunogenicity. **Immune Netw**, v. 19, n. 6, p. e37, Dec 2019. ISSN 1598-2629.
- 11 HAYNES, L.; MAUE, A. C. Effects of aging on T cell function. **Curr Opin Immunol**, v. 21, n. 4, p. 414-7, Aug 2009. ISSN 1879-0372.
- 12 UGARTE-GIL, M. F. et al. Circulating CD4+CD28null and extra-thymic CD4+CD8+ double positive T cells are independently associated with disease damage in systemic lupus erythematosus patients. **Lupus**, v. 25, n. 3, p. 233-40, Mar 2016. ISSN 1477-0962.
- 13 RIDOUT, K. K. et al. Early life adversity and telomere length: a meta-analysis. **Mol Psychiatry**, v. 23, n. 4, p. 858-871, 04 2018. ISSN 1476-5578.
- 14 BELLON, M.; NICOT, C. Telomere Dynamics in Immune Senescence and Exhaustion Triggered by Chronic Viral Infection. **Viruses**, v. 9, n. 10, Oct 05 2017. ISSN 1999-4915.
- 15 SCHELLNEGGER, M. et al. Physical Activity on Telomere Length as a Biomarker for Aging: A Systematic Review. **Sports Med Open**, v. 8, n. 1, p. 111, Sep 04 2022. ISSN 2199-1170.
- 16 ZHU, H.; BELCHER, M.; VAN DER HARST, P. Healthy aging and disease: role for telomere biology? **Clin Sci (Lond)**, v. 120, n. 10, p. 427-40, May 2011. ISSN 1470-8736.
- 17 KATZ-AGRANOV, N.; ZANDMAN-GODDARD, G. The microbiome links between aging and lupus. **Autoimmun Rev**, v. 20, n. 3, p. 102765, Mar 2021. ISSN 1873-0183.
- 18 HOHENSINNER, P. J.; GORONZY, J. J.; WEYAND, C. M. Telomere dysfunction, autoimmunity and aging. **Aging Dis**, v. 2, n. 6, p. 524-37, Dec 2011. ISSN 2152-5250.
- 19 GAO, L. et al. Cell Senescence in Lupus. **Curr Rheumatol Rep**, v. 21, n. 2, p. 1, Jan 14 2019. ISSN 1534-6307.
- 20 LÓPEZ, P. et al. Senescent profile of angiogenic T cells from systemic lupus erythematosus patients. **J Leukoc Biol**, v. 99, n. 3, p. 405-12, Mar 2016. ISSN 1938-3673.

- 21 AUBERT, G.; HILLS, M.; LANSDORP, P. M. Telomere length measurement-caveats and a critical assessment of the available technologies and tools. **Mutat Res**, v. 730, n. 1-2, p. 59-67, Feb 01 2012. ISSN 0027-5107.
- 22 MONTPETIT, A. J. et al. Telomere length: a review of methods for measurement. **Nurs Res**, v. 63, n. 4, p. 289-99, 2014. ISSN 1538-9847.
- 23 NGUYEN, M. T. et al. Telomere length: population epidemiology and concordance in Australian children aged 11-12 years and their parents. **BMJ Open**, v. 9, n. Suppl 3, p. 118-126, Jul 04 2019. ISSN 2044-6055.
- 24 MARTIN-RUIZ, C. et al. Telomere length predicts poststroke mortality, dementia, and cognitive decline. **Ann Neurol**, v. 60, n. 2, p. 174-80, Aug 2006. ISSN 0364-5134.
- 25 BROER, L. et al. Meta-analysis of telomere length in 19,713 subjects reveals high heritability, stronger maternal inheritance and a paternal age effect. **Eur J Hum Genet**, v. 21, n. 10, p. 1163-8, Oct 2013. ISSN 1476-5438.
- 26 TURNER, K. J.; VASU, V.; GRIFFIN, D. K. Telomere Biology and Human Phenotype. **Cells**, v. 8, n. 1, Jan 19 2019. ISSN 2073-4409.
- 27 HONDA, M. et al. Telomere shortening and decreased replicative potential, contrasted by continued proliferation of telomerase-positive CD8+CD28(lo) T cells in patients with systemic lupus erythematosus. **Clin Immunol**, v. 99, n. 2, p. 211-221, May 2001. ISSN 1521-6616.
- 28 HAQUE, S. et al. Shortened telomere length in patients with systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**, v. 65, n. 5, p. 1319-23, May 2013. ISSN 1529-0131.
- 29 VAN DEN HOOGEN, L. L. et al. Aging and Systemic Lupus Erythematosus - Immunosenescence and Beyond. **Curr Aging Sci**, v. 8, n. 2, p. 158-77, 2015. ISSN 1874-6128.
- 30 MARGIOTTA, D. P. E. et al. Physical activity and sedentary behavior in patients with Systemic Lupus Erythematosus. **PLOS ONE**, v. 13, n. 3, p. e0193728, 2018. ISSN 1932-6203.

- 31 KAM, M. L. W.; NGUYEN, T. T. T.; NGEOW, J. Y. Y. Telomere biology disorders. **NPJ Genom Med**, v. 6, n. 1, p. 36, May 28 2021. ISSN 2056-7944.
- 32 TUMMALA, H.; WALNE, A.; DOKAL, I. The biology and management of dyskeratosis congenita and related disorders of telomeres. **Expert Rev Hematol**, v. 15, n. 8, p. 685-696, Aug 2022. ISSN 1747-4094.
- 33 CAWTHON, R. M. Telomere measurement by quantitative PCR. **Nucleic Acids Res**, v. 30, n. 10, p. e47, May 15 2002. ISSN 1362-4962.
- 34 KOZORA, E.; ELLISON, M. C.; WEST, S. Reliability and validity of the proposed American College of Rheumatology neuropsychological battery for systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**, v. 51, n. 5, p. 810-8, Oct 15 2004. ISSN 0004-3591.
- 35 RAGHUNATH, S. et al. Patterns and prevalence of cognitive dysfunction in systemic lupus erythematosus. **J Int Neuropsychol Soc**, v. 29, n. 5, p. 421-430, Jun 2023. ISSN 1469-7661.
- 36 MACIEL, R. O. et al. Executive dysfunction, obsessive-compulsive symptoms, and attention deficit and hyperactivity disorder in Systemic Lupus Erythematosus: Evidence for basal ganglia dysfunction? **J Neurol Sci**, v. 360, p. 94-7, Jan 15 2016. ISSN 1878-5883.
- 37 TEIXEIRA SANTOS, F. P. S. et al. Cognitive dysfunction in patients with childhood-onset systemic lupus erythematosus may impact treatment. **Adv Rheumatol**, v. 63, n. 1, p. 18, Apr 24 2023. ISSN 2523-3106.
- 38 KALIM, H. et al. Accelerated immune aging was correlated with lupus-associated brain fog in reproductive-age systemic lupus erythematosus patients. **Int J Rheum Dis**, v. 23, n. 5, p. 620-626, May 2020. ISSN 1756-185X.
- 39 PETRI, M. et al. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**, v. 64, n. 8, p. 2677-86, Aug 2012. ISSN 1529-0131.
- 40 ARINGER, M. et al. 2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology Classification Criteria for Systemic Lupus Erythematosus. **Arthritis Rheumatol**, v. 71, n. 9, p. 1400-1412, Sep 2019. ISSN 2326-5205.

- 41 Brasil. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios - PNAD. 2021. <https://www.ibge.gov.br/pnad>.
- 42 SKAMRA, C. et al. Telomere length in patients with systemic lupus erythematosus and its associations with carotid plaque. **Rheumatology (Oxford)**, v. 52, n. 6, p. 1101-8, Jun 2013. ISSN 1462-0332.
- 43 GLADMAN, D. D.; IBAÑEZ, D.; UROWITZ, M. B. Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. **J Rheumatol**, v. 29, n. 2, p. 288-91, Feb 2002. ISSN 0315-162X.
- 44 VAN VOLLENHOVEN, R. F. et al. 2021 DORIS definition of remission in SLE: final recommendations from an international task force. **Lupus Sci Med**, v. 8, n. 1, Nov 2021. ISSN 2053-8790.
- 45 FRANKLYN, K. et al. Definition and initial validation of a Lupus Low Disease Activity State (LLDAS). **Ann Rheum Dis**, v. 75, n. 9, p. 1615-21, Sep 2016. ISSN 1468-2060.
- 46 GLADMAN, D. D. et al. The Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology (SLICC/ACR) Damage Index for Systemic Lupus Erythematosus International Comparison. **J Rheumatol**, v. 27, n. 2, p. 373-6, Feb 2000. ISSN 0315-162X.
- 47 KLUMB, E. M. et al. [Consensus of the Brazilian Society of Rheumatology for the diagnosis, management and treatment of lupus nephritis]. **Rev Bras Reumatol**, v. 55, n. 1, p. 1-21, 2015. ISSN 1809-4570.
- 48 The American College of Rheumatology nomenclature and case definitions for neuropsychiatric lupus syndromes. **Arthritis Rheum**, v. 42, n. 4, p. 599-608, Apr 1999. ISSN 0004-3591.
- 49 MIYAKIS, S. et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). **J Thromb Haemost**, v. 4, n. 2, p. 295-306, Feb 2006. ISSN 1538-7933.
- 50 FRAGOULIS, G. E. et al. 2022 EULAR recommendations for screening and prophylaxis of chronic and opportunistic infections in adults with autoimmune inflammatory rheumatic diseases. **Ann Rheum Dis**, v. 82, n. 6, p. 742-753, Jun 2023. ISSN 1468-2060.

- 51 KAPLAN, J. E. et al. Guidelines for prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents: recommendations from CDC, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. **MMWR Recomm Rep**, v. 58, n. RR-4, p. 1-207; quiz CE1-4, Apr 10 2009. ISSN 1545-8601.
- 52 MASUR, H. et al. Prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents: Updated Guidelines from the Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health, and HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. **Clin Infect Dis**, v. 58, n. 9, p. 1308-11, May 2014. ISSN 1537-6591.
- 53 LAMB, E. J.; LEVEY, A. S.; STEVENS, P. E. The Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) guideline update for chronic kidney disease: evolution not revolution. **Clin Chem**, v. 59, n. 3, p. 462-5, Mar 2013. ISSN 1530-8561.
- 54 OMS. Self-help strategies for cutting down or stopping substance use: a guide. Genebra, Suíça: Organização Mundial da Saúde, 2010.
- 55 BERTOLUCCI, P. H. et al. [The Mini-Mental State Examination in a general population: impact of educational status]. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 52, n. 1, p. 1-7, Mar 1994. ISSN 0004-282X.
- 56 HENRY, J. D.; CRAWFORD, J. R.; PHILLIPS, L. H. Verbal fluency performance in dementia of the Alzheimer's type: a meta-analysis. **Neuropsychologia**, v. 42, n. 9, p. 1212-22, 2004. ISSN 0028-3932.
- 57 SHULMAN, K. I. Clock-drawing: is it the ideal cognitive screening test? **Int J Geriatr Psychiatry**, v. 15, n. 6, p. 548-61, Jun 2000. ISSN 0885-6230.
- 58 SUPASITTHUMRONG, T. et al. Clock drawing and neuroanatomical correlates: A systematic review. **Int J Geriatr Psychiatry**, v. 34, n. 2, p. 223-232, Feb 2019. ISSN 1099-1166.
- 59 BERTOLUCCI, P. H. et al. Applicability of the CERAD neuropsychological battery to Brazilian elderly. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 59, n. 3-A, p. 532-6, Sep 2001. ISSN 0004-282X.
- 60 LOVIBOND, P. F.; LOVIBOND, S. H. The structure of negative emotional states: comparison of the Depression Anxiety Stress Scales (DASS) with the Beck

- Depression and Anxiety Inventories. **Behav Res Ther**, v. 33, n. 3, p. 335-43, Mar 1995. ISSN 0005-7967.
- 61 BECK, A. T. et al. An inventory for measuring depression. **Arch Gen Psychiatry**, v. 4, p. 561-71, Jun 1961. ISSN 0003-990X.
- 62 GOMES-OLIVEIRA, M. H. et al. Validation of the Brazilian Portuguese version of the Beck Depression Inventory-II in a community sample. **Braz J Psychiatry**, v. 34, n. 4, p. 389-94, Dec 2012. ISSN 1809-452X.
- 63 BECK, A. T. et al. An inventory for measuring clinical anxiety: psychometric properties. **J Consult Clin Psychol**, v. 56, n. 6, p. 893-7, Dec 1988. ISSN 0022-006X.
- 64 VIGNOLA, R. C.; TUCCI, A. M. Adaptation and validation of the depression, anxiety and stress scale (DASS) to Brazilian Portuguese. **J Affect Disord**, v. 155, p. 104-9, Feb 2014. ISSN 1573-2517.
- 65 LAI, J. S. et al. Validation of the functional assessment of chronic illness therapy-fatigue scale in patients with moderately to severely active systemic lupus erythematosus, participating in a clinical trial. **J Rheumatol**, v. 38, n. 4, p. 672-9, Apr 2011. ISSN 0315-162X.
- 66 CRAIG, C. L. et al. International physical activity questionnaire: 12-country reliability and validity. **Med Sci Sports Exerc**, v. 35, n. 8, p. 1381-95, Aug 2003. ISSN 0195-9131.
- 67 LEE, P. H. et al. Validity of the International Physical Activity Questionnaire Short Form (IPAQ-SF): a systematic review. **Int J Behav Nutr Phys Act**, v. 8, p. 115, Oct 21 2011. ISSN 1479-5868.
- 68 LAHIRI, D. K.; NURNBERGER, J. I. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Res**, v. 19, n. 19, p. 5444, Oct 11 1991. ISSN 0305-1048.
- 69 CAVALLI, A.S. et al. Apolipoprotein E genotyping in Brazilian normocholesterolemic individuals. **Clin Chem** v.42, p.298, 1996.
- 70 SALAZAR, L. A. et al. Optimized procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. **Clin Chem**, v. 44, n. 8 Pt 1, p. 1748-50, Aug 1998. ISSN 0009-9147.

- 71 WU, C. H. et al. Premature telomere shortening in polymorphonuclear neutrophils from patients with systemic lupus erythematosus is related to the lupus disease activity. **Lupus**, v. 16, n. 4, p. 265-72, 2007. ISSN 0961-2033.
- 72 BROWN, L.; GARCÍA, C.; AILSHIRE, J. Does Salivary Telomere Length Explain Race/Ethnic Differences in Aging? **Biodemography Soc Biol**, v. 65, n. 4, p. 351-369, 2019. ISSN 1948-5573.
- 73 POUSA, P. A. et al. Telomere Shortening and Psychiatric Disorders: A Systematic Review. **Cells**, v. 10, n. 6, Jun 07 2021. ISSN 2073-4409.
- 74 DARROW, S. M. et al. The Association Between Psychiatric Disorders and Telomere Length: A Meta-Analysis Involving 14,827 Persons. **Psychosom Med**, v. 78, n. 7, p. 776-87, Sep 2016. ISSN 1534-7796.
- 75 ZHANG, L. et al. Prevalence of depression and anxiety in systemic lupus erythematosus: a systematic review and meta-analysis. **BMC Psychiatry**, v. 17, n. 1, p. 70, Feb 14 2017. ISSN 1471-244X.
- 76 BRUCKI, S. M. et al. [Suggestions for utilization of the mini-mental state examination in Brazil]. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 61, n. 3B, p. 777-81, Sep 2003. ISSN 0004-282X.
- 77 GWINNUTT, J. M. et al. Cognitive impairment in the immune-mediated inflammatory diseases compared with age-matched controls: Systematic review and meta-regression. **Semin Arthritis Rheum**, v. 58, p. 152131, Feb 2023. ISSN 1532-866X.
- 78 RAYES, H. A. et al. What is the prevalence of cognitive impairment in lupus and which instruments are used to measure it? A systematic review and meta-analysis. **Semin Arthritis Rheum**, v. 48, n. 2, p. 240-255, Oct 2018. ISSN 1532-866X.
- 79 LESLIE, B.; CROWE, S. F. Cognitive functioning in systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. **Lupus**, London, England, v. 27, n. 6, p. 920-929, 2018. ISSN 0961-2033.
- 80 BARRETT, J. H. et al. Telomere length and common disease: study design and analytical challenges. **Hum Genet**, v. 134, n. 7, p. 679-89, Jul 2015. ISSN 1432-1203.

9. APÊNDICES

I. Critérios Classificatórios *Systemic Lupus International Collaborating Clinics (SLICC) 2012*

-) Lúpus cutâneo aguda
 -) Lúpus bolhoso
 -) Necrólise epidérmica tóxica - símile
 -) Lesão maculopapular
 -) Fotossensibilidade
-) Lesão cutânea crônica
 -) Lesão discoide
 -) Lúpus verrucoso hipertrófico
 -) Paniculite
 -) Lúpus discoide mucoso
 -) Lúpus túmido
 -) Lúpus vasculítico (chillblains)
 -) Lesão liquenoide
-) Alopecia não-cicatricial
-) Úlceras orais ou nasais
-) Artrite (ou artralgia inflamatória)
-) Serosite
 -) pleurite
 -) pericardite
-) Nefrite
 -) Cilindros hemáticos
 -) Relação proteína/creatinina $\geq 0,5$
 -) Proteinúria $\geq 500\text{mg}/24\text{h}$
-) Acometimento neuropsiquiátrico
 -) Convulsão
 -) Psicose
 -) Mononeurite múltipla

- Mielite
 - Neuropatia periférica/par craniano
 - Estado confusional agudo
 - Alterações hematológicas
 - Anemia hemolítica autoimune
 - Leucopenia (<4.000)
 - Linfopenia (<1.000)
 - Plaquetopenia (<100.000)
-
- FAN
-
- Anti-DNA
 - Anti-Sm
 - VDRL
 - Anticoagulante lúpico
 - Anticorpo anticardiolipina IgM, IgG, IgA
 - Anti-beta-2-glicoproteína I IgM, IgG, IgA
-
- Coombs direto positivo
 - Redução de C3 e/ou C4 e/ou CH50
 - CRITÉRIO ISOLADO: biópsia compatível com nefrite lúpica
-

II. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

O Sr.(a) está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa **“ESTUDO COMPARATIVO DO COMPRIMENTO DOS TELÔMEROS EM ADULTOS COM DOENÇAS REUMÁTICAS IMUNOMEDIADAS”**, cujas pesquisadoras são Dra. Anna Carolina Faria Moreira Gomes Tavares, Professora Dra. Adriana Maria Kakehasi e Professora Dra. Gilda Aparecida Ferreira. O termo imunossenescência significa envelhecimento do sistema imunológico. Acreditamos que pelo fato de o lúpus ser uma doença que causa inflamação em vários locais do organismo, isto também ocorra com o sistema imune e por isto, com o passar do tempo, ele vai perdendo sua função de proteção.

Pedimos a sua autorização para a coleta, o depósito, o armazenamento, a utilização e descarte de sangue (aproximadamente 10mL de sangue total), que será coletado no Ambulatório Bias Fortes, Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, por profissional treinado. A utilização do seu material biológico está vinculada somente a este projeto de pesquisa ou se Sr.(a) concordar em outros futuros. Além disto, precisaremos consultar seus dados em seu prontuário, para inclusão de algumas informações da sua história e de sua doença que serão importantes para a pesquisa. Com este projeto pretendemos investigar se os pacientes com lúpus eritematoso sistêmico apresentam um envelhecimento do sistema imune mais acelerado, quando comparados com pessoas saudáveis.

Para esta pesquisa adotaremos os seguintes procedimentos: 1. coleta de amostra de sangue (total=10mL, em dois frascos). Esta coleta será realizada hoje, desde que haja sua concordância. Não haverá necessidade de retornar ao hospital para novas coletas; 2. a identificação das amostras será feita através de um número de identificação (sua identidade não será revelada); 3. as amostras serão levadas ao Laboratório de Neurociências e Genética Molecular da Faculdade de Medicina da UFMG e a um laboratório externo, imediatamente após a coleta; 4. sua amostra será armazenada em freezer até que a pesquisa seja concluída e depois este material será descartado.

Além disso, pedimos autorização para revisão de seu histórico clínico através de seu prontuário médico, para melhor verificação dos fatos relacionados à sua doença desde o diagnóstico até os dias de hoje.

Os riscos envolvidos na pesquisa consistem naqueles relacionados à punção de veia (como quando realiza exames de sangue no laboratório): medo, dor no local da punção, hematomas e alergia ao curativo. Não haverá necessidade de permanecer internado ou em observação após a punção. Após a punção será colocado curativo no local e o local deverá ser comprimido por 2 minutos para minimizar o risco de hematomas. Existe também o risco de alergia ao curativo e caso haja qualquer história prévia de alergia a esparadrapo ou quaisquer outros produtos, isto deve ser comunicado à equipe para que troquemos o material.

A pesquisa contribuirá para a melhoria no atendimento ao paciente com lúpus eritematoso sistêmico, uma vez que conhecendo como se comporta o sistema imune dos pacientes com lúpus e se ele está mais envelhecido (ou seja, se está mais deficiente, perdendo a função por causa da doença) quando comparado com o sistema imunológico da população saudável. Isto permitirá que desenvolvamos estratégias de prevenção de infecção, inclusive vacinação, sempre objetivando o aprimoramento do cuidado aos pacientes com LES.

Para participar deste estudo o Sr.(a) não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Apesar disso, caso sejam identificados e comprovados danos provenientes desta pesquisa, o Sr.(a) tem assegurado o direito à indenização. Caso o Sr.(a) sinta que sofreu algum dano decorrente de sua participação na pesquisa, previsto ou não neste termo de consentimento livre e esclarecido, poderá pleitear na justiça a indenização.

O Sr.(a) terá o esclarecimento sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar e a qualquer tempo e sem quaisquer prejuízos, pode retirar o consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado no Biorrepositório, valendo a desistência a partir da data de formalização desta. A sua participação é voluntária, e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que o Sr.(a) é atendido(a) por mim e pela equipe de Reumatologia, que tratará a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os

resultados obtidos pela pesquisa, a partir de seu material biológico, estarão à sua disposição quando finalizada. Os resultados da pesquisa serão utilizados em trabalhos científicos publicados em revistas científicas ou apresentados em congressos ou palestras. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão. O(A) Sr.(a) não será identificado(a) em nenhuma publicação que possa resultar.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, no Centro de Estudos Pedro Nava do Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, e a outra será fornecida ao Sr.(a). Os dados e os materiais utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período mínimo de 5 (cinco) anos e máximo de 10 (dez) anos, no Centro de Estudos Pedro Nava do Serviço de Reumatologia e no Laboratório Multiusuário da Faculdade de Medicina da UFMG e após esse tempo serão destruídos. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resoluções Nº 466/12; 441/11 e a Portaria 2.201 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares), utilizando as informações somente para fins acadêmicos e científicos.

Eu, _____,
portador do documento de identidade _____,

fui informado(a) dos objetivos, métodos, riscos e benefícios da pesquisa **“ESTUDO COMPARATIVO DO COMPRIMENTO DOS TELÔMEROS EM ADULTOS COM DOENÇAS REUMÁTICAS IMUNOMEDIADAS”**, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

() Concordo que o meu material biológico seja utilizado somente para esta pesquisa.

() Concordo que o meu material biológico possa ser utilizado em outras pesquisa, mas serei comunicado pelo pesquisador novamente e assinarei outro termo de consentimento livre e esclarecido que explique para que será utilizado o material.

Declaro que concordo em participar desta pesquisa. Recebi uma via original deste termo de consentimento livre e esclarecido assinado por mim e pelo pesquisador, que me deu a oportunidade de ler e esclarecer todas as minhas dúvidas.

Nome completo do participante:

Data: ____/____/____

Assinatura do participante

Nome completo do Pesquisador Responsável: Anna Carolina Faria Moreira Gomes Tavares

Endereço: Alameda Vereador Álvaro Celso, 175 – segundo andar – Ambulatório Bias Fortes

CEP: 30.150-260 / Belo Horizonte – MG

Telefones: (31) 3307-9532

E-mail: annacgtavares@gmail.com

Assinatura do pesquisador responsável

Data: ____/____/____

Em caso de dúvidas, com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:

COEP-UFMG - Comissão de Ética em Pesquisa da UFMG

Av. Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005.

Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG – Brasil. CEP: 31270-901.

E-mail: coep@prpq.ufmg.br. Tel: 34094592.

III. Ficha Clínica

Número de Identificação _____

Data da inclusão ____/____/____

Assinou TCLE? () Sim () Não

Coleta de amostra? () Sim () Não

() LES juvenil () LES adulto () Controle

1. IDENTIFICAÇÃO:

1.1 Identificação:

1.2 Sexo: () Masculino () Feminino

1.3 Data de Nascimento: ____/____/____

1.4 Idade (em anos): _____

1.5 Telefone de contato: (____) _____

1.6 Procedência: _____ Estado: _____

1.7 Naturalidade: _____ Estado: _____

1.8 Anos de estudo: () Sem instrução () 1 a 3 () 4 a 7 () 8 a 10 () 11 a 14

() 15 ou mais () Não determinados

1.9 Classificação étnico-racial: () branca () preta () parda () amarela ()
indígena

2. CRITÉRIOS CLASSIFICATÓRIOS

2.1 Critérios LES: () SLICC 2012 () ACR/EULAR 2019

2.2 Tempo do diagnóstico (em anos): _____

2.3 Idade ao diagnóstico (em anos): _____

2.4 Idade do início dos sintomas (em anos): _____

2.4 Data da primeira consulta: ____/____/____

3. COMORBIDADES

3.1 Hipertensão arterial sistêmica () Sim () Não

3.2 Diabetes mellitus () Sim () Não

3.3 Obesidade () Sim () Não

3.4 Dislipidemia () Sim () Não

3.5 Doença renal crônica não dialítica () Sim () Não

3.6 Doença aterosclerótica () Sim () Não () Não avaliada

3.6.1 Definida: () Sim () Não

3.6.1.1 Doença arterial coronariana () Sim () Não

3.6.1.2 Doença cerebrovascular () Sim () Não

3.6.2.3 Doença arterial periférica () Sim () Não

3.6.2 Subclínica: () Sim () Não

3.6.2.1 Doença carotídea () Sim () Não

3.6.2.2 Doença aórtica () Sim () Não

3.7 Tabagismo () Sim () Não _____ anos/maço

3.8 Etilismo (> 3 doses por dia ou mais de 21 doses por semana) () Sim () Não

3.9 Sedentarismo (IPAQ) () Sim () Não

3.10 Síndrome antifosfolípide () Sim () Não

3.10.1 Evento clínico (critério) () Sim () Não

3.10.1.1 () Arterial: () Sim () Não Local: _____

3.10.1.1.1 () Periférico

3.10.1.1.2 () Cerebral Território: _____

3.10.1.2 () Venoso: () Sim () Não Local: _____

3.10.1.2.1 () Trombose venosa profunda

3.10.1.2.2 () Embolia pulmonar

3.10.1.2.3 () Outro: _____

3.10.2 Evento gestacional (critério) () Sim () Não

3.11 Outras doenças autoimunes: _____

4. DADOS ANTROPOMÉTRICOS

Peso (em kg): _____ Altura (em cm): _____

Circunferência abdominal (em cm): _____ Quadril (em cm): _____

Relação cintura/quadril _____

5. TRATAMENTO ATUAL

Medicamento	Sim	Não	Pulso	Início
5.1 Hidroxicloroquina			() NA	___/___/___
5.2 Dif. de cloroquina			() NA	___/___/___

5.3 Prednisona			() NA	___/___/___
5.4 Metilprednisolona			() Sim () Não	___/___/___
5.5 Ciclofosfamida			() Sim () Não	___/___/___
5.6 Metotrexato			() NA	___/___/___
5.7 Ciclosporina			() NA	___/___/___
5.8 Azatioprina			() NA	___/___/___
5.9 Micofenolato			() NA	___/___/___
5.10 Rituximabe			() NA	___/___/___
5.11 Belimumabe			() NA	___/___/___

Prednisona () $\leq 7,5\text{mg}$ () $> 7,5\text{mg}$

Dose estável de imunossupressor () Sim () Não

6. TRATAMENTO PRÉVIO

Medicamento	Sim	Não	Tempo de uso (em meses)
6.1 Ciclofosfamida			
6.2 Metotrexato			
6.3 Ciclosporina			
6.4 Azatioprina			
6.5 Micofenolato			
6.6 Rituximabe			
6.7 Belimumabe			

a. Dose acumulada de prednisona ou equivalente: _____ mg

b. Dose acumulada de ciclofosfamida: _____ mg

c. Anos de antimalárico: _____ anos

7. HISTÓRIA ATUAL

8.1 Cutaneomucosa () Sim () Não

8.2 Articular () Sim () Não

8.3 Hematológico () Sim () Não

8.4 Nefrite () Sim () Não

8.4.1 Clearance de creatinina estimado (CKD-EPI): _____
mL/min/1.73m² (Disponível em: <https://arquivos.sbn.org.br/equacoes/link/>)

8.4.2 Maior proteinúria de 24h neste episódio: _____ mg

8.5 Neuropsiquiátrico () Sim () Não

8.6 Exacerbação () Sim () Não

8.7 Atividade crônica persistente () Sim () Não

8.7.1 Há quanto tempo (em meses): _____

8.8 Remissão clínica e laboratorial () Sim () Não

8.8.1 Há quanto tempo (em meses): _____

8.9 Baixa atividade de doença sustentada (por, pelo menos, 2 visitas) () Sim () Não

8.9.1 Há quanto tempo (em meses): _____

8. HISTÓRIA PRÉVIA

9.1 Cutaneomucosa () Sim () Não

9.2 Articular () Sim () Não

9.3 Hematológico () Sim () Não

9.4 Nefrite () Sim () Não

9.4.1 Número de recidivas: _____ Data do primeiro episódio: __/__/__

9.4.2 Síndrome Nefrótica () Sim () Não

9.4.3 Alteração da função renal () Sim () Não

9.5 Neuropsiquiátrico () Sim () Não

Número de episódios: _____ Data do primeiro episódio: __/__/__

9.6 Total de exacerbações desde o diagnóstico: _____

IV. SLEDAI-2K

Convulsão: início recente, excluídas causas metabólicas, infecciosas ou medicamentosas	8 pts
Psicose: alucinações, incoerência, pensamento de conteúdo pobre, pensamento ilógico, comportamento bizarro, desorganizado ou catatônico, excluída uremia ou causas medicamentosas	8 pts
Síndrome cerebral orgânica: comprometimento da orientação, memória ou inteligência com flutuação da consciência de rápida evolução, incluindo pensamento nebuloso, perda da capacidade de foco, incapacidade de manter a atenção, com pelo menos 2 dos seguintes: distúrbio de percepção, discurso incoerente, insônia, sonolência diurna, agitação psicomotora, excluídas causas metabólicas, infecciosas ou medicamentosas	8 pts
Distúrbio visual: alterações retinianas incluindo corpos citoides, hemorragias, exsudatos, neurite óptica, excluídos retinopatia hipertensiva, infecção ou medicamentos	8 pts
Distúrbio de nervo craniano: neuropatia motora ou sensitiva nova envolvendo pares cranianos	8 pts
Cefaleia: cefaleia grave persistente, que não responde à terapia com opioides	8 pts
Acidente cerebrovascular: evento novo, desde que excluída doença aterosclerótica	8 pts
Vasculite: ulceração, gangrena, nódulos dolorosos em dígitos, infarto periungueal ou biópsia ou arteriografia comprovando vasculite	8 pts
Artrite: mais de 2 articulações com dor e sinais de inflamação – dor, edema ou derrame	4 pts
Miosite: fraqueza muscular proximal com elevação de CPK/aldolase ou alterações à eletromiografia ou biópsia mostrando miosite	4 pts
Cilindros urinários: cilindros hemáticos	4 pts
Hematúria: >5 hemácias/campo excluídas nefrolitíase, infecção ou outras causas	4 pts
Proteinúria: >500mg/24h, início novo ou aumento \geq 500mg/24h	4 pts
Piúria: > 5 leucócitos/campo, excluída infecção	4 pts

Rash novo: aparecimento ou recorrência de rash inflamatório típico	2 pts
Alopecia: aparecimento ou recorrência de alopecia	2 pts
Úlceras mucosas: aparecimento ou recorrência de úlceras mucosas	2 pts
Pleurisia: dor pleurítica ou atrito ou derrame ou espessamento pleural	2 pts
Pericardite: dor pericárdica com pelo menos 2 dos seguintes: derrame, atrito ou confirmação eletrocardiográfica	2 pts
Redução de complemento: redução de C3, C4 e/ou CH50	2 pts
Aumento de anti-DNA nativo	2 pts
Febre: >38°C, excluídas causas infecciosas	1 pt
Plaquetopenia: <100.000/mm³	1 pt
Leucopenia: <3.000/mm³, excluídas causas medicamentosas	1 pt

V. SLICC Damage Index (SLICC-DI)

Ocular	
Catarata em qualquer olho, primária ou secundária à corticoterapia, documentada por oftalmoscopia	1
Alteração retiniana documentada por oftalmoscopia OU	1
Atrofia óptica documentada por exame oftalmológico	1
Neuropsiquiátrico	
Disfunção cognitiva (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 caracterizada por delírios, alucinações auditivas ou visuais, incoerência, perda de associação de ideias, empobrecimento de ideias, pensamento ilógico, comportamento bizarro, desorganizado ou catatônico	1
Convulsões caracterizadas por movimentos tônico e clônicos, requerendo terapia anticonvulsivante por mais de 6 meses	1
Acidente vascular encefálico que resulte em achados focais como parestesia e fraqueza ou ressecção cirúrgica por outras causas, exceto malignidade (escore 2 se mais de um evento)	1 (2)
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 ou urinário)	1
Renal	
Taxa de filtração glomerular < 50%	1
Proteinúria > 3,5g/24h OU	1
Insuficiência renal terminal (mesmo em diálise ou transplante)	1
Pulmonar	
Hipertensão pulmonar (proeminência de VD ou ausculta em foco pulmonar)	1
Fibrose pulmonar (radiografia e exame físico)	1

Síndrome do pulmão encolhido (radiografia)	1
Fibrose pleural	1
Infarto pulmonar (radiografia), ressecção por outra causa que não malignidade	1
Cardiovascular	
Angina pectoris ou angioplastia	1
Infarto agudo do miocárdio documentado por eletrocardiograma e perfil enzimático (escore 2 se mais de um evento)	1 (2)
Miocardiopatia (disfunção ventricular documentada clinicamente)	1
Doença valvular (sopro diastólico ou sistólico 3/6)	1
Pericardite por 6 meses ou pericardiectomia	1
Vascular periférico	
Claudicação persistente por mais de 6 meses	1
Perda tecidual menor (perda de polpa tecidual)	1
Perda tecidual significativa (p. ex. perda digital ou de membro) (escore 2 se mais de um sítio)	1 (2)
Trombose venosa com edema, ulceração ou evidência clínica de estase venosa	1
Gastrointestinal	
Infarto ou ressecção intestinal abaixo do duodeno, baço, fígado ou vesícula biliar por qualquer causa (escore se mais de um sítio)	1 (2)
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 do trato gastrointestinal superior como correção da constricção, cirurgia de úlcera etc., ou história de insuficiência pancreática requerendo reposição enzimática ou por pseudocisto	1
Musculoesquelético	

Atrofia muscular ou fraqueza muscular, demonstradas pelo exame físico	1
Atrite deformante ou erosiva (incluindo deformidades redutíveis e excluindo osteonecrose) no exame físico	1
Osteoporose com fratura ou colapso vertebral (excluindo-se osteonecrose) demonstrada radiograficamente	1
Osteonecrose demonstrada por qualquer técnica de imagem (escore 2 se mais de um sítio)	1 (2)
Osteomielite documentada clinicamente e confirmada por cultura ou ruptura tendínea	1
Dermatológico	
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	1
Falência gonadal prematura	
Amenorreia secundária antes dos 40 anos de idade	1
Diabetes	
Requerendo tratamento e independente deste	1
Malignidade	
Documentada por exame histopatológico, excluindo displasia (escore 2 se mais de um sítio)	1 (2)

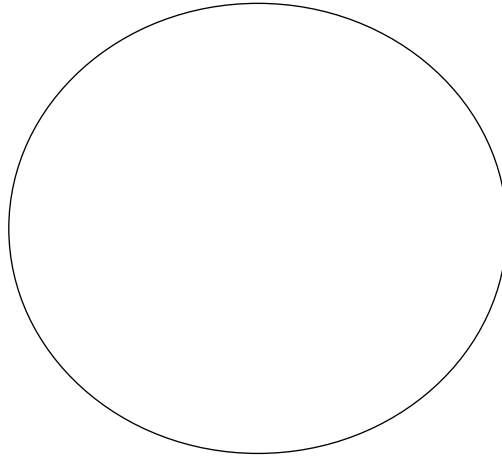
VI. Mini Exame do Estado Mental (MEEM)

Orientação Temporal (05 pontos) Dê um ponto para cada ítem	Ano
	Mês
	Dia do mês
	Dia da semana
	Semestre / Hora aproximada
Orientação Espacial (05 pontos) Dê um ponto para cada ítem	Estado
	Cidade
	Bairro ou nome de rua próxima
	Local geral: que local é este aqui (apontando ao redor num sentido mais amplo: hospital, casa de repouso, própria casa)
	Andar ou local específico: em que local nós estamos (consultório, dormitório, sala, apontando para o chão)
Registro (3 pontos)	Repetir: GELO, LEÃO e PLANTA
Atenção e Cálculo (5 pontos) Dê 1 ponto para cada acerto.	Subtrair $100 - 7 = 93 - 7 = 86 - 7 = 79 - 7 = 72 - 7 = 65$
Memória de Evocação (3 pontos)	Quais os três objetos perguntados anteriormente?
Nomear dois objetos (2 pontos)	Relógio e caneta
Repetir (1 ponto)	“NEM AQUI, NEM ALI, NEM LÁ”
Comando de estágios (3 pontos) Dê 1 ponto para cada ação correta)	“Apanhe esta folha de papel com a mão direita, dobre-a ao meio e coloque-a no chão”
Ler a frase e fazer o que ela pede (1 ponto)	FECHE SEUS OLHOS
Escrever uma frase (1 ponto)	“Escreva alguma frase que tenha começo, meio e fim”
Copiar diagrama (1 ponto)	Copiar dois pentágonos com interseção

VII. Teste do Relógio de Schulman

“Desenhe um relógio com todos os números e marcando 11:10”

0	Inabilidade absoluta em representar o relógio
1	O desenho tem algo a ver com o relógio, mas com desorganização visual e espacial grave
2	Desorganização visual e espacial moderada que leva a uma marcação de hora incorreta, perseveração, confusão esquerda-direita, números faltando, números repetidos, sem ponteiros, com ponteiros em excesso
3	Distribuição visual e espacial correta com marcação errada da hora
4	Pequenos erros espaciais com dígitos e hora corretos
5	Relógio perfeito



VIII. Lista de Palavras do CERAD

1ª Tentativa	2ª Tentativa	3ª Tentativa
Manteiga	Praia	Cabana
Braço	Braço	Bilhete
Carta	Cabana	Poste
Rainha	Manteiga	Rainha
Cabana	Poste	Motor
Rainha	Motor	Carta
Poste	Erva	Erva
Bilhete	Rainha	Braço
Erva	Bilhete	Manteiga
Motor	Carta	Praia

IX. Depression, Anxiety, Stress Scale (DASS21)

Por favor, leia cada afirmativa e marque um dos números (0, 1, 2 ou 3) que indique quanto a afirmativa aconteceu com você na última semana. Não há respostas certas ou erradas. Não gaste muito tempo em nenhuma das alternativas.

0= não aconteceu comigo na última semana

1= aconteceu comigo algumas vezes na última semana

2= aconteceu comigo em boa parte do tempo na última semana

3= aconteceu comigo na maior parte do tempo na última semana

Pergunta	0	1	2	3
1. Eu tive dificuldade de me acalmar				
2. Eu percebi que estava com a boca seca				
3. Eu não conseguia ter sentimentos positivos				
4. Eu tive dificuldade para respirar (por exemplo, tive respiração muito rápida ou falta de ar sem ter feito esforço físico)				
5. Foi difícil ter iniciativa para fazer as coisas				
6. Em geral, tive reações exageradas às situações				
7. Tive tremores (por exemplo, nas mãos)				
8. Eu senti que estava bastante nervoso (a)				
9. Eu fiquei preocupado (a) com situações em que poderia entrar em pânico e fazer papel de bobo (a)				
10. Eu senti que não tinha expectativas positivas a respeito de nada				
11. Notei que estava ficando agitado (a)				
12. Achei difícil relaxar				
13. Eu me senti abatido (a) e triste				
14. Eu não tive paciência com coisas que interromperam o que estava fazendo				
15. Eu senti que estava prestes a entrar em pânico				
16. Não consegui me empolgar com nada				
17. Eu senti que não tinha muito valor como pessoa				
18. Eu senti que estava muito irritado (a)				
19. Eu percebi as batidas do meu coração mais aceleradas sem ter feito esforço físico (por exemplo, a sensação de aumento dos batimentos cardíacos ou de que o coração estava batendo fora do ritmo)				
20. Eu me senti assustado (a) sem ter motivo				
21. Eu senti que a vida não tinha sentido				

X. Functional Assessment Chronic Illness Therapy – Fatigue Scale

Abaixo encontrará uma lista de afirmações que outras pessoas com a sua doença disseram ser importante.

Por favor, circunde ou marque um número em cada uma das linhas para indicar a resposta que melhor corresponde ao seu estado durante os últimos 7 dias.

Pergunta	Nem um pouco	Um pouco	Mais ou menos	Muito	Muitíssimo
Sinto-me fatigado (a)	0	1	2	3	4
Sinto fraqueza generalizada	0	1	2	3	4
Sinto-me sem forças (sem vontade para nada)	0	1	2	3	4
Sinto-me cansado (a)	0	1	2	3	4
Tenho dificuldade em começar as coisas porque estou cansado (a)	0	1	2	3	4
Tenho dificuldade em terminar as coisas porque estou cansado (a)	0	1	2	3	4
Tenho energia	0	1	2	3	4
Sou capaz de fazer as minhas atividades normais	0	1	2	3	4
Preciso dormir durante o dia	0	1	2	3	4
Estou cansado (a) demais para comer	0	1	2	3	4
Preciso de ajuda para as minhas atividades normais	0	1	2	3	4
Estou frustrado (a) por estar cansado (a) demais para fazer as coisas que quero	0	1	2	3	4
Tenho de limitar a minha vida social por estar cansado (a)	0	1	2	3	4

XI. Questionário Internacional de Atividade Física – IPAQ Versão Curta

Nós estamos interessados em saber que tipo de atividade física as pessoas fazem como parte do seu dia-a-dia. As perguntas estão relacionadas ao tempo que você gasta fazendo atividade física na ÚLTIMA semana. As perguntas incluem as atividades que você faz no trabalho, para ir de um lugar a outro, por lazer, por esporte, por exercício ou como parte das suas atividades em casa ou no jardim.

Para responder as questões lembre-se de que:

$\frac{3}{4}$ das atividades físicas VIGOROSAS são aquelas que precisam de um grande esforço físico e que fazem respirar MUITO mais forte que o normal

$\frac{3}{4}$ das atividades físicas MODERADAS são aquelas que precisam de algum esforço físico e que fazem respirar UM POUCO mais forte que o normal.

Por favor responda cada questão mesmo que considere que não seja ativo.

Para responder as perguntas pense somente nas atividades que você realiza por pelo menos 10 minutos contínuos de cada vez.

1a. Em quantos dias da última semana você CAMINHOU por pelo menos 10 minutos contínuos em casa ou no trabalho, como forma de transporte para ir de um lugar para outro, por lazer, por prazer ou como forma de exercício?	dias _____ por SEMANA () Nenhum
1b. Nos dias em que você caminhou por pelo menos 10 minutos contínuos quanto tempo no total você gastou caminhando por dia?	Horas: _____ Min: _____ () NA
2a. Em quantos dias da última semana, você realizou atividades MODERADAS por pelo menos 10 minutos contínuos, como por exemplo pedalar leve na bicicleta, nadar, dançar, fazer ginástica aeróbica leve, jogar vôlei recreativo, carregar pesos leves, fazer serviços domésticos na casa, no quintal ou no jardim como varrer, aspirar, cuidar do jardim, ou qualquer atividade que fez aumentar a respiração ou batimentos do coração (POR FAVOR NÃO INCLUA CAMINHADA).	dias _____ por SEMANA () Nenhum

2b. Nos dias em que você fez essas atividades moderadas por pelo menos 10 minutos contínuos, quanto tempo no total você gastou fazendo essas atividades por dia?	Horas: _____ Min: _____ () NA
3a. Em quantos dias da última semana, você realizou atividades VIGOROSAS por pelo menos 10 minutos contínuos, como por exemplo correr, fazer ginástica aeróbica, jogar futebol, pedalar rápido na bicicleta, jogar basquete, fazer serviços domésticos pesados em casa, no quintal ou cavoucar no jardim, carregar pesos elevados ou qualquer atividade que fez aumentar MUITO sua respiração ou batimentos do coração.	dias _____ por SEMANA () Nenhum
3b. Nos dias em que você fez essas atividades vigorosas por pelo menos 10 minutos contínuos quanto tempo no total você gastou fazendo essas atividades por dia?	Horas: _____ Min: _____ () NA
<p>Estas últimas questões são sobre o tempo que você permanece sentado todo dia, no trabalho, na escola ou faculdade, em casa e durante seu tempo livre. Isto inclui o tempo sentado estudando, sentado enquanto descansa, fazendo lição de casa visitando um amigo, lendo, sentado ou deitado assistindo TV. Não inclua o tempo gasto sentado durante o transporte em ônibus, trem, metrô ou carro.</p>	
4a. Quanto tempo no total você gasta sentado durante um dia de semana?	dias _____ por SEMANA () Nenhum
4b. Quanto tempo no total você gasta sentado durante em um dia de final de semana?	Horas: _____ Min: _____ () NA

10. ANEXOS

I. Folha de Aprovação no Comitê de Ética e Pesquisa

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO COMPARATIVO DO COMPRIMENTO DOS TELÔMEROS EM ADULTOS COM DOENÇAS REUMÁTICAS IMUNOMEDIADAS

Pesquisador: Gilda Aparecida Ferreira

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 50147321.9.0000.5149

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas - Universidade Federal de Minas Gerais

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

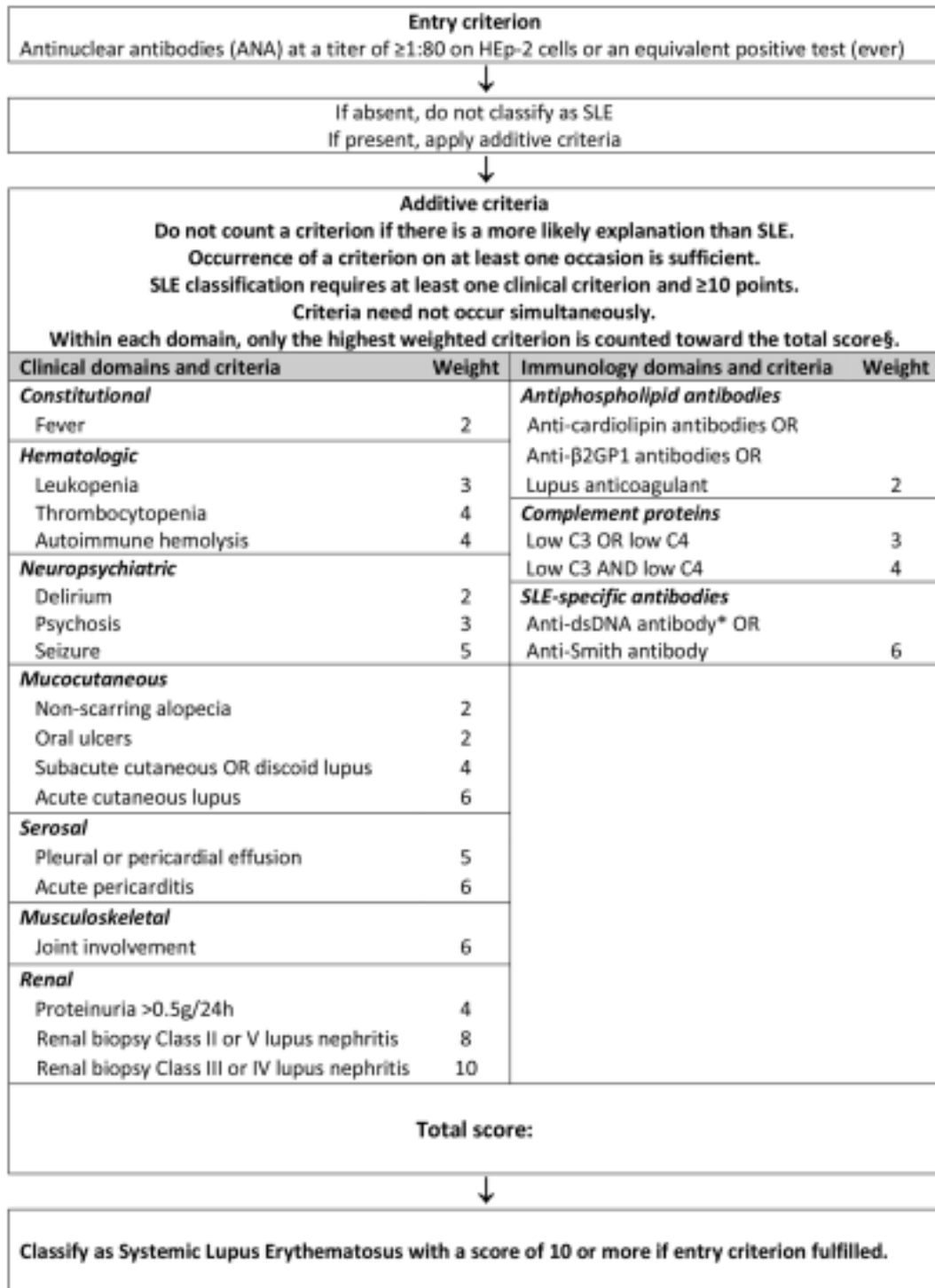
Número do Parecer: 4.922.592

Apresentação do Projeto:

Envelhecimento ou aging é definido como o processo de degeneração progressiva e declínio funcional de órgãos e tecidos, incluindo o sistema imune [1,2,3]. O envelhecimento do sistema imune ou imunossenescência é um processo que se inicia após o nascimento e se acelera após a puberdade, devido ao declínio da função do timo. A consequência disto é o comprometimento da resposta imune a novos antígenos, resposta vacinal prejudicada e maior susceptibilidade a infecções e neoplasias, além de uma menor habilidade para distinguir antígenos próprios de antígenos não-próprios (quebra de auto tolerância) [1,2,3]. Para que ocorra a seleção e o desenvolvimento dos linfócitos T, primeiramente, é necessária uma seleção negativa feita pelos timócitos, em que linfócitos T auto reativos são depletados via apoptose. Segundo, há produção de linfócitos T regulatórios (Treg CD4+FoxP3+), cuja função principal é balancear eventuais imperfeições no mecanismo de deleção dos linfócitos T auto reativos. Além disso, mudanças fenotípicas no repertório de células imunes acontecem, com diminuição de células T naïves (CD45RA+CD45RO-), aumento de células T de memória (CD45RA-CD45RO+), com expansão oligo clonal devido à estimulação antigênica ao longo da vida [1,2,3]. Um segundo aspecto relacionado ao envelhecimento do sistema imune é o processo chamado inflammaging. Inflammaging denota elevada auto reatividade que resulta em um estado pró-inflamatório de baixo grau mas acima do normal, levando a um fenótipo chamado de fenótipo secretório associado à senescência (do inglês SASP – senescence-associated secretory phenotype), predispondo indivíduos senescentes a

Endereço: Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 2º. Andar 2 Sala 2005 2 Campus Pampulha
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

II. Critérios Classificatórios *European League Against Rheumatism / American College of Rheumatology* (EULAR / ACR) de 2019



III. Functional Assessment of Chronic Illness Therapy (FACIT) Licensing



PROVIDING A VOICE FOR PATIENTS WORLDWIDE

FUNCTIONAL ASSESSMENT OF CHRONIC ILLNESS THERAPY (FACIT) LICENSING AGREEMENT

The Functional Assessment of Chronic Illness Therapy System of Quality of Life questionnaires and all related subscales, translations, and adaptations ("FACIT System") are owned and copyrighted by David Cella, Ph.D. The ownership and copyright of the FACIT System resides strictly with Dr. Cella. Dr. Cella has granted FACIT.org ("Licensor") the right to license usage of the FACIT System to other parties. Licensor represents and warrants that it has the right to grant the License contemplated by this agreement to the party listed below ("Licensee") for use of the measure and languages listed below in the study listed below ("Study"). This license is applicable for individual and/or academic researchers working on a not-for-profit research project.

Name ("Licensee"): Anna Tavares

Measurement: FACIT-F, FACIT-Fatigue Scale

Language(s): Portuguese

Study Title ("Study"): COMPARATIVE STUDY OF THE LENGTH OF TELOMERE IN ADULTS WITH IMMUNOMEDIATED RHEUMATIC DISEASES

This current license is only extended to Licensee's Study subject to the following terms:

- 1) Licensee agrees to provide Licensor with copies of any publications resulting from this study or produced as a result of collecting data with any FACIT questionnaire.
- 2) Due to the ongoing and evolving nature of questionnaire development, treatment modalities and cross-cultural linguistic research, Licensor reserves the right to make adaptations or revisions to wording in the FACIT, and/or related translations as necessary. If such changes occur, Licensee will have the option of using either previous or updated versions according to their own research objectives.
- 3) Licensee may not change the wording or phrasing of any FACIT document without previous permission from Licensor. If any changes are made to the wording or phrasing of any FACIT item without permission, the document cannot be considered the FACIT, and subsequent analyses and/or comparisons to other FACIT data will not be considered appropriate. Permission to use the name "FACIT" will not be granted for any unauthorized translations of the FACIT items. Any analyses or publications of unauthorized changes or translated versions may not use the FACIT name. Any unauthorized translation will be considered a violation of copyright protection.
- 4) In all publications and on every page of the FACIT used in data collection, Licensor requires the copyright information be listed precisely as it is listed on the questionnaire itself.
- 5) This license is not extended to electronic data capture by third party vendors of Licensee. Electronic versions by third party vendors of the FACIT questionnaires are considered derivative works and are not covered under this license. Permission for a third party to migrate and administer the FACIT electronically must be covered under separate agreement between the electronic data capture vendor



PROVIDING A VOICE FOR PATIENTS WORLDWIDE

and FACIT.org

- 6) In no case may any FACIT questionnaire be placed on the internet without password protection. To do so is considered a violation of copyright.
- 7) Licensor reserves the right to withdraw this license if Licensee engages in scientific or copyright misuse of the FACIT system of questionnaires.
- 8) There are no fees associated with this license.
- 9) This license is effective for two years upon the date of signature. If Licensee requires an extension beyond this 2-year period, Licensee must contact Licensor and obtain an extension.

Signature: ANNA CAROLINA F M GOMES
ANNA CAROLINA F M GOMES (Apr 30, 2021 12:45 ADT)

Email: annacgtavares@gmail.com