

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CLÍNICA MÉDICA

MARIA MERCEDES CARACCILO PICARELLI

AVALIAÇÃO DA RIGIDEZ ARTERIAL E COMPRIMENTO DE TELÔMEROS
NA ARTRITE IDIOPÁTICA JUVENIL

Porto Alegre
2016

FACULDADE DE MEDICINA

**AVALIAÇÃO DA RIGIDEZ ARTERIAL E
COMPRIMENTO DE TELÔMEROS NA
ARTRITE IDIOPÁTICA JUVENIL**

AUTORA: MARIA MERCEDES CARACCIOLO PICARELLI

ORIENTADOR: MARCUS HERBERT JONES

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde
da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do
Sul, para a obtenção do título de Mestre em Medicina

Porto Alegre, Março 2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

P586a Picarelli, Maria Mercedes Caracciolo

Avaliação da rigidez arterial e comprimento de telômeros em artrite idiopática juvenil / Maria Mercedes Caracciolo Picarelli. – Porto Alegre, 2016.

85 f.: il. tab.

Diss. (Mestrado em Medicina e Ciências da Saúde - Faculdade de Medicina, PUCRS).

Orientador: Marcus Herbert Jones.

1. Medicina. 2. Artrite Juvenil. 3. Rigidez Vascular.
4. Telômero. I. Jones, Marcus Herbert. II. Título.

CDD 616.72
CDU 616.72-002
NLM WE 344-346

**Ficha Catalográfica elaborada por Vanessa Pinent
CRB 10/1297**

MARIA MERCEDES CARACCILO PICARELLI

Avaliação da Rigidez Arterial e Comprimento de Telômeros na
Artrite Idiopática Juvenil

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde
da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do
Sul, para a obtenção do título de Mestre em Medicina

Aprovada em: _____ de _____ de _____

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Henrique Luiz Staub – Reumatologia

Dr. Luis Carlos Bodanese – Cardiologia

Dra. Iloite Maria Scheibel – Reumatologia Pediátrica

Dedico essa dissertação à minha filha, Sofia Picarelli Danzmann.

AGRADECIMENTOS

- À minha amada filha, Sofia Picarelli Danzmann, pela compreensão e apoio durante essa jornada e pela ajuda na confecção do termo de assentimento.
- Ao meu companheiro, Luiz Cláudio Danzmann, pelo amor, paciência, compreensão e apoio sem os quais não seria possível enfrentar essa jornada.
- À minha mãe, Maria Del Carmen Caracciolo Sghirla, pelo amor, incentivo e atenção dispensados a mim por toda uma vida.
- Ao meu pai, José Rodrigues Picarelli, que me ensinou o amor ao conhecimento e postura ética.
- À minha irmã, Maria Gabriela Caracciolo Picarelli, pela sua lucidez e apoio em todos os momentos difíceis da minha vida e pela revisão da escrita da dissertação.
- Ao meu médico, Dr. Marco Aurélio Albuquerque, pela atenção e apoio imprescindíveis ao longo de 16 anos.
- Aos meus mestres, Dr. Mauro Keiserman, Dra. Inês Guimarães Silveira, Dr. Henrique Staub e Dr. Marcus Franck que despertaram em mim o amor pela Reumatologia, pelo exemplo de postura ética e científica e por me darem a oportunidade de trabalhar com as crianças com enfermidades reumáticas.
- Às secretárias do Serviço de Reumatologia, Heidi Medina e Lourdes Dias pelo apoio constante durante essa trajetória.
- À minha amiga, Desirée Porto dos Santos Vargas, pelo apoio nos momentos difíceis, pelas boas risadas e pela ajuda com as coletas.
- Aos residentes do Serviço de Reumatologia, atuais e antigos, pela convivência e pelos ensinamentos.
- Ao Dr. Renato Stein e ao Dr. Marcus Jones pela oportunidade de fazer a pós-graduação.

- À Dra. Florência Barbé-Tuana e ao biólogo Lucas Kich Grun que realizaram a avaliação dos telômeros, parte fundamental dessa pesquisa.
- Aos funcionários do Ambulatório de Pediatria do Hospital São Lucas da PUCRS, secretárias e coletadores, pela ajuda durante esse processo.
- Aos meus pacientes, adultos e crianças, por tudo o que me ensinaram.

“A questão não é atingir a perfeição, mas sim a totalidade”.

Carl Gustav Jung, (1875 – 1961)

Introdução: os avanços na terapêutica da artrite idiopática juvenil (AIJ) promoveram o prolongamento da sobrevida livre de doença. A doença cardiovascular (DCV) pode emergir como importante causa de morbimortalidade. A velocidade de onda de pulso (VOP) e o comprimento de telômeros (TL) são vistos como potenciais preditores de DCV. Há evidências crescentes da importância do papel da atividade inflamatória crônica e persistente nesses processos. VOP e TL são potenciais preditores precoces de DCV e seus desfechos.

Objetivo: Avaliar a VOP e TL em uma amostra de pacientes com AIJ, sem fatores de risco para DCV, compará-los com um grupo de indivíduos saudáveis pareados por sexo e idade e testar a correlação destas variáveis.

Pacientes e Métodos: 24 pacientes com AIJ e 21 controles para TL e 20 controles para VOP foram incluídos. A VOP foi estimada por um equipamento de análise oscilométrica (CardioSDyna – MAPA +). O TL foi avaliado através da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR). A atividade inflamatória foi medida através do *Juvenile Disease Activity Score* (JADAS-27). Pacientes com obesidade, hipertensão arterial sistêmica, *diabetes mellitus* e perda de função renal e outras doenças inflamatórias foram excluídos.

Resultados: Foram incluídos os subtipos oligoarticular (65, 2%) e poliarticular, sendo que 73,9% eram meninas, 82,6% eram caucasianos. A média de idade foi $15,5 \pm 6,3$ anos e a mediana de duração da doença foi de 9 [5-19] anos. Entre casos e controle para TL, houve diferença significativa em relação à idade e não foi encontrada diferença quanto a sexo, etnia, IMC, peso e altura. A mediana do JADAS foi 8 [0,00 – 20,1], considerado ativo acima de 1. Os valores da VOP foram normais em todos os pacientes ($5,1 \pm 0,2$ vs. $4,98 \pm 0,06$ m/s) ($P = 0,66$). TL expresso pela razão T/S (produto da amplificação dos telômeros e gene de cópia única) estava reduzido nos pacientes com AIJ ($0,85 \pm 0,34$ vs. $1,67 \pm 1,38$), Teste de Mann-Whitney: $P=0,025$. Quando ajustado para idade através da ANCOVA, a diferença permaneceu significativa ($P=0,032$). Não houve correlação entre TL e idade ($P=0,449$, $r=0,166$), sexo ($P=0,521$), duração da doença ($P=0,358$, $r=-0,318$), JADAS ($P=0,184$, $r=-0,287$) e VOP ($P=0,843$, $r=0,044$) em crianças com AIJ.

Conclusão: O TL foi significativamente menor nessa amostra de pacientes com AIJ de longa duração e com atividade da doença alta a moderada e sem fatores de risco para doença cardiovascular em comparação aos controles. A VOP foi normal e sem diferença significativa em relação aos controles. Não foram observadas correlações significativas do TL ou do VOP com atividade e duração da doença, idade e sexo.

Palavras-chaves: artrite idiopática juvenil, rigidez arterial, velocidade de onda de pulso, comprimento de telômeros.

Introduction: Recent advances in juvenile idiopathic arthritis (AIJ) treatment promoted free disease survival. Cardiovascular disease (DCV) may emerge as an important cause of morbidity and mortality. Pulse wave velocity (VOP) and telomere length (TL) are considered as potential predictors of cardiovascular DCV. There are growing evidences of chronic and persistent inflammatory activity role on these processes. VOP and TL are potential early predictors of DCV and its outcomes.

Objective: Access VOP and TL in a sample of AIJ patients, without cardiovascular risk factors, compare them with a group of healthy individuals sex and age matched and to test the correlation of these variables.

Patients and Methods: 24 AIJ patients and 21 controls for TL and 20 controls for VOP were included. VOP was estimated by an oscillometric device (CardioSDyna – MAPA +). TL was accessed by polimerase chain reaction in real time (qPCR). Inflammatory activity was accessed by *Juvenile Disease Activity Score* (JADAS-27). Obesity, systemic hypertension, *diabetes mellitus*, impaired renal function and other inflammatory diseases were excluded.

Results: Oligoarticular (65, 2%) and polyarticular subtypes were included, with 73,9% females and 82,6% were Caucasian. The average age was $15,5 \pm 6,3$ years and the median disease duration was 9 [5-19] years. Between cases and controls for LTL there was significant difference in age no differences in sex, ethnics and BMI. The JADAS median was 8 [0, 00 – 20, 1], considered active when above 1, 0. PWV was normal in all patients, JIA and control (5.1 ± 0.20 m/s vs. 4.98 ± 0.06 m/s, $P = 0, 66$). TL expressed by T/S ratio (amplification telomere product and single copy gene) was significantly reduced between JIA patients and controls ($0. 85 \pm 0, 34$ vs. $1, 67 \pm 1, 38$, Mann-Whitney test $P = 0.025$). When age adjusted by ANCOVA, the difference remained significant ($P= 0,032$). There was no correlation between TL and age ($P =0, 449$, $r=0, 166$), sex ($P=0, 521$), disease duration ($P =0, 358$, $r=-0, 318$), JADAS ($P = 0, 184$, $r=-0, 287$) e VOP ($P = 0, 843$, $r=0, 044$) in patients with AIJ.

Conclusions: TL was significantly shorter in long disease duration and high to moderate disease activity with no DCV risk factors AIJ patients and compared to controls. VOP was normal and no significant difference between controls were found. No correlations were observed between TL or VOP and disease duration, age and sex.

Key words: juvenile idiopathic arthritis, arterial stiffness, pulse wave velocity, telomere length.

Figura 1 - Esquema comparativo: artéria elástica versus artéria muscular.....	24
Figura 2 - A onda de pressão aórtica e seus componentes.....	24
Figura 3 - Comparativos entre os percentis 50 para PWV obtidos por diferentes aparelhos para meninos e meninas.....	28
Figura 4 - Percentis para PWV por idade apresentados separadamente para meninos e meninas.....	29
Figura 5 - (A) Linfócito T CD4 em metáfase com telômeros corados em vermelho Terminação telomérica 3' alongada pela telomerase. (B) complexo de proteínas ligadas aos telômeros (TBP: TRF 1, TRF 2, RAP 1, TIN 2, TPP 1 e POT1) ligadas a porção de fita dupla e a ancoragem da fita simples em formato de alça.....	31
Figura 6 - Avaliação do comprimento relativo de telômeros entre pacientes com AIJ e controles.....	56

Tabela 1 - Caracterização de casos e controles para TL.....	53
Tabela 2 - Caracterização da atividade da doença.....	54
Tabela 3 - Achados de velocidade de onda de pulso e pressão de pulso em AIJ e controles.....	55
Tabela 4 - Associação entre telômero e variáveis clínicas.....	57
Tabela 5 - Média e DP para velocidade de onda de pulso e razão T/S de leucócitos.....	57

AIJ – Artrite Idiopática Juvenil
ACR – American College of Rheumatology
EULAR – European League against Rheumatism
ILAR – International League against Rheumatism
UNICEF - United Nations Children's Fund
HLA - human Leukocyte Antigens
T Regs – células T regulatórias
Th 1 – T helper 1
IL-2 – Interleucina 2
TNF- α – fator de Necrose Tumoral alfa
AINE – anti-inflamatório não esteróide
DMARDs - disease-modifying antirheumatic drugs
RCTs – randomized Clinical Trials
IL-1 – Interleucina 1
JADAS - Juvenile Arthritis Disease Activity Score
Das28 – Disease Activity Score
SDAI – Simplified Disease Activity Index
CDAI - Clinical Disease Activity Index
VAS – Visual analogic scale
VSG – velocidade de sedimentação globular
FMD - função endotelial mediada por fluxo
CIMT- espessamento da camada íntima da carótida
PWV – pulse wave velocity
VOP – velocidade de onda de pulso
MMP – metaloproteinases
MCP-1 - proteína quimioatrativa para monócitos-1
TBP – telomere binding proteins
PCRq – quantitative proteinase chain reaction
Taq DNA polimerase – DNA polimerase termoestável
G – guanina
PP – pressão de pulso

Resumo.....	09
1 – Introdução.....	15
Etiologia.....	16
Patogênese.....	18
Tratamento.....	18
Avaliação da atividade da doença.....	19
A doença cardiovascular na AIJ.....	21
Rigidez arterial.....	23
Rigidez arterial e inflamação.....	27
Telômeros.....	30
Telômeros e doença cardiovascular.....	36
Telômeros e doença auto-imune.....	37
2 – Justificativa.....	39
3 – Hipótese.....	40
4 – Objetivo.....	41
5 – Materiais e Métodos.....	42
6 – Resultados.....	53
7 – Discussão.....	58
8 – Conclusão.....	64
9 – Bibliografia.....	65
10 – Anexos.....	73

1 – INTRODUÇÃO

Artrite idiopática juvenil (AIJ) consiste em um grupo de desordens geneticamente relacionadas, fenotipicamente distintas, imunoinflamatórias afetando as articulações e outras estruturas, possivelmente ativadas pelo contato com antígenos externos, de evolução crônica (JAMES T. CASSIDY, ROSS E PETTY, RONALD M. LAXER, 2011) (FEITOSA, 2001). Clinicamente, caracteriza-se por artrite crônica e manifestações extra-articulares iniciadas antes dos 16 anos de idade. É a desordem crônica inflamatória mais comum da infância e importante causa de incapacidade funcional em curto e longo prazo (JAMES T. CASSIDY, ROSS E PETTY, RONALD M. LAXER, 2011) (FEITOSA, 2001).

Trata-se de um assunto complexo e de difícil estudo tendo em vista as inconsistências de terminologia e classificação, que geraram debates durante todo século passado. As abordagens usadas pelo Colégio Americano de Reumatologia (ACR), artrite reumatóide juvenil, e pela European League Against Rheumatism (EULAR), artrite crônica da infância, só foram uniformizadas em 1997 quando a International League Against Rheumatism (ILAR) reuniu-se em Durban, África do Sul, e propôs o uso dos termos artrite idiopática juvenil para pacientes com menos de 16 anos de idade que manifestam artrite crônica, com uma evolução persistente mínima de seis semanas, nos quais se descartam outros diagnósticos, conforme abaixo:

Quadro 1: Proposta de classificação das Artrite idiopáticas Juvenis (Durban, África do Sul, 1997) (JAMES T. CASSIDY, ROSS E PETTY, RONALD M. LAXER, 2011).

-
1. *Artrite Sistêmica*
 2. *Poliartrite (fator reumatóide negativo)*
 3. *Poliartrite (fator reumatóide positivo)*
 4. *Oligoartrite: - Persistente*
- Estendida
 5. *Artrite relacionada com entesite*

6. Artrite psoríase

7. Outros:

- Não preenche nenhuma categoria de 1 a 6
- Preenche mais de uma categoria de 1 a 6

* A classificação do tipo de artrite deve ser feita após um período de acompanhamento de seis meses desde o início da enfermidade.

Desde então, esta tem sido a nomenclatura e a classificação adotadas internacionalmente e a que será adotada neste estudo. O subtipo oligoarticular é o mais comum, totalizando de 50 a 60% dos pacientes na maioria das coortes de AIJ, enquanto o subtipo poliarticular ocorre em 25 a 40% (RIGANTE, 2014).

Trata-se de uma condição não rara, porém sua verdadeira frequência não é conhecida. Ocorre em todo o mundo, mas suas prevalência e incidência variam consideravelmente, provavelmente devido a influências étnicas, ambientais e a variação imunogenética (JAMES T. CASSIDY, ROSS E PETTY, RONALD M. LAXER, 2011). Estima-se que existam de 1,7 a 8,4 milhões de crianças ao redor do mundo com AIJ, na maioria não diagnosticada. Segundo dados do Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF), a população abaixo dos 18 anos de idade na América Latina gira em torno de 190.000.000 de crianças, com a incidência de AIJ estimada em torno de 9880 a 19000/ano crianças e a prevalência em torno de 157.000 a 760.000 crianças (JAMES T. CASSIDY, ROSS E PETTY, RONALD M. LAXER, 2011). No Brasil, não existia qualquer estudo epidemiológico publicado. A única publicação é o estudo de Yamashita *et al*, que, em 2013, estudaram uma população de crianças de 6 a 12 anos no município de Embu das Artes, no Estado de São Paulo e encontraram uma prevalência de AIJ de 1/ 2280 ou 0,34/1000 crianças (YAMASHITA *et al.*,).

Etiologia

A etiologia da AIJ permanece desconhecida. A interação entre fatores ambientais e genéticos é aceito como o mecanismo mais relevante para o desenvolvimento desta condição (RIGANTE, 2014). Há um grande número de evidências mostrando imunidade alterada, imunoregulação anormal, produção aumentada de citocinas e polimorfismo dos genes envolvidos na resposta imune, suportando a hipótese de que a patogênese está intimamente associada ao sistema

imunológico (JAMES T. CASSIDY, ROSS E PETTY, RONALD M. LAXER, 2011). Mas, o ponto de partida da autoimunidade como consequência dessa interação, levando a AIJ, é ainda desconhecido (RIGANTE, 2014). Uma resposta genética peculiar a fatores ambientais, como infecções, com múltiplos genes envolvidos é sugerida (RIGANTE, 2014).

Jarvis *et al* demonstraram que os neutrófilos de pacientes com AIJ apresentam diferentes níveis de expressão de cerca de 700 genes comparados a controles normais (JARVIS *et al.*, 2006). Há observações consistentes da associação de AIJ e genes codificadores dos antígenos leucocitários humanos (HLA) em diferentes populações e de variantes genéticas fora do sistema HLA influenciando a suscetibilidade para AIJ (RIGANTE, 2014). Há vários estudos com familiares de pacientes com AIJ, mostrando prevalência aumentada em irmãos e gêmeos (OEN *et al.*, 1998), 15 a 30 vezes mais do que na população geral (PRAHALAD; GLASS, 2008). Ainda assim, os fatores genéticos não os únicos determinantes, como atestado pelas taxas de concordância entre gêmeos monozigóticos, estimados entre 25 a 40% (PRAHALAD; GLASS, 2008). Estima-se que o fator genético melhor caracterizado até o momento, o polimorfismo dos genes codificando o HLA-DR seja responsável por apenas 17% do risco de envolvimento entre irmãos com AIJ (PRAHALAD; GLASS, 2008), suportando a idéia de que a influência genética não é a única determinante desta condição.

O papel de agentes infecciosos também foi bastante estudado nos últimos anos. Vários estudos mostraram a relação de infecção viral persistente pelo parvovírus B19 em pacientes pediátricos com artrites crônicas, incluindo a AIJ (OGUZ *et al.*, 2002). Ainda assim, outros estudos falharam em mostrar esta relação (WEISSBRICH, 2007). Outros agentes como o vírus de Epstein-Barr, citomegalovírus, rubéola e agentes bacterianos como enterobactérias, *Chlamídia sp*, *Bartonella henselae*, *Mycoplasma pneumoniae* e estreptococo foram também estudados, porém com resultados inconclusivos (RIGANTE, 2014).

Outros fatores ambientais foram estudados por Shenoi *et al* em um estudo caso-controle com 225 pacientes com AIJ. Fatores como: tabagismo, infecções em fase precoce, animais de estimação, amamentação, área residencial e eventos estressantes não se mostraram associados ao aparecimento de AIJ. Os únicos fatores identificados nesta amostra de pacientes como potencialmente associados a

risco foram: sexo feminino, obesidade e prematuridade (SHENOI; SHAFFER; WALLACE, 2015).

Foi verificada uma diminuição da porcentagem de células T regulatórias (Tregs) em comparação com controles normais, achado de significado clínico ainda incerto (STELMASZCZYK-EMMEL et al., 2012). Os perfis de expressão genética em células mononucleares periféricas são distintos conforme o subtipo de AIJ e também variam dentro de um determinado subtipo dependendo da magnitude da atividade inflamatória (BARNES et al., 2009). Todos esses dados apontam na direção de uma resposta imunoinflamatória aberrante na AIJ (JARVIS et al., 2006).

Patogênese

O edema articular por acúmulo de líquido sinovial e espessamento da membrana sinovial, contendo a presença maciça de células inflamatórias, incluindo neutrófilos, plasmócitos, células dendríticas, e grande proporção de células T ativadas são característicos de todos os subtipos de AIJ (PRAHALAD; GLASS, 2008). O recrutamento dessas células pró-inflamatórias é mediado por citocinas, que de forma seletiva, atraem células T com perfil Th1, produzindo IL-2, interferon γ , e TNF- α , e que são as citocinas predominantes na sinóvia dos pacientes com AIJ.

A presença de auto-anticorpos contra antígenos nucleares, imunoglobulinas e outros antígenos é comum no soro de pacientes com AIJ, porém não há evidência da participação direta destes na patogênese da doença, podendo ser resultantes de resposta a epítomos expressos ou produzidos como resultado de inflamação e dano tecidual (JAMES T. CASSIDY, ROSS E PETTY, RONALD M. LAXER, 2011). O envolvimento do componente inato do sistema imune também é sugerido pela ativação de complemento e a grande quantidade de monócitos e neutrófilos na membrana sinovial (JARVIS et al., 2006). O somatório desses eventos, leva às lesões estruturais irreversíveis, responsáveis pelo comprometimento funcional desses pacientes.

Tratamento

Atualmente, a combinação de terapias possibilitou uma melhora na perspectiva de vida desses pacientes (STOLL; CRON, 2014). A antiga pirâmide de tratamento foi substituída por uma tríade, que combina antiinflamatórios não-esteróides (AINE) e

corticóides, com uso de drogas modificadoras da doença (DMARDs) e as novas terapias biológicas.

Terapias já conhecidas como AINEs, corticoterapia sistêmica e intra-articular, antigamente usadas como a base do tratamento em AIJ, atualmente são indicados largamente como terapia adjuvante e, sempre que possível, temporária. O uso de DMARDS também se sedimentou. O metotrexate, cuja eficácia foi estabelecida há 20 anos, é considerado terapia de primeira linha para todos os subtipos de AIJ (BEUKELMAN et al., 2011). Ao longo desse período, conhecimentos a respeito de doses, perfil de segurança na população pediátrica e vias de administração foram ampliados e integrados às rotinas de cuidados desses pacientes, com benefícios adicionais. Outros DMARDs, como sulfassalazina e leflunomida, também tiveram seu espaço estabelecido no tratamento da AIJ, enquanto que fármacos antes bastante utilizados como sais de ouro, azatioprina e ciclosporina não tiveram seus benefícios comprovados, não sendo mais considerados como parte do arsenal terapêutico na AIJ (BEUKELMAN et al., 2011).

O advento da terapia biológica, ou anti-citocinas, revolucionou o cuidado em AIJ. Dados provenientes de 16 estudos clínicos randomizados (RCTs) e de registros de pacientes tem demonstrado que estes fármacos são altamente efetivos e seguros no manejo da AIJ e suas complicações (STOLL; CRON, 2014). Dentre estas terapias temos:

- Inibidores do TNF: etanercept, adalimumab e infliximab;
- Inibidores da interleucina-1(IL-1): anakinra, riloncept e canakinumab;
- Bloqueador da coestimulação do linfócito T: abatacept;
- Bloqueador da interleucina-6(IL-6): tocilizumab;
- Depletor de linfócito B: rituximab (STOLL; CRON, 2014).

Avaliação da atividade da doença

A necessidade de avaliação da atividade da doença é um componente fundamental do acompanhamento das crianças com AIJ, tendo em vista a natureza

crônica do quadro e a adicional necessidade de avaliação da efetividade da terapia anti-reumática, tanto na prática clínica como em estudos clínicos. O termo “atividade da doença” se refere ao impacto global da doença inflamatória num momento específico (CONSOLARO et al., 2009).

Os instrumentos disponíveis até pouco tempo como escalas de avaliação global, medidas de dor, vários tipos de contagem articular, questionários de desempenho funcional, exames laboratoriais (como níveis de hemoglobina, leucócitos e plaquetas), peso corporal e necessidade de aumentar o uso de medicações não podem, isoladamente, capturar a atividade inflamatória em todos os pacientes.

Com o objetivo de padronizar a avaliação dos pacientes, o Colégio Americano de Reumatologia (ACR), reuniu um conjunto de seis variáveis (avaliação global do médico, avaliação global dos pais/paciente, contagem articular ativa e restrita, avaliação funcional e medidas laboratoriais de inflamação), desenvolvendo uma definição de melhora, chamados de ACR Ped30, ACR Ped50, ACR Ped70 (GIANNINI et al., 1997). Esta ferramenta detecta melhoras clinicamente significativas, mas não possibilita a avaliação da doença no momento atual e não sendo possível comparar pacientes ou grupos de pacientes (CONSOLARO et al., 2009).

Considerações semelhantes em reumatologia geral foram o racional para reunir medidas individuais de atividades da doença em escores compostos que quantificam o nível absoluto de atividade da doença gerando um número sumário numa escala contínua. Em artrite reumatóide medidas como o DAS-28, SDAI e CDAI já são ferramentas consagradas para uso, tanto em estudos como na prática clínica. Essas medidas geraram melhor consistência na avaliação da atividade da doença entre os médicos, permitindo aos pacientes uma melhor compreensão do significado da atividade da doença através de um escore numérico, inclusive reduzindo o tamanho de amostra em estudos clínicos (CONSOLARO et al., 2009).

O JADAS (Juvenile Arthritis Disease Activity Score) é o primeiro escore composto desenvolvido para AIJ (CONSOLARO et al., 2009). Consiste num conjunto de quatro medidas: avaliação global da atividade da doença, medida através de uma escala visual analógica (VAS) de 10 cm, onde 0 = sem atividade e 10 = máxima atividade; avaliação de bem estar dos pais/paciente medida através de uma escala

visual analógica (VAS) de 10 cm, onde 0 = muito bem e 10 = muito mal; contagem articular das articulações ativas em 27 sítios (JADAS-27) e velocidade de eritrosedimentação (VSG)(CONSOLARO, 2009). As articulações consideradas nesta avaliação incluem: coluna cervical, cotovelos, punhos, metacarpofalangeanas (da primeira a terceira), interfalangeanas proximais, quadris, joelhos e tornozelos. O VSG é “normalizado” para uma escala de 0 a 10, conforme a fórmula (CONSOLARO et al., 2009):

$$\frac{VSG\left(\frac{mm}{h}\right) - 20}{10}$$

Antes de realizar o cálculo, valores de VSG menores que 20 mm/h são convertidos em zero e valores de VSG maiores que 120 mm/h são convertidos em 120. O cálculo do JADAS consiste no somatório simples destes quatro componentes que gera um escore global de 0 a 57 (CONSOLARO et al., 2009). Mudanças no valor do JADAS que correspondem à diferença clinicamente significativa correspondem a - 5,5 para melhora e + 1,7 para piora (BULATOVIĆ CALASAN et al., 2014).

Pontos de corte para o JADAS-27 já foram estabelecidos na literatura: para classificar um paciente como tendo doença inativa o ponto de corte é 1, para todos os tipos de AIJ. Para doença minimamente ativa o escore em AIJ oligoarticular foi 2 e para poliarticular 3,8 (especificidade de 90% e sensibilidade de 75%) (BULATOVIĆ CALASAN et al., 2014). Para alta atividade da doença na AIJ oligoarticular o valor de corte é 4,2 e para AIJ poliarticular 8,5 (CONSOLARO et al., 2014).

A Doença Cardiovascular na AIJ

Como conseqüência dos avanços no tratamento, observou-se diminuição expressiva de morbimortalidade associada à AIJ e na reumatologia em geral. Na atualidade são as doenças cardiovasculares as principais causas de óbito e complicações clínicas na reumatologia e interesse dos pesquisadores tem se voltado para esta questão. Atualmente, as doenças autoimunes vêm sendo reconhecidas como fatores independentes de risco para doença cardiovascular (MEUNE C, TOUZÉ E, TRINQUART L, 2010) (MARTÍN-MARTÍNEZ et al., 2014). Algumas metanálises mostraram aumento da mortalidade cardiovascular em 50 a 60% em

pacientes com artrite reumatóide (MEUNE C, TOUZÉ E, TRINQUART L, 2010). Estes pacientes apresentam perfil lipídico alterado, com aumento do colesterol LDL e a inflamação propriamente dita promove desenvolvimento da placa aterosclerótica, aumenta sua vulnerabilidade e favorece o fenômeno da aterotrombose (MARTÍN-MARTÍNEZ et al., 2014).

Variáveis como, espessamento de carótida, velocidade de onda de pulso e função endotelial têm sido utilizadas recentemente para detectar disfunção vascular no amplo espectro das doenças autoimunes (COULSON et al., 2013). Na população pediátrica também há interesse, com grande número de publicações relevantes (ALHUZAIMI et al., 2013) (VOGES et al., 2012) (VEIJALAINEN et al., 2013) (WALKER et al., 2013) (SOZERI et al., 2013) (CHOW et al., 2007) (CHEUNG, 2010) (DOYON et al., 2013).

O esforço da comunidade reumatológica no momento tem sido no sentido de tornar o monitoramento cardiovascular parte integrante da rotina de cuidados, incluindo técnicas de detecção de estágios subclínicos de doença cardiovascular.

Em AIJ, os pacientes, na sua grande maioria, sobrevivem até a idade adulta (BARSALOU; BRADLEY; SILVERMAN, 2013). Em virtude disso, a doença cardiovascular provavelmente emergirá como importante causa de morbidade e mortalidade (BARSALOU; BRADLEY; SILVERMAN, 2013).

Neste cenário, o monitoramento destes pacientes terá um papel fundamental. Correntemente, em adultos, temos três métodos bem aceitos como detectores de doença arterial subclínica: função endotelial mediada por fluxo (FMD), espessamento da camada íntima da carótida (CIMT) e velocidade de onda de pulso (PWV)(URBINA et al., 2009).

Em pediatria, embora não exista evidência demonstrando o valor preditivo destes marcadores, uma instrução científica da American Heart Association declarou que estes estudos detectam doença vascular subclínica e devem ser utilizados para identificar crianças sob risco de doença cardiovascular, atualmente. Estes métodos têm sido utilizados em pesquisa para avaliação de doença arterial subclínica em crianças com AIJ em um número ainda pequeno, mas crescente de publicações (URBINA et al., 2009).

É importante, nesse momento, distinguir dois conceitos básicos sobre os tipos de envolvimento arterial. Por um lado, temos o conceito de **aterosclerose**, envolvendo a placa de ateroma e suas repercussões no fluxo do vaso, a qual deve ser diferenciada da **arteriosclerose**, cuja alteração fisiopatológica se relaciona ao enrijecimento das mesmas (CUNHA, 2005). As duas situações estão comumente inter-relacionadas, porém, em populações tradicionalmente livres de aterosclerose, a perda progressiva de distensibilidade arterial com o envelhecimento, foi amplamente documentada (CUNHA, 2005).

A inflamação crônica é uma característica comum a todos os subtipos de AIJ, caracterizando risco para o desenvolvimento de aterosclerose precoce, talvez com diferentes perfis entre os diferentes subtipos. Há poucos dados sobre o risco ou a evolução da aterosclerose em pacientes com AIJ. Um estudo de autópsia sugeriu que 30% das crianças com AIJ teriam evidências de aterosclerose (BARSALOU; BRADLEY; SILVERMAN, 2013).

Rigidez Arterial

Por outro lado, a rigidez arterial, ou o endurecimento da parede vascular (arteriosclerose) associado ao envelhecimento, vem sendo reconhecida na atualidade como uma das causas mais importantes de desfechos cardiovasculares (CUNHA, 2005). O aumento da rigidez arterial é considerado a principal razão do aumento da pressão sistólica associada ao envelhecimento e um preditor de risco para infarto agudo do miocárdio e insuficiência cardíaca, independente da elevação da pressão arterial sistólica (MALAQUIAS, 2004).

A árvore arterial distribui sangue em alta pressão ao leito vascular periférico (SHIRWANY; ZOU, 2010). Ela pode ser dividida funcionalmente e estruturalmente em dois subsistemas: (A) as grandes artérias elásticas (aorta, carótidas e ilíacas), que apresentam função predominante de amortecimento da pressão e armazenamento do fluxo ejetado durante a sístole, dando vazão a esse volume durante a diástole e garantindo que o sistema periférico receba um fluxo contínuo durante todo o ciclo cardíaco; (B) artérias musculares, com função predominantemente condutora, particularmente as dos membros inferiores (femoral, poplítea, tibial posterior) (SHIRWANY; ZOU, 2010). Elas são capazes de alterar seu tônus muscular, ação mediada pela função endotelial, sistema renina-angiotensina e

sistema nervoso autônomo, e com isso modular a velocidade da onda de pressão conduzida pelas grandes artérias (LAURENT et al., 2006).

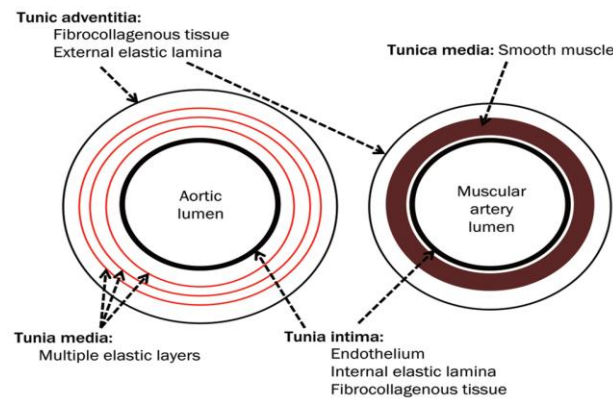


Figura 1 - Esquema comparativo: artéria elástica versus artéria muscular (SHIRWANY; ZOU, 2010).

As diferenças nas propriedades viscoelásticas das artérias e nos diâmetros das mesmas, a alta resistência da porção terminal do sistema vascular e a presença de bifurcações das artérias condutoras e pequenas artérias musculares provoca a formação de uma onda de reflexão, que fisiologicamente retorna ao coração no final da diástole e é responsável pela perfusão coronariana neste ponto do ciclo cardíaco (SHIRWANY; ZOU, 2010) (LAURENT et al., 2006).

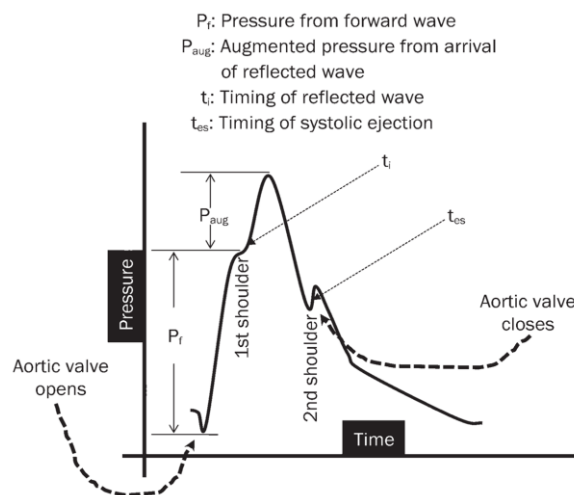


Figura 2 – A onda de pressão aórtica e seus componentes (SHIRWANY; ZOU, 2010).

Em sistemas mais rígidos, como ocorre em idosos, a onda de reflexão viaja mais rápido através da árvore arterial, chegando ao coração na sístole, sobrepondo-se à onda incidente e elevando ainda mais a pressão sistólica, enquanto que a pressão

arterial cai agudamente na diástole, modificando o padrão de fluxo coronariano (SHIRWANY; ZOU, 2010) (LAURENT et al., 2006). O retorno precoce da onda de reflexão, provocado por uma velocidade de onda de pulso aumentada, eleva a pressão sistólica central e diminui a pressão de perfusão coronariana diastólica (CUNHA, 2005). O conseqüente aumento do consumo de oxigênio, a hipertrofia ventricular esquerda e a diminuição da perfusão coronariana na diástole predis põem a isquemia subendocárdica e fibrose intersticial, que por sua vez diminuem o relaxamento diastólico. A disfunção ventricular diastólica associada à rigidez arterial já foi descrita em *diabetes mellitus*, hipertensão arterial sistêmica e doença arterial coronariana em adultos (MALAQUIAS, 2004).

A rigidez arterial pode ser avaliada indiretamente através da pressão de pulso, que vem a ser a diferença entre as pressões arterial sistólica e diastólica. Ela é determinada por dois componentes hemodinâmicos principais: um direto que decorre da interação entre a ejeção ventricular e as propriedades viscoelásticas das grandes artérias e o componente indireto seria a reflexão da onda de pulso (NOGUEIRA et al., 2003).

A medida da velocidade da onda de pulso ou medida da propagação da onda de pulso (PWV em inglês ou VOP em português) é uma técnica bem estabelecida para medir a rigidez arterial, tendo sido reconhecida como a melhor medida clínica de rigidez sobre um seguimento arterial. É considerada atualmente como o método mais simples, não invasivo, robusto e reprodutível para a medida da rigidez arterial (LAURENT et al., 2006). Atualmente, encontra-se validada, inclusive em crianças (ELMENDORST et al., 2015) (WASSERTHEURER et al., 2010) (STONER et al., 2014). A VOP é definida pela equação de Moens-korteweg:

$$VOP = \sqrt{Eh/2pR}$$

Onde E é o módulo elástico (ou pressão por cm² necessária para um aumento teórico de 100% no diâmetro da artéria), h é a espessura da parede arterial, p é a densidade do sangue e R é o raio da artéria (CUNHA, 2005), ou como revista em 1922 por Bramwell e Hill:

$$Co = \sqrt{(v - Dp/p - Dv)}$$

Onde C_0 é a velocidade da onda, Dv é a variação no volume arterial (V) e Dp é a mudança na pressão causando a mudança de volume, ou distensibilidade (LAURENT et al., 2006). Esta equação, amplamente utilizada em pesquisa clínica, ilustra claramente o fato de que a propagação da onda de pulso é inversamente relacionada à distensibilidade do tubo arterial (LAURENT et al., 2006), como na fórmula:

$$VOP = \sqrt{\frac{1}{d}}$$

Várias técnicas foram descritas para avaliação da VOP: Tonometria, ultrassom com Doppler, ressonância nuclear magnética e oscilometria (LAURENT et al., 2006) (URBINA et al., 2009). São técnicas não invasivas e todas apresentam limitações, cuja principal é a não demonstração de validade, particularmente em pediatria. Estudos invasivos, *in vivo*, com uso de cateteres intra-arteriais e manômetros de pressão têm importante limitação ética em pediatria e sua execução é improvável apenas para fins de validação (URBINA et al., 2009). Dessa forma, não há um verdadeiro padrão-ouro em pediatria. Em adultos, estas validações foram realizadas mediante consentimento. Por outro lado, a natureza não invasiva destas técnicas facilita seu uso na população pediátrica e não há razão para crer que elas sejam menos válidas ou reprodutíveis em crianças (URBINA et al., 2009).

A técnica oscilométrica avalia as oscilações da corrente sanguínea utilizando um manguito de oclusão arterial. Seu uso apresenta vantagens, como a facilidade de execução do exame, para o médico e para o paciente e a não necessidade de treinamento extenso. A modalidade de uso através de manguito de oclusão da artéria braquial, modelo Mobil-O-Graph (ELMENDORST et al., 2015), já teve seus percentuais em crianças e adolescentes hígidos estabelecidos. A avaliação de 715 meninas e 730 meninos com uma idade média de 13,77anos ($\pm 2,93$ anos) teve ótima correlação com avaliações da VOP carótida-femoral (figura 3). VOP média encontrada nesta população foi de 4,7 m/s $\pm 0,34$ m/s. Entre os 8 e os 21 anos, a VOP aumentou de 4,29 $\pm 0,32$ para 4,98 $\pm 0,33$ m/s em meninas e de 4,27 $\pm 0,18$ para 5,22 $\pm 0,46$ m/s em meninos (figura 4). Batista *et al* avaliou a VOP carótida-femoral em 231 crianças brasileiras de 9 a 10 anos, saudáveis, através da técnica

oscilométrica e encontrou uma média de 5,3 m/s (4,1 – 7,8 m/s), com desvio-padrão de 0,52 m/s (BATISTA et al., 2015).

Em nossa revisão da literatura, encontramos apenas cinco artigos (AULIE et al., 2014) (SATIJA et al., 2014) (VLAHOS et al., 2011) (ARGYROPOULOU et al., 2003) (ILISSON et al., 2015) avaliando a rigidez arterial em pacientes com AIJ, três estudos mostraram impacto importante sobre medidas de rigidez arterial, nenhum utilizando a oscilometria. Trata-se, portanto de uma área ainda a ser explorada.

Rigidez Arterial e Inflamação

A diminuição da distensibilidade arterial é consequência da fibrose vascular e degradação das fibras elásticas das grandes artérias, decorrentes do envelhecimento, mas que também pode ser acelerada por fatores como: hipertensão, *diabetes mellitus*, dislipidemia e obesidade (CUNHA, 2005) (PARK; LAKATTA, 2012). Estes fatores estão associados à disfunção endotelial, inflamação vascular, hiperplasia celular da camada muscular lisa, aumento da deposição de colágeno e degradação da elastina, levando a um espessamento da camada íntimo-média.

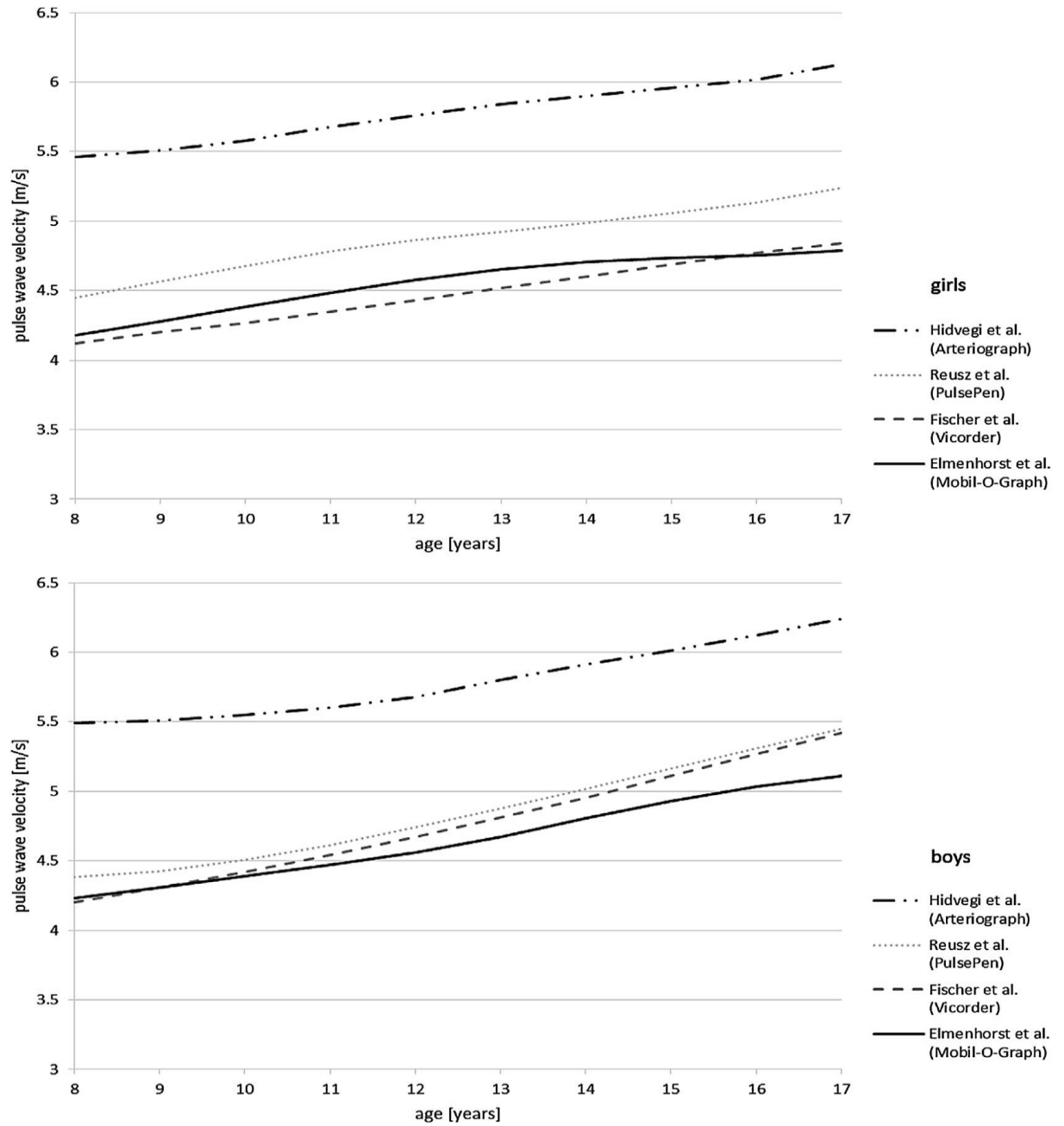


Figura 3 – Comparativos entre os percentis 50 para PWV obtidos por diferentes aparelhos para meninos e meninas (ELMENHORST et al., 2015).

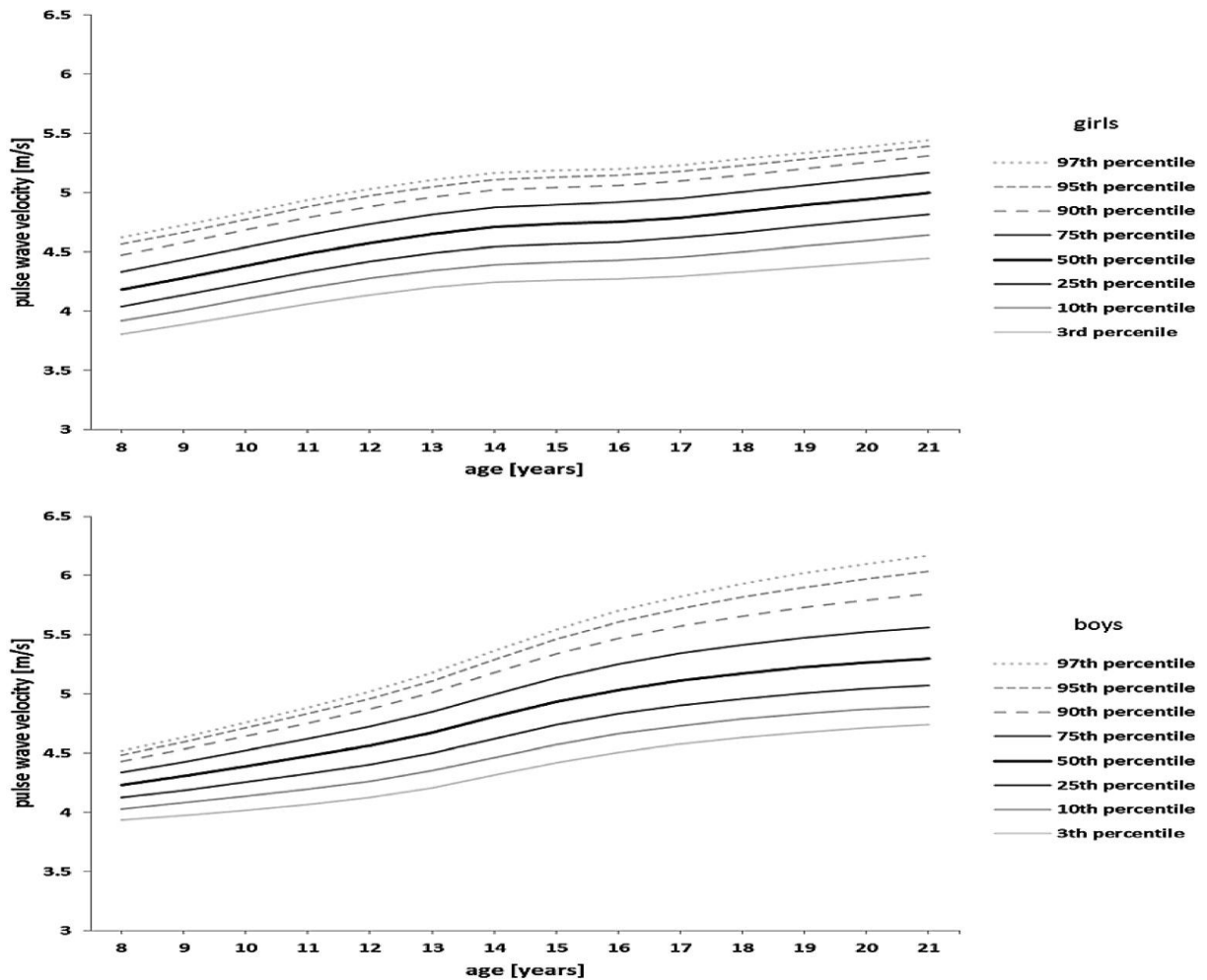


Figura 4 – Percentis para PWV por idade apresentados separadamente para meninos e meninas (ELMENDORST et al., 2015).

A degradação acelerada da elastina é mediada pela ativação de vários tipos de metaloproteinases (MMP) e proteinases. Com o envelhecimento, observa-se um aumento das MMP e diminuição da atividade de seu inibidor, TIMP-2, promovendo remodelamento e enrijecimento arterial (WANG; LAKATTA, 2002). A MMP também promove a formação de um colágeno desenrolado, mais rígido, além do aumento da migração e proliferação de células musculares lisas (WANG; LAKATTA, 2002).

O aumento da atividade do sistema renina-angiotensina, com elevação da angiotensina II, provoca a ativação de várias citocinas, como a Proteína Quimioatrativa para Monócitos-1 (MCP-1), TNF- α , Interleucina-1, Interleucina-17 e interleucina-6 (PARK; LAKATTA, 2012). A ativação da MCP-1, que parece ter um papel central na mediação da inflamação e no remodelamento vascular, resulta em

estímulo da inflamação local, aumento da expressão de moléculas de adesão, aumento da secreção de MMP, amplifica a atividade de outras citocinas, aumentando a migração de células musculares lisas (PARK; LAKATTA, 2012).

A ativação de citocinas estimula a produção local de proteína C reativa pelas células musculares lisas, que reduz a função endotelial e promove a inflamação vascular. Vários estudos recentes mostraram a associação da proteína C reativa e rigidez arterial. Um seguimento de 20 anos, o *Caerphilly Prospective Study* (MCENIERY et al., 2010), acompanhou uma coorte predominantemente caucasiana de 825 homens, avaliou a VOP no início e no final do período e mostrou que os únicos marcadores independentes para rigidez arterial foram a pressão de pulso, glicose sérica, circunferência abdominal e a proteína C reativa. Entre estas variáveis, a exposição cumulativa à proteína C reativa foi a que demonstrou a associação mais robusta, sugerindo a importância da inflamação crônica de baixo grau na progressão da rigidez arterial. Outros estudos também confirmaram esse achado (ABRAMSON; WEINTRAUB; VACCARINO, 2002) (MATTACE-RASO et al., 2004) (LI et al., 2005) (NAGANO et al., 2005).

E, por último, o estresse oxidativo resulta também em aumento da inflamação vascular e da proliferação celular, que pode levar a diminuição da distensibilidade vascular (PARK; LAKATTA, 2012).

Parece haver, portanto, uma interface entre o estabelecimento da rigidez arterial e o fenômeno inflamatório. Há um interesse expressivo da literatura sobre o comportamento da VOP nas doenças reumáticas. De uma forma geral, as evidências mais consistentes apontam numa direção de elevação dessa variável em artrite reumatóide (PROVAN et al., 2011), espondilite anquilosante (BERG et al., 2015) e artrite psoriásica (SHEN et al., 2015) (SHANG et al., 2012).

Telômeros

O comprimento de telômeros é outra variável que vem sendo utilizada como um marcador do envelhecimento biológico para estudar a senescência cardiovascular. O encurtamento de telômeros foi encontrado em vários estudos associado com doença cardiovascular (NILSSON et al., 2013) (FYHRQUIST; SAIJONMAA; STRANDBERG, 2013). Relações inversas entre comprimento de telômeros e idade foram verificadas

em vários grupos celulares, incluindo o endotélio vascular (GORONZY; FUJII; WEYAND, 2006).

Telômeros são repetições da seqüência de bases TTAGGG localizadas nas terminações cromossômicas dos mamíferos (NILSSON et al., 2013) (HOHENSINNER; GORONZY; WEYAND, 2011). Apresenta-se em um complexo que consiste além da fita de DNA não codificadora, em uma enzima reguladora, a telomerase, e um complexo de proteínas ligadas aos telômeros (TBP: TRF 1, TRF 2, RAP 1, TIN 2, TPP 1 e POT1) (NILSSON et al., 2013). Unidos aos TBP, os telômeros formam estruturas em forma de alça. Têm a função de proteger as terminações cromossômicas de degradação nucleolítica, recombinação espontânea, eventos de reparo que ocasionem fusão cromossômica e rearranjo das quebras da fita dupla de DNA (SHAMMAS, 2011), regulando a capacidade replicativa celular, estabilizando e protegendo as terminações cromossômicas (ZANET et al., 2013).

A cada mitose, a DNA polimerase replica o DNA, incluindo os telômeros, mas é incapaz de replicar a última parte da fita 3', onde o primer de RNA estava ligado, resultando em progressivo encurtamento dos cromossomos. O DNA perde em torno de 30 a 150 pares de bases a cada divisão celular, refletindo dessa forma o histórico do número de divisões que uma célula teve ao longo da vida (NILSSON et al., 2013). O comprimento de telômeros também é chamado de "relógio mitótico" e é visto atualmente como um marcador de envelhecimento biológico, tanto em nível celular como sistêmico (SHAMMAS, 2011).

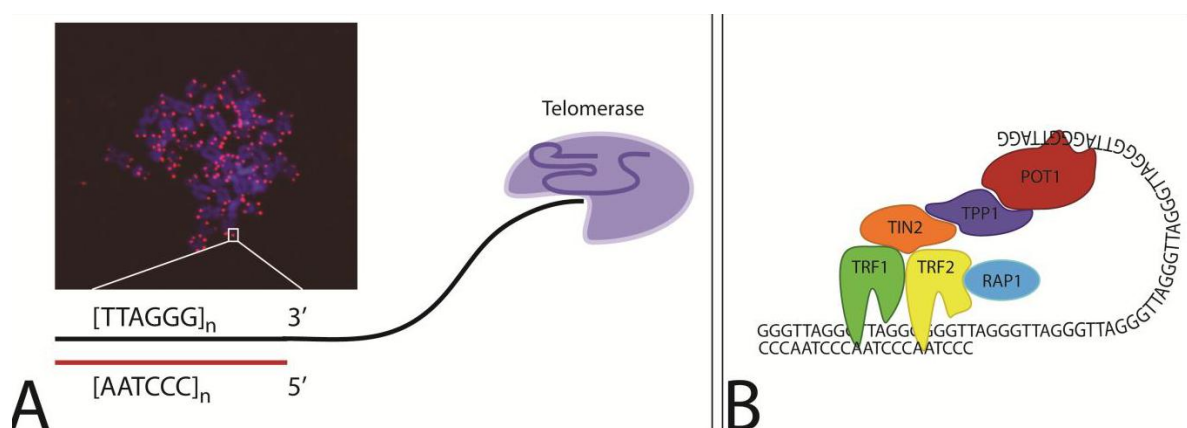


FIGURA 5 - (A) Linfócito T CD4 em metáfase com telômeros corados em vermelho. Terminação telomérica 3' alongada pela telomerase. (B) complexo de proteínas ligadas aos telômeros (TBP: TRF 1, TRF 2, RAP 1, TIN 2, TPP 1 e POT1) ligadas a porção de fita dupla e a ancoragem da fita simples em formato de alça (HOHENSINNER; GORONZY; WEYAND, 2011).

A perda de telômeros é em parte compensada pela presença da telomerase, um complexo multimolecular que é capaz de estender o DNA telomérico (NILSSON et al., 2013). Trata-se de uma enzima com atividade de transcriptase reversa especializada, responsável pela síntese *de novo* do DNA telomérico (GRUN et al., 2015). É o principal mecanismo fisiológico pelo qual as células dos mamíferos estendem as seqüências de seus telômeros. Esta enzima é bastante ativa em células germinativas (como células espermáticas, células tronco e também em linfócitos ativados), mas apenas de forma transitória na fase S (síntese) do ciclo celular da maioria das células somáticas (GORONZY; FUJII; WEYAND, 2006). O encurtamento progressivo dos telômeros tem efeitos deletérios: as extremidades cromossômicas ficam desprotegidas, levando à instabilidade, fusão e morte celular (GORONZY; FUJII; WEYAND, 2006).

Entretanto, em células normais, a erosão telomérica inicia um programa de senescência celular que evita novas divisões celulares. A senescência replicativa provoca atraso irreversível da proliferação celular, inclusive com alterações morfológicas como aumento do tamanho celular, achatamento, vacuolização e aumento da expressão de β -galactosidase, protegendo a célula do encurtamento telomérico excessivo e morte celular (GORONZY; FUJII; WEYAND, 2006).

O processo de encurtamento dos telômeros parece ser influenciado fortemente por fatores genéticos, sexo (telômeros são maiores em mulheres), estresse oxidativo e pelo dano ao DNA (NILSSON et al., 2013). Seqüências ricas em guanina (G) são muito sensíveis ao dano oxidativo, enquanto que o reparo desse dano, por excisão de nucleotídeo, tende a ser menos efetivo em regiões de DNA não codificadoras (GORONZY; FUJII; WEYAND, 2006). Esta é uma variável importante associada com envelhecimento e aumento da erosão telomérica. Estilo de vida não saudável como tabagismo, obesidade, ambos associados à inflamação de baixo grau, conseqüente aumento da proliferação de leucócitos e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, pode levar a encurtamento dos telômeros em leucócitos periféricos (GRUN et al., 2015). Uso de álcool, exposição à poluição ambiental, ingestão de bebidas açucaradas, estresse bioquímico e psicológico também já foram descritos como potenciais fatores de impacto no comprimento dos telômeros, dados encontrados também na faixa etária pediátrica (GRUN et al., 2015).

Várias técnicas para avaliação do comprimento de telômeros estão disponíveis em pesquisa atualmente (MONTPETIT et al.,), conforme a tabela abaixo:

-
- *Southern Blot adaptado para detecção da distribuição do comprimento de fragmentos de restrição terminais (TRF);*
 - *Técnicas baseadas na reação em cadeia da polimerase: Reação em cadeia da polimerase quantitativa ou em tempo real (qPCR), Monochrome multiplex quantitative PCR (MMqPCR) e Quantificação absoluta do comprimento de telômero (aTL);*
 - *Análise de comprimento único de telômero (STELA);*
 - *Hibridização fluorescente quantitativa in situ (Q-FISH);*
 - *Metaphase chromosome Q-FISH;*
 - *Interphase Q-FISH,*
 - *Hibridização fluorescente quantitativa in situ Q-FISH por citometria de fluxo (Flow-FISH),*
 - *Primed in situ (PRINS),*
 - *Hybridization protection assay (HPA)*
-

Todas elas apresentam limitações e vantagens. Uma limitação importante é o fato de que em cada célula humana em metáfase existem 92 telômeros provenientes de 23 pares de cromossomos, cada um com um comprimento único. Entretanto, na maioria das técnicas, só é possível analisar uma população de células heterogêneas e não uma única população celular. Dessa forma, o resultado reflete uma medida heterogênea da média de uma população de telômeros nas células analisadas (GRUN et al., 2015). Analisaremos aqui a técnica considerada padrão ouro e aquela que será utilizada nesse estudo.

A técnica de *Southern Blot* adaptado para detecção da distribuição do comprimento de fragmentos de restrição terminais (TRF) foi uma das primeiras a ser utilizada e é considerado o padrão-ouro (MONTPETIT et al.,). Aqui o DNA é digerido por enzimas de restrição e separado por diferenças no peso molecular através de eletroforese, seguida de hibridização radioativa com sonda específica para a seqüência telomérica em membrana de nitrocelulose (GRUN et al., 2015). Desvantagens desse método são a dificuldade de obtenção do DNA fragmentado, pelo seu alto peso molecular e viscosidade, a grande quantidade de material

genético necessário para executar a técnica (0,5 – 5 µg por indivíduo), tempo (3 a 5 dias) e, em especial, a concomitante detecção de regiões subteloôméricas pela atividade das enzimas de restrição que pode gerar variações na média relativa dos TRFs dos indivíduos em até 5%, não permitindo estabelecer o número exato de repetições teloméricas. Estes fatores são grandes limitantes do seu uso em pesquisa epidemiológica.

A técnica da qPCR tem a vantagem de possibilitar o uso de pequenas quantidades de DNA, sendo, por isso a mais utilizada em estudos epidemiológicos (NILSSON et al., 2013). Esse método permite amplificar o número de cópias de um segmento de DNA de interesse (amplicon), quando conhecemos ao menos a seqüência das porções terminais desse segmento. Isso ocorre através do uso de enzimas polimerases e de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) sintéticos e complementares a seqüência nas fitas opostas do DNA-alvo nas posições que definem as extremidades do segmento a ser amplificado (COX M , DOUDNA JA, 2009). Primeiramente, ocorre a desnaturação do DNA por aquecimento, a adição dos *primers* e amplificação pela enzima *Taq* DNA polimerase, na presença de uma sonda fluorescente ligada ao DNA, até um limiar específico, vários desvios-padrão acima da fluorescência de base. A quantidade de fluorescência emitida durante a reação é medida, permitindo quantificar o amplicon (COX M , DOUDNA JA, 2009).

Ainda assim, até a publicação da técnica de Cawthon em 2002 (CAWTHON, 2002), a qPCR não era adequada para estimar a medida dos telômeros. Isso se devia ao fato de que a seqüência repetida TTAGGG requeria o uso de *primers* que eram complementares, provocando a formação de um artefato, *primers dimers*, que ocorrem quando dois *primers* se ligam um ao outro e amplificam a seqüência do *primer* e não a seqüência do DNA-alvo. A solução proposta por Cawthon foi a utilização de *primers* que se ligavam aos segmentos ricos em G e C, mas não se combinavam com as outras bases e o uso de temperaturas mais baixas durante os dois primeiros ciclos, que permite de os *primers* se liguem com o DNA telomérico. Os ciclos restantes são completados em temperatura mais elevada de forma a amplificar apenas os produtos específicos dos dois primeiros ciclos (DNA do paciente ao invés do *primer* de DNA) (MONTPETIT et al.,).

A quantificação do comprimento relativo de telômeros é obtida através de duas reações de qPCR para cada amostra, uma para amplificar a seqüência telomérica

(T) e outra para amplificar a seqüência de um gene de cópia única (S), definido como controle da amplificação que permite o cálculo do número de cópias de genoma por amostra (MONTPETIT et al.,). Estes procedimentos ocorrem em tubos ou poços separados. A quantificação do comprimento dos telômeros se dá pela comparação do produto da amplificação dos telômeros (T) com o produto da amplificação do gene de cópia única (S) (CAWTHON, 2002). A razão $T/S = 1$ ocorre quando o DNA desconhecido é idêntico ao de referência, na razão do número de cópias teloméricas para o número de cópias do gene de cópia única (CAWTHON, 2002). Esta razão gera um valor que se correlaciona com a média do comprimento de telômero, mas não serve como base para estimativa ou medida equivalente.

Por imprecisões de medidas (por pipetamento, etc.) pode haver variação na quantidade de DNA presente nos tubos T e S, comprometendo a precisão do ensaio. Em 2009, o mesmo autor publicou uma adaptação do método que corrige o problema, chamada *Monochrome multiplex quantitative PCR* (MMqPCR) (CAWTHON, 2009), sugerindo uma multiplicação do ensaio, uma vez que a quantidade de DNA pipetado não contribuiria para a variação no T/S. Esta técnica apresentou correlação superior com o padrão ouro ($R_2 = 0,844$) do que a técnica anterior ($R_2 = 0,677$) (CAWTHON, 2009).

A técnica descrita em 2002 é o método mais usado pelos investigadores, pois se presta para uso em grandes estudos epidemiológicos. Também é uma técnica de boa correlação com o padrão ouro (ELBERS et al., 2014). Ainda assim, a capacidade de comparar os resultados desses estudos é limitada. Isso se deve a diferenças na qualidade do DNA de acordo com o método utilizado para sua extração, assim como diferenças nas técnicas de fixação, no caso de uso de amostras de tecidos (MONTPETIT et al.,). Outro problema parece ser a grande variabilidade em estimativas repetidas, mesmo quando feito por profissionais experientes. Aviv et al demonstraram que o coeficiente de variação para qPCR foi 6,45% enquanto que para o TRF foi de 1,74% (AVIV et al., 2011). Outras limitações seriam a de não gerar uma estimativa do comprimento em quilobase e não permitir o reconhecimento do telômero curto individualmente.

Outro aspecto a ser considerado em relação à técnica é se a medida dos telômeros no sangue periférico refletiria o comprimento de telômeros nos tecidos.

Estudos já demonstraram essa correlação inclusive com o tecido cardiovascular e também com vários outros tecidos, de maneira contundente (NILSSON et al., 2013).

Telômeros e Doença Cardiovascular

Um número aumentado de células senescentes é encontrado em tecidos musculares lisos de vasos, endotélio, monócitos e macrófagos de artérias envelhecidas e placas ateroscleróticas (FYHRQUIST; SAIJONMAA; STRANDBERG, 2013). Estas células estão associadas ao “fenótipo secretor”, apresentando atividade parácrina e autócrina, secretando IL-6, IL-8, MCP-1, MMP, moléculas de adesão e fator de crescimento endotelial que causam um estado crônico de inflamação, remodelamento e reparo tecidual (FYHRQUIST; SAIJONMAA; STRANDBERG, 2013). Entretanto, ainda não sabemos se as células senescentes têm um papel causal na doença cardiovascular associada à idade ou vice-versa (FYHRQUIST; SAIJONMAA; STRANDBERG, 2013).

Há também vários estudos clínicos demonstrando a associação de telômeros encurtados e aterosclerose, infarto agudo do miocárdio, insuficiência cardíaca, pressão de pulso elevada e aumento da PWV (BENETOS et al., 2001) (JEANCLOS et al., 2000) (AVIV, 2002) (WANG et al., 2011) (STRAZHESKO et al., 2015). Mas, igualmente, a maioria dos estudos é de desenho transversal, portanto não é possível estabelecer qualquer relação causal inequívoca entre telômeros e doença cardiovascular. O maior estudo longitudinal, *Asklepios Study*, com 2136 indivíduos, demonstrou que os telômeros não estão encurtados em indivíduos com forte história familiar para doença cardiovascular comparado a controles ($P = 0,608$) (DE MEYER et al., 2012). Outras três coortes finlandesas mostraram não haver relação do tamanho corporal ao nascimento e o tamanho dos telômeros na idade adulta (KAJANTIE et al., 2012).

É possível que a erosão telomérica e a doença cardiovascular compartilhem fatores de risco comuns, os quais se associam a inflamação e estresse oxidativo (FYHRQUIST; SAIJONMAA; STRANDBERG, 2013). Alguns autores apóiam a “hipótese unificadora”, onde o encurtamento de telômeros leucocitários pela idade poderia ser acelerado por fatores de risco cardiovasculares, refletindo o impacto de estresse inflamatório, oxidativo e mecânico sobre o sistema cardiovascular (FYHRQUIST; SAIJONMAA; STRANDBERG, 2013) (VOGHEL et al., 2007). A

senescência endotelial seria um reflexo do dano acumulado pelos anos de exposição aos fatores de risco cardiovasculares e não necessariamente da idade do indivíduo.

Dessa forma, o comprimento de telômeros é visto, atualmente, como um marcador de envelhecimento geral e cardiovascular, informando sobre envelhecimento biológico e não cronológico.

Telômeros e Doenças Autoimunes

A maioria das doenças autoimunes é caracterizada por hiperatividade espontânea do sistema imune. Ainda que não se entenda completamente a fisiopatologia desses processos, inflamação, estresse oxidativo e elevada renovação celular leucocitária são denominadores comuns entre elas e apontados como os principais fatores ambientais associados ao processo de encurtamento acelerado dos telômeros, sugerindo uma conexão entre autoimunidade e o sistema telômero/telomerase (GEORGIN-LAVIALLE et al., 2010).

Estudos avaliando o comprimento de telômeros foram realizados em diferentes doenças autoimunes como: artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico, esclerose sistêmica, granulomatose de Wegener, sarcoidose, *Diabetes Mellitus* tipo I (DM I) e AIJ, em geral encontrando valores reduzidos (GEORGIN-LAVIALLE et al., 2010). Em algumas situações como, por exemplo, no lúpus eritematoso sistêmico e na granulomatose de Wegener houve associação com atividade e tempo de doença e, em alguns casos, envolvimento de familiares saudáveis, como na esclerose sistêmica (GEORGIN-LAVIALLE et al., 2010).

Em AIJ, encontramos apenas dois estudos. Prelog et al encontraram redução no comprimento de telômeros em linfócitos CD4+CD45RA+ , sugerindo senescência inapropriada das células T nesses pacientes ($1,1 \pm 0,6$ vs. $2,0 \pm 1,1$, $P = 0,002$) (PRELOG et al., 2008). Dvergsten et al avaliaram células CD8 e CD4 e também encontraram telômeros encurtados ($P < 0,01$), redução da capacidade proliferativa e aumento do número de células T CD31+CD28^{null}CD8+, indicadores de envelhecimento linfocitário, marcadamente em pacientes com AIJ oligoarticular (DVERGSTEN et al., 2013). Não encontramos estudos avaliando comprimento de telômeros em leucócitos periféricos em AIJ e tampouco a correlacionando com rigidez arterial.

Portanto, estamos frente a um cenário que reúne a doença crônica inflamatória mais comum da infância e evidências na literatura, ainda pouco exploradas, de alteração da rigidez arterial ocorrendo precocemente nestes pacientes e inflamação crônica interferindo na medida de telômeros, avaliados em poucos estudos em AIJ.

2 – JUSTIFICATIVA

A evidente evolução do manejo da AIJ proporcionou melhora da sobrevivência dos pacientes, que, em sua grande maioria, chegam à idade adulta. Neste cenário, a doença cardiovascular provavelmente emergirá como importante causa de morbidade e mortalidade e métodos de avaliação das formas subclínicas da doença cardiovascular são, nesse momento, de potencial interesse nessa população.

Na nossa revisão da literatura foi possível selecionar apenas quatro publicações, nas quais esta população de pacientes foi especificamente analisada quanto à rigidez arterial, utilizando a ressonância nuclear magnética e a técnica da tonometria. Não encontramos estudos, até o momento, nos quais crianças com AIJ são avaliadas pela técnica da oscilometria, um método de melhor exequibilidade. Quanto ao estudo do comprimento dos telômeros em AIJ, encontramos apenas dois artigos, que observaram especificamente subpopulações de linfócitos. Trata-se, portanto de uma área ainda a ser explorada. Adicionalmente, não encontramos estudos sobre a correlação destas variáveis na área pediátrica e em qualquer doença reumática, até o momento.

Estamos frente a uma situação de potencial dano vascular e genômico associados à inflamação crônica, com pouco conhecimento acumulado até o momento na literatura. Acreditamos ser importante gerar informação a respeito para o melhor entendimento deste cenário e pelos possíveis desdobramentos destes conhecimentos no acompanhamento e, inclusive, no tratamento das crianças com artrite idiopática juvenil.

Outro aspecto a ser ressaltado é que um modelo de estudo observando crianças com inflamação crônica é de interesse para avaliar o comportamento dessas variáveis ao eliminar a influência da idade e gerar um melhor entendimento do impacto da atividade inflamatória crônica sobre o remodelamento vascular e a senescência celular. A exclusão dos clássicos fatores de risco para doença cardiovascular enriqueceria esta informação, eliminando potenciais confundidores e podendo trazer contribuições adicionais.

3.1 – Hipótese operacional

Não há diferença entre os comprimentos de telômeros e velocidade de onda de pulso entre pacientes com artrite idiopática juvenil e controles saudáveis.

Não há correlação entre medidas de rigidez arterial e comprimento de telômeros em uma amostra de pacientes com artrite Idiopática Juvenil.

3.2 – Hipótese conceitual

Há diferença entre os comprimentos de telômeros e velocidade de onda de pulso entre pacientes com artrite idiopática juvenil e controles saudáveis.

Há correlação entre medidas de rigidez arterial e comprimento de telômeros em uma amostra de pacientes com Artrite Idiopática Juvenil.

4 – OBJETIVO

Avaliar o comprimento de telômeros em células polimorfonucleares periféricas e a velocidade de onda de pulso como medida da rigidez arterial numa amostra de pacientes com artrite idiopática juvenil e comparar este resultado com um grupo controle composto por indivíduos saudáveis pareados por sexo e idade.

Testar a correlação dos índices de rigidez arterial com comprimento dos telômeros da população de pacientes com artrite idiopática juvenil e comparar estas duas variáveis com um grupo controle composto por indivíduos saudáveis, pareados por sexo e idade.

5.1 – Delineamento do estudo

O estudo realizado foi de desenho observacional analítico transversal.

5.2 – Cálculo amostral

A população do estudo foi composta por com AIJ atendidos no Ambulatório de Reumatologia Pediátrica do Hospital São Lucas da PUCRS com diagnóstico de artrite idiopática juvenil, de acordo com os critérios do ILAR (JAMES T. CASSIDY, ROSS E PETTY, RONALD M. LAXER, 2011).

Para o cálculo de amostragem com objetivo de avaliar a diferença nas medidas de comprimentos de telômeros entre pacientes com artrite idiopática juvenil e controles normais foram utilizados dados de outros estudos (GRUN et al., 2015), obtendo a média e desvios padrões. Para encontrar diferença entre os dois grupos, usando um poder de 80% e nível de significância de 5%, encontramos uma amostra de 26 pacientes em cada grupo.

Para o cálculo de amostragem com objetivo de avaliar a diferença nas medidas de velocidade de onda de pulso entre pacientes com artrite idiopática juvenil e controles normais foram utilizados dados de outros estudos (VLAHOS et al., 2011), obtendo a média e desvios padrões. Para encontrar diferença entre os dois grupos, usando um poder de 80% e nível de significância de 5%, encontramos uma amostra de 30 pacientes em cada grupo.

Para o cálculo de amostragem com objetivo de avaliar a correlação entre comprimento de telômeros e velocidade de onda de pulso foi definido um poder de 80%, com intervalo de confiança de 95% e nível de significância de 5%, estimando um tamanho de amostra de 85 pacientes, admitindo um coeficiente de correlação maior que 0,3, que foi o tamanho amostral definido para este estudo.

5.3 – Critérios de inclusão

- Pacientes atendidos no Ambulatório de Reumatologia Pediátrica do Hospital São Lucas da PUCRS com diagnóstico de artrite idiopática juvenil, de acordo com os critérios do ILAR (JAMES T. CASSIDY, ROSS E PETTY, RONALD

M. LAXER, 2011) a partir dos sete anos de idade. O limite de idade de inclusão deveu-se aos tamanhos dos manguitos disponibilizados para medida da rigidez arterial, conforme descrito abaixo. Foram incluídos apenas pacientes com os subtipos oligoarticular persistente e estendido e poliarticular fator reumatóide positivo e fator reumatóide negativo. Os pacientes do grupo controle para avaliação da rigidez arterial também foram oriundos do ambulatório de Pediatria e de Reumatologia Pediátrica do Hospital São Lucas da PUCRS, pareados por sexo e idade. Os pacientes do grupo controle para avaliação do comprimento de telômeros foram oriundos de controles históricos, também pareados por sexo e idade, com material estocado de estudo já realizado pelo serviço de Pneumologia Pediátrica do Hospital São Lucas da PUCRS, não representando procedimento adicional de coleta de sangue.

5.4 - Critérios de exclusão

- Tabagismo.

- Pacientes IMC acima do normal conforme critérios definidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e usando a fórmula (GODOY-MATOS AF, OLIVEIRA J, GUEDES EP, CARRARO L, LOPES AC, MANCINI MC; HL, BRITO CLS, BYSTRONSKI DP, MOMBACH KD, STENZEL LM, REPETTO G; HALPERN ZSC, VILLARES SMF, ARRAIS RF, RODRIGUES MDB, MAZZA FC, BITTAR T, 2009):

$$\text{IMC} = \text{Peso kg} / (\text{altura m})^2$$

<i>Baixo IMC para idade</i>	<i>IMC adequado ou Eutrófico</i>	<i>Sobrepeso</i>	<i>Obesidade</i>
<i>< Percentil 3</i>	<i>≥ Percentil 3 e < Percentil 85</i>	<i>≥ Percentil 85 e < Percentil 97</i>	<i>≥ Percentil 97</i>

- Hipertensos, conforme critérios usados pela Sociedade Brasileira de Pediatria (SBP) (SALGADO, 2003):

- Pressão normal: pressão arterial sistólica e diastólica abaixo do percentil 90
- Pressão normal-alta ou limítrofe: pressão arterial sistólica ou diastólica entre o percentil 90 e 95
- Hipertensão arterial: pressão arterial sistólica ou diastólica acima do percentil 95, medida em três ocasiões diferentes

- Dislipidêmicos, conforme critérios definidos pela Sociedade Brasileira de Cardiologia (SANTOS J, GUIMARÃES AC, 1999):

<i>Valores de referência de variáveis de perfil lipídico em crianças e adolescentes (entre 2 e 19 anos de idade)</i>				
<i>Lípides</i>	<i>Idade (anos)</i>	<i>Valores (mg/dl)</i>		
		<i>Desejáveis</i>	<i>Limítrofes</i>	<i>Alterados</i>
<i>Colesterol Total</i>		<i>< 170</i>	<i>170 – 199</i>	<i>> ou = 200</i>
<i>Colesterol LDL</i>		<i>< 110</i>	<i>110 – 129</i>	<i>> ou = 130</i>
<i>Colesterol HDL</i>	<i>< 10</i>	<i>> ou = 40</i>	<i>---</i>	<i>---</i>
	<i>10</i>	<i>> ou = 35</i>	<i>---</i>	<i>---</i>
<i>Triglicerídeos</i>	<i>< 10</i>	<i>< ou = 100</i>	<i>---</i>	<i>> 100</i>
	<i>10 – 19</i>	<i>< ou = 130</i>	<i>---</i>	<i>> 130</i>

- Diabéticos, conforme critérios estabelecidos pela Sociedade Brasileira de Diabetes:

Valores de glicose plasmática (em mg/dl) para diagnóstico de *Diabetes Mellitus* e seus estágios pré-clínicos (OLIVEIRA; VENCIO, 2014):

<i>Categoria:</i>	<i>Jejum</i>	<i>2h após 75gde glicose</i>	<i>Casual</i>
<i>Glicemia normal</i>	<i>< 100</i>	<i>< 140</i>	
<i>Tolerância à glicose</i>			
<i>Diminuída</i>	<i>> 100 a < 126</i>	<i>≥ 140 a < 200</i>	
<i>Diabetes Mellitus</i>	<i>≥ 126</i>	<i>≥ 200</i>	<i>≥ 200</i>

(com sintomas clássicos)

- Perda de função renal, conforme orientação da Sociedade Brasileira de Pediatria, utilizando a Equação de Counahan-Barratt (BELANGERO, 2015):

$$FG \text{ (ml/min/1,73m}^2\text{)} = 0,43 \times \text{altura} / \text{Creat ser}$$

Sendo excluídos pacientes com depuração da creatinina endógena abaixo de 90 ml/min/1,73 m².

- Outras doenças inflamatórias.

Após a aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS, os pacientes ou seus responsáveis assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ou Termo de Assentimento (Anexos B).

- 5.5 – Métodos

5.5.1. Rigidez arterial

Para análise da rigidez arterial, foi utilizado um equipamento de análise oscilométrica não invasiva da onda de pulso por manguito de oclusão da artéria braquial (38), através do equipamento CardioSDyna – MAPA +, através de uso consignado do laboratório Cardio S Ltda, não representando qualquer custo para realização do estudo. A capacitação para o uso do equipamento foi feita no Ambulatório de insuficiência cardíaca do Hospital São Lucas da PUCRS.

A avaliação da rigidez consistiu na colocação de um manguito de medida de pressão arterial no braço do paciente, conectado ao aparelho que fez o registro dessa medida. O aparelho trazia um conjunto de três manguitos (tamanho pequeno 20 a 25 cm, tamanho médio 24 a 32 cm e tamanho grande 30 a 40 cm). Foi realizada a medida de pressão arterial, conforme a rotina descrita abaixo. A seguir, o aparelho era desconectado do braço do paciente e este era liberado. O aparelho era conectado a um computador, que através de um programa, transforma a medida da pressão da artéria braquial em medida de rigidez arterial. Os dados ficavam armazenados para análise posterior. O procedimento respeitou as orientações

recomendadas pela instrução científica da American Heart Association (32) para medida de rigidez arterial conforme abaixo:

Preparo do paciente:

- Os Pacientes foram orientados a suspender medicamentos vasoativos por um período de doze horas antes do exame e evitar consumo de produtos contendo cafeína ou uso do cigarro 4 horas antes da avaliação;

Medidas:

- Os pacientes repousaram por dez minutos em uma sala em silêncio, em decúbito dorsal antes do exame;

- Os Pacientes não poderiam falar durante o exame a fim de evitar a influência da fala sobre o tônus arterial;

- As avaliações sempre ocorreram no turno da manhã para todos os pacientes a fim de evitar influência da variação diurna sobre a rigidez arterial;

- As medidas sempre foram realizadas pelo mesmo avaliador (a própria mestranda). Duas medidas consecutivas foram realizadas.

Para a análise do comprimento dos telômeros, foi feita a coleta de 10 ml de sangue periférico e efetuada a técnica de PCR quantitativa (67). Esta análise foi realizada no Laboratório de biologia Molecular e Bioinformática do Departamento de Bioquímica da UFRGS. A obtenção do material para esta análise foi feita de forma casada com a coleta de rotina que os pacientes com AIJ em acompanhamento no Ambulatório de Reumatologia Pediátrica do HSL-PUCRS normalmente fazem para acompanhamento da atividade da doença e controle do tratamento, não representando coleta adicional nestes pacientes.

5.5.2. Material biológico

Os procedimentos realizados para a avaliação do material deste estudo seguiram os mesmos passos descritos por Grun, et al (GRUN et al., 2015).

Purificação de células mononucleares de sangue periférico (PBMC)

O sangue colhido dos pacientes foi dispensado em tubos de 15 mL contendo o

anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), sendo homogeneizado por inversão. Em seguida, o sangue foi cuidadosamente repassado para novos tubos de 15 mL contendo uma fase de Histopaque®-1077 (densidade: 1,077 g/mL, Sigma Aldrich, EUA) na razão de 1:1 e então, centrifugado a 400 xg por 30min, sem freio. Após a centrifugação, a nuvem de PBMC presente na interfase foi aspirada e ressuspendidas em solução salina fosfato-tamponada Dulbecco (DPBS) e centrifugada novamente. O rendimento e a viabilidade celular foram determinados pela contagem em hemocitômetro, com o corante azul de Tripán (Sigma Aldrich), em um microscópio de contraste de fase.

Extração de DNA genômico

Método do Fenol/clorofórmio/álcool isoamílico

Fizemos a extração de DNA genômico, a partir das PBMC purificadas e também a partir de sangue total (200MI). O método de extração utilizado, foi previamente padronizado no Laboratório de Biologia Molecular e Bioinformática do Departamento de Bioquímica da UFRGS e baseado na técnica de extração pelo fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) (64).

A extração do material biológico foi realizada durante três dias, sendo que no primeiro dia as células foram lisadas com água ultrapura do tipo Milli-Q seguido por repetidas centrifugações de curta duração, lavadas em DPBS, e incubadas por 12-18 h a 50°C em solução tamponada (constituído por 2% de Tween 20, EDTA 1mM e Tris-HCl 50mM) contendo Proteinase K (2mg/mL, Promega,EUA). No segundo dia, foram adicionados 800µL do reagente fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) (Sigma-Aldrich) à solução a fim de precipitar o DNA genômico das amostras, após a centrifugação a 14.000 RPM. A fase aquosa foi coletada e incubada por 12-18 h a -20°C em solução contendo 20% de acetato de sódio e 70% de álcool isopropílico. No terceiro dia, a solução foi centrifugada e o DNA genômico ressuspendido em água ultrapura do tipo Milli-Q e estocado a 4°C para a realização dos experimentos.

Avaliação do comprimento relativo de telômeros

Para cada reação de PCR, foram utilizados 25ng de DNA genômico molde para a quantificação do comprimento relativo dos telômeros. Para cada amostra foram realizadas duas reações de PCR em tempo real, em triplicata. Foram utilizados pares de oligonucleotídeos iniciadores já publicados (67). As reações foram realizadas utilizando a enzima *Platinum® Taq DNA polymerase* (Invitrogen, EUA), no aparelho StepOnePlus™ (Applied Biosystems, EUA). A especificidade das reações foi confirmada através da análise das curvas de dissociação (ao final de cada reação).

Em cada corrida (placa), utilizamos quatro controles. Um controle negativo, incluído para a detecção de uma possível contaminação dos reagentes ou falso-positivo na ausência do DNA genômico. Além disso, incluímos três controles positivos escolhidos de forma aleatória e utilizados como referência. Para monitorar a variação interplacas e permitir a obtenção um fator normalizador possibilitando assim a comparação das amostras de diferentes reações. Os resultados referentes às amostras foram analisados somente quando a eficiência da reação foi 80-110%, calculada mediante a seguinte fórmula, $E = (10^{-1/\text{pendente}} - 1) \times 100$. As triplicatas com diferença $\geq 0,3$ ciclos limiar (*Cycle Threshold* = Ct) foram repetidas. Os resultados foram analisados pelo cálculo $[2^{\text{Ct}} (\text{telômeros}) / 2^{\text{Ct}(36\text{B4})}]^{-1}$, denominado razão T/S (com cada amostra relativa à média do grupo controle) (67), utilizando o programa StepOne™ Software v2.3. (Applied Biosystems). Para cada estudo foi calculado o coeficiente de variação (CoV) = Desvio padrão/Média.

Reação para amplificação da seqüência de telômeros (T) e do gene 36B4 (S)

Na amplificação da seqüência dos telômeros (T), o iniciador direto pode hibridizar com qualquer trecho parcialmente complementar de 31bp disponível ao longo da seqüência de DNA telomérico (orientado no sentido 5'→3') em direção ao centrômero do cromossomo. Da mesma forma, o iniciador reverso pode hibridizar com qualquer trecho parcialmente complementar de 33bp ao longo da fita de DNA (orientado no sentido 5'→3') em direção à extremidade do cromossomo (CAWTHON, 2002). Para a amplificação da seqüência telomérica, o programa consistiu de um passo inicial de desnaturação a 95°C por 10 minutos, seguido de 22 ciclos a 95°C por 15 segundos, e 54°C por 2 minutos, seguido da curva de dissociação.

Além da reação de amplificação da seqüência telomérica, realizamos a amplificação de um gene autossômico de cópia única, que codifica para a fosfoproteína ácida de ribossomo P0 36B4 (RPLP0, número de acesso NM_053275). Esse gene foi utilizado na determinação do número de cópias de genoma por amostra. Para a amplificação da seqüência do gene 36B4, o programa consistiu de um passo inicial de desnaturação a 95°C por 10 minutos, seguido de 30 ciclos de 95°C por 15 segundos, e 60°C por 1 minuto, seguido da curva de dissociação.

A composição da mistura, para cada amostra, foi idêntica para ambas as reações T e S, e foi constituído por 2mM MgCl₂, 0,1mM de cada dNTP, e 0,4U de *Platinum® Taq DNA polymerase* (Invitrogen), com um volume final de 20µL. Para a detecção dos produtos amplificados ainda utilizamos 0,1x SYBR Green (Molecular Probes, EUA) na mistura. A molécula de SYBR Green é um fluoróforo intercalante com alta especificidade por DNA de fita dupla. Quando intercalado, emite fluorescência e permite a detecção do sinal durante a progressão do PCR, refletindo assim a quantidade de DNA amplificado a cada ciclo, em tempo real.

Análise e documentação dos géis de agarose

Todas as reações de PCR em tempo real foram confirmadas em gel de agarose 3%. Os produtos amplificados foram submetidos à corrida eletroforética horizontal em solução tamponada de TBE 1X (Tris, ácido bórico, EDTA) na presença de 1x SYBR® Safe (Invitrogen) durante 30 minutos a 100V. Os géis foram iluminados com luz UV (302nm) em transiluminador e posteriormente digitalizados para documentação (Gelliance 200™, Perkin Elmer®, EUA).

5.5.3. JADAS

As quatro medidas que compõem o JADAS-27 (CONSOLARO et al., 2009) foram aplicadas da seguinte forma:

- Avaliação global da atividade da doença, medida através de uma escala visual analógica (VAS) de 10 cm, onde 0 = sem atividade e 10 = máxima atividade.

- Avaliação de bem estar dos pais/ paciente medida através de uma escala visual analógica (VAS) de 10 cm, onde 0 = muito bem e 10 = muito mal.

- Contagem articular das articulações ativas em 27 sítios. As articulações consideradas nesta avaliação incluem: coluna cervical, cotovelos, punhos, metacarpofalangeanas (da primeira a terceira), interfalangeanas proximais, quadris, joelhos e tornozelos (CONSOLARO et al., 2009).

- Velocidade de eritrosedimentação (VSG) dada em mm/h O VSG é “normalizado” para uma escala de 0 a 10, conforme a fórmula:

$$\frac{VSG\left(\frac{mm}{h}\right) - 20}{10}$$

Antes de realizar o cálculo, valores de VSG menores que 20 mm/h são convertidos em zero e valores de VSG maiores que 120 mm/h são convertidos em 120. O cálculo do JADAS consiste no somatório simples destes quatro componentes que gera um escore global de 0 a 57 (CONSOLARO et al., 2009). Para classificar um paciente como tendo doença inativa o ponto de corte é 1, para todos os tipos de AIJ. Para doença minimamente ativa o escore em AIJ oligoarticular foi 2 e para poliarticular 3,8 (CONSOLARO et al., 2012). Para alta atividade da doença na AIJ oligoarticular o valor de corte é 4,2 e para AIJ poliarticular 8,5 (CONSOLARO et al., 2014).

5.6. Análise estatística

As variáveis analisadas, comprimento de telômeros e velocidade de onda de pulso e JADAS são contínuas e foram apresentadas por média e desvio padrão ou mediana e amplitude interquartilica. As variáveis categóricas foram descritas por frequências absolutas e relativas.

Para comparar médias, o teste t-student foi aplicado. Em caso de assimetria, o teste de Mann-Whitney foi utilizado.

A associação entre as variáveis numéricas foi avaliada pelos coeficientes de correlação de Pearson (distribuição simétrica) ou de Spearman (distribuição assimétrica).

Para controle de fatores confundidores, a Análise de Covariância (ANCOVA) foi aplicada. Para a utilização dessa análise, transformação logarítmica foi aplicada nos dados assimétricos.

O nível de significância adotado foi de 5% ($p \leq 0,05$) e as análises foram realizadas no programa *Statistical package for social science* (SPSS) versão 21.0.

Os dados foram organizados em um banco de dados digitado pela pesquisadora. Estas informações foram armazenadas em planilhas do programa Excel versão 2007.

5.7. Ética

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (CAAE: 42853615.6.0000.5336). A coleta de dados iniciou apenas após esta aprovação. Os pacientes e seus responsáveis assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e Termo de Assentimento, também aprovados por esta comissão. Os pacientes foram apenas incluídos neste estudo, após a assinatura deste documento, jamais sendo divulgados os nomes e dados pessoais destes. A avaliação laboratorial para AIJ já é parte integrante da avaliação de rotina destes pacientes e não representou coleta de sangue adicional. Os pacientes do grupo controle para avaliação do comprimento de telômeros foram oriundos de controles históricos de outros estudos já realizados pelo serviço de Pneumologia Pediátrica do Hospital São Lucas da PUCRS, não representando procedimento adicional de coleta de sangue. Os procedimentos realizados neste estudo foram, portanto, de risco mínimo para os participantes. O benefício oferecido aos pacientes foi o de diagnosticar seqüelas da inflamação prolongada sobre o material genético e aparelho cardiovascular através da de exames não disponíveis na rotina em nosso meio. O presente estudo também segue as regras mencionadas na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e as orientações éticas internacionais para pesquisa biomédica em seres humanos preconizadas pelo CIOMS (Council for International Organizations of Medical Science)

revisado em 2002 (<http://www.cioms.ch/index.php/2012-06-10-08-47-53/ethics/cioms-guidelines-working-group>).

6 - RESULTADOS

A amostra avaliada incluiu 24 pacientes com AIJ e 21 controles para os telômeros e 20 controles para rigidez arterial. Na comparação entre casos e controles para VOP não houve diferença quanto à idade ($P = 0,184$), sexo ($P = 0,458$), etnia ($P = 0,640$) e IMC ($P = 0,372$). Entre casos e controles para TL, houve diferença significativa em relação à idade e não foi encontrada diferença quanto a sexo, etnia, IMC, peso e altura. Foram incluídos os subtipos oligoarticular (65, 2%) e poliarticular, sendo que 73,9% eram meninas, 82,6% eram caucasianos. A média de idade foi $15,5 \pm 6,3$ anos e a mediana de duração da doença foi de 9 [5-19] anos. A tabela abaixo também descreve o uso de medicação na amostra com AIJ.

Tabela 1. Caracterização de casos e controles para TL.

Variáveis	casos n = 24	controles (TL) n = 21	P
Idade (anos) – média \pm DP	15,5 \pm 6,3	11,4 \pm 1,3	0,005*
Sexo - n (%)			
Masculino	7 (26,1)	8 (40,9)	0,460**
Feminino	17(73,9)	13 (59,1)	
Etnia - n(%)			
Caucasiana	19 (82,6)	17(81,8)	1,000***
Negros/Pardos	5 (17,4)	4 (18,2)	
Peso (Kg)- média \pm DP	50,1 \pm 17,5	42,5 \pm 10,2	0,085*
Altura (m)- média \pm DP	1,52 \pm 0,17	1,47 \pm 0,09	0,162*
IMC (KG/m ²) - média \pm DP	20,7 \pm 3,7	19,6 \pm 2,7	0,247*
Tempo de doença (anos) [P25 - P75]	9 [5-19]		
Subtipo – n(%)			
Oligoarticular	15 (65,2)		
Poliarticular	8 (34,8)		

Medicações – n(%)	
Corticóide	8 (34,8)
AINE	0(0,0)
Metotrexate	12 (52,2)
Leflunomida	10 (43,5)
Anti-TNF	7 (30,4)
Uveíte – n(%)	1 (4,3)

AINE: antiinflamatórios não-esteróides, Anti-TNF: anti-fator de necrose tumoral. * Teste t-student; ** teste qui-quadrado de Pearson; *** teste exato de Fisher.

Quanto ao tratamento, observamos que nenhum paciente estava em uso regular de AINEs, 95,7% da amostra estava em uso regular de drogas modificadoras da atividade da doença e cerca de 30% estava em uso de terapia biológica e a mesma proporção estava em uso de corticoterapia.

A tabela 2 mostra as variáveis para avaliação da atividade da doença e a tabela 3 mostra como os pacientes foram classificados de acordo com o JADAS.

Tabela 2 – Caracterização da atividade da doença

	Mediana [P25-P75]
JADAS	8 [0,00 - 20,1]
ProtCreativa	1 [0,5 -1,6]
VSG	10 [2,00 – 21]
VASp	4 [1 – 5]

dp: Desvio-padrão, JADAS: juvenile arthritis activity score, com escore global de 0 a 57(CONSOLARO, 2009), ProtCreativa (Proteína C reativa) em mg/L, VSG (Velocidade de hemossedimentação) em mm/h, VASp (Avaliação de bem estar dos pais/ paciente pela escala visual analógica (VAS) de 10 cm, onde 0 = muito bem e 10 = muito mal).

O principal fator associado ao JADAS foi a avaliação do bem estar dos pais / paciente pela escala visual analógica, conforme observado no índice de correlação

forte entre essas variáveis (Spearman $r = 0,872$, $P = 0,001$). Esta correlação foi fraca com o VSG (Spearman $r = 0,277$, $P = 0,201$). A tabela 3 mostra como os pacientes se dividiram de acordo com os pontos de corte para doença inativa, minimamente ativa, moderada e alta atividade.

Resultados da avaliação da velocidade de onda de pulso

A média da VOP na amostra foi de $5,10 \pm 0,20$ vs. $4,98 \pm 0,06$ m/s, não havendo qualquer diferença detectável em relação aos controles (Tabela 4). Lembramos que na comparação entre casos e controles para VOP não houve diferença quanto à idade ($P = 0,184$), sexo ($P = 0,458$), etnia ($P = 0,640$) e IMC ($P = 0,372$).

Quanto à avaliação da pressão de pulso (PP), não foi encontrada diferença entre os grupos (tabela 3) nem correlação com a VOP (Pearson = $0,172$, $P = 0,636$) e com o JADAS (Pearson = $0,283$, $P = 0,166$). A variação foi pequena entre os sexos: $39,8 \pm 8,68$ mmhg entre os meninos e $38,8 \pm 10,0$ mmhg entre as meninas.

Tabela 3: Achados de velocidade de onda de pulso e pressão de pulso em AIJ e controles

Variável	AIJ (n = 24)	Controles (n = 20)	<i>P</i>
VOP	$5,1 \pm 0,2$	$4,98 \pm 0,06$	0,660
PP	$39,1 \pm 9,5$	$37,5 \pm 8,4$	0,423

VOP: Velocidade de onda de pulso em m/s. PP: pressão de pulso em mmhg.

Resultados da avaliação do comprimento de telômeros

Os resultados da análise evidenciaram diferença na razão T/S de leucócitos entre os pacientes com artrite idiopática juvenil e controles ($0,85 \pm 0,34$ vs. $1,67 \pm 1,38$, $P = 0,025$ pelo Teste de Mann-Whitney). Quando ajustado para idade através da ANCOVA, a diferença permaneceu significativa ($P = 0,032$). A figura 6 mostra a comparação T/S nos dois grupos.

Não houve associação entre razão T/S e tempo de doença, atividade da doença e subtipo.

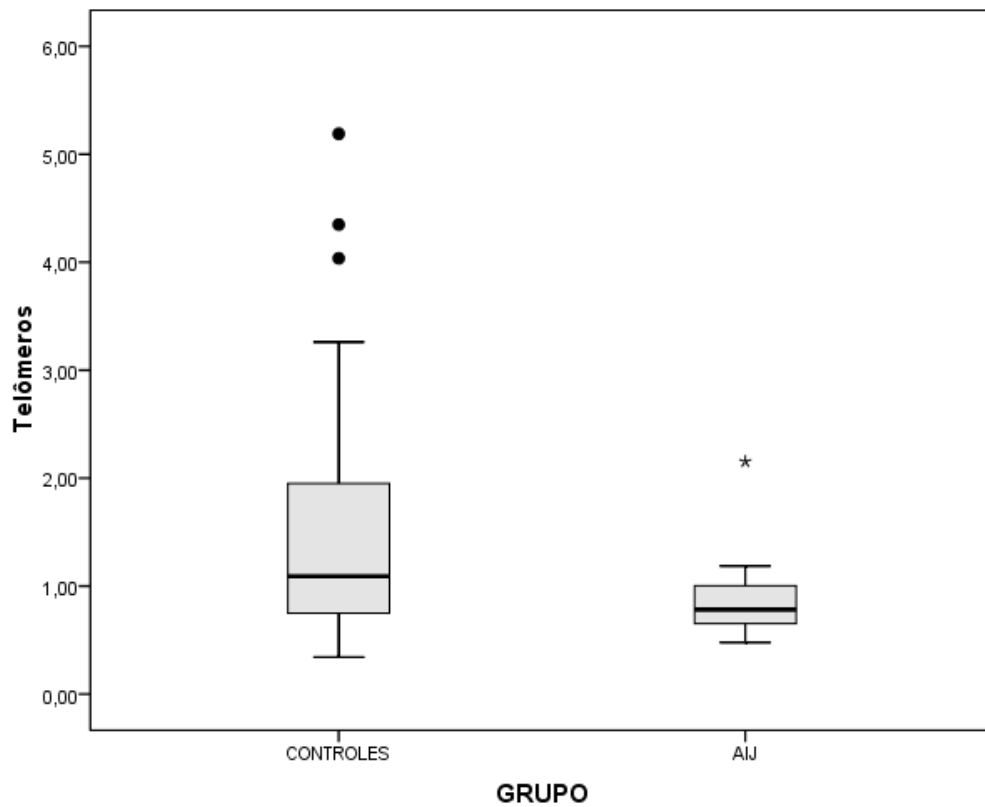


Figura 6. Avaliação do comprimento relativo de telômeros entre pacientes com AIJ e controles. Houve diferença significativa entre os dois grupos ($P = 0,025$) pelo teste de Mann-Whitney. Quando ajustado para idade através da ANCOVA, a diferença permanece significativa ($p=0,032$).

O coeficiente de variação entre os experimentos foi de 11% baseado na razão T/S da amostra de referência. Não houve correlação entre razão T/S e velocidade de onda de pulso, conforme abaixo:

Tabela 4 – Associação entre telômero e variáveis clínicas

Variáveis	Telômeros	
	Coeficiente de correlação	<i>P</i>
Tempo de doença	- 0, 201*	0, 358
Idade	- 0, 166**	0, 449
JADAS	- 0, 287*	0, 184
VOP	0, 044**	0, 843
PP	-0, 113*	0, 184

* coeficiente de Spearman; ** coeficiente de Pearson

A tabela 5 descreve as médias e desvios-padrões para as variáveis pesquisadas em AIJ e controles.

Tabela 5: Médias e DP para velocidade de onda de pulso e razão T/S de leucócitos

Variável	AIJ	Controles	<i>P</i>
VOP	5,1 ± 0,2 [5,0 – 6,1]	4,98 ± 0,06 [4,8 -5,1]	0, 660
T/S	0,78 ± 0,34 [0,65 – 1,03]	1,09 ± 1,38 [0,74 – 2,04]	0, 025

A expectativa da emergência das complicações cardiovasculares como importante causa de morbimortalidade entre os pacientes com AIJ tem impulsionado o interesse científico nessa direção, tanto na avaliação de doença aterosclerótica subclínica, como da arteriosclerose (BARSALOU; BRADLEY; SILVERMAN, 2013).

Em relação às características da amostra com AIJ, houve comportamento semelhante ao encontrado na literatura (1,2), ou seja, a maioria da amostra foi composta por pacientes do sexo feminino, de etnia caucasiana e com subtipo oligoarticular. Nossa amostra foi composta de pacientes com longo tempo de evolução de AIJ e com atividade da doença considerada alta a moderada de acordo com o JADAS, medida que foi fortemente influenciada pelo componente de avaliação de bem estar pelos pais/paciente e pouco influenciada pelo componente laboratorial desse score. Essa é uma ferramenta de introdução recente e acreditamos que sua interpretação deveria ser feita dentro do contexto clínico, uma vez que o componente de avaliação do bem estar é subjetivo e pode ser influenciado por questões não diretamente ligadas a atividade inflamatória, ou que não deveriam ser manejadas por prescrição medicamentosa. Este comportamento poderá ser um limitador da valorização dos seus dados em estudos clínicos e como ferramenta de indicação de terapias mais agressivas de forma isolada nesses pacientes.

Até onde é de nosso conhecimento, este é o primeiro estudo em que crianças com AIJ são avaliadas com a técnica oscilométrica, que tem se mostrado de fácil aplicabilidade e com ótima correlação com outros métodos de avaliação da hemodinâmica pulsátil (ELMENDORST et al., 2015). Acreditamos que, por suas características, essa técnica poderá facilitar a incorporação da avaliação da rigidez arterial na rotina em pediatria.

Em relação às medidas de rigidez arterial, nossa amostra de pacientes teve todas as medidas dentro dos valores de normalidade (ELMENDORST et al., 2015) (BATISTA et al., 2015) e ausência de diferença entre as médias, sugerindo que não

houve impacto da inflamação nesta variável, mesmo se tratando de pacientes com longa duração da AIJ e atividade da doença classificada como alta a moderada.

Também não foi verificada elevação da pressão de pulso, como medida indireta da rigidez arterial, na amostra estudada, sendo encontrados valores que estão de acordo com os achados descritos na literatura em crianças e adolescentes (DOST et al., 2014). Não houve correlação com JADAS, VOP e comprimento de telômeros.

A relação de AIJ com doença arterial também foi explorada por Argyropoulou et al avaliaram a VOP e distensibilidade aórtica em uma amostra de 31 pacientes com AIJ, subtipos oligoarticular, poliarticular e sistêmico, e controles, testando níveis glicêmicos e perfil lipídico, através da ressonância nuclear magnética e encontraram diferença significativa ($3,68 \pm 1,59$ vs. $1,38 \pm 0,54$ m/s, $P < 0,01$) (ARGYROPOULOU et al., 2003). Não encontramos referência a IMC nesses pacientes. Estes autores encontraram correlação entre VOP e idade, mas não entre VOP e parâmetros metabólicos e de atividade da doença.

Vlahos et al estudaram 30 pacientes com AIJ de longa evolução, subtipos oligoarticular, poliarticular e sistêmico, comparados a controles e não encontraram diferença significativa na medida da VOP através do tonômetro ($5,5 \pm 0,9$ vs. $5,7 \pm 1,0$ m/s). Foram excluídos pacientes obesos, hipertensos, dislipidêmicos, diabéticos (VLAHOS et al., 2011). Estes autores encontraram um padrão de envolvimento vascular semelhante ao descrito em DM I, com redução da função endotelial e espessamento da camada íntima- média da carótida (em pacientes com subtipo sistêmico), na ausência de alterações estruturais ateroscleróticas.

O estudo de Satija et al não encontrou diferença significativa em 31 pacientes com AIJ de diagnóstico recente e controles quanto a dilatação mediada por fluxo, mediada por gliceril trinitrato na artéria braquial, no espessamento de camada íntima – média da carótida e, mas sim em medidas de complacência parietais (SATIJA et al., 2014).

O estudo de Aullie et al usou 87 pacientes acompanhados em uma coorte de AIJ, de todos os subtipos da classificação do ILAR, com mediana de idade de 38,4 anos e com pelo menos 15 anos de doença comparados a controles (AULIE et al., 2014). A VOP através da tonometria esteve bastante alterada ($7,2 \pm 1,0$ vs. $6,9 \pm 0,8$ m/s, $P = 0,035$), além da pressão sistólica e diastólica. Destaca-se o maior número de

fumantes e a presença de resistência a insulina nessa amostra quando comparados a controles ($P = 0,043$ e $P = 0,034$).

Ilisson *et al* examinaram um grupo de 39 crianças com AIJ, que incluiu pacientes com subtipos, poliarticular e oligoarticular, inclusive com HLA – 27 presente, e controles, através da tonometria. Houve diferença nas medidas de espessamento de camada intima – média da carótida ($0,46 \pm 0,04$ vs. $0,42 \pm 0,04$ mm, $P < 0,0003$) e na medida da mieloperoxidase ($115,2$ [95% IC] $97,4 - 136,3$ vs. $57,6$ [95% IC] $47,1 - 70,3$, $P < 0,0001$), um marcador de estresse oxidativo e inflamação, mas não na VOP carótida-femoral (ILISSON *et al.*, 2015).

É chamativa a heterogeneidade entre os subtipos de AIJ selecionados nestes estudos, dificultando a comparação destes resultados. As evidências fisiopatológicas recentes têm apontado na direção de um “descolamento” do subtipo sistêmico das demais categorias de AIJ (RIGANTE, 2014). Trata-se de um subtipo reconhecidamente com mais atividade inflamatória maior morbidade e mortalidade que os demais, o que pode ter influenciado os resultados desses estudos. Além disso, a ferramenta utilizada no nosso estudo para avaliação da atividade da AIJ, JADAS, não é adequada para uso neste subtipo, de acordo com os autores (CONSOLARO *et al.*, 2009). Também não nos parece adequado a inclusão de pacientes com artrite psoriásica, artrite associada à entesite e pacientes HLA – B27+, por se tratar de um subgrupo onde a evolução para artropatia soro negativa é importante e este ser um grupo de pacientes onde a morbidade e mortalidade cardiovasculares são reconhecidamente mais pronunciadas.

Nossos resultados parecem concordar com os achados de Vlahos *et al*, cuja amostra excluiu especificamente pacientes com fatores de risco para doença cardiovascular. Todos esses estudos parecem indicar um comprometimento aterosclerótico mais importante nessa população de pacientes. De uma maneira geral, conforme mostrado por Aulie *et al*, achados alterados de rigidez arterial apareceriam secundariamente à sobreposição de fatores de risco para doença cardiovascular, que poderiam aparecer ao longo da evolução destes pacientes, como tabagismo e Diabetes Mellitus, e não necessariamente relacionados ao tempo de doença propriamente dito ou atividade inflamatória. Outro autor, Arida *et al*, observaram achados semelhantes em uma amostra de pacientes com artrite reumatóide (ARIDA *et al.*, 2015).

Em relação aos achados referentes ao comprimento de telômeros, nossos resultados estão de acordo aos já relatados na literatura. Chamamos a atenção para a ausência de prematuridade na amostra e para o fato de que, ao selecionar pacientes a partir dos sete anos, também eliminamos da análise crianças até os cinco anos de idade onde, fisiologicamente, o encurtamento de telômeros se dá de forma mais pronunciada associado ao crescimento, dessa forma “potencializando” a influência da atividade inflamatória sobre essa variável. Ainda sobre esse quesito, a idade significativamente menor do grupo controle ($11,4 \pm 1,3$ anos x $15,5 \pm 6,3$ anos, $P=0,005$) pode ter representado um potencial viés, visto que o esperado é o natural encurtamento dos TL em indivíduos mais velhos (61). Ainda assim, quando ajustado para idade através da ANCOVA, a diferença permaneceu significativa.

Prelog *et al* e Dvergstein *et al* encontraram diferenças significativas em pacientes com AIJ comparados a controles. Ambos concordam haver evidência para acreditar em imunoscenecência prematura na AIJ. Prelog *et al* testaram a correlação entre telômeros e idade, sexo, tempo de doença, uso de metotrexate e corticóides e encontraram resultados não significativos. Na nossa amostra de pacientes, também não houve associação entre tempo de doença, subtipo, uso de medicamentos ou índice de atividade inflamatória, que foi elevado nos nossos pacientes.

As evidências sobre a avaliação do comprimento de telômeros em artrite reumatóide também geraram resultados semelhantes, ou seja, não foi encontrada correlação entre tempo de doença, índices de atividade da doença e uso de imunossupressores. Autores apóiam a hipótese de que o encurtamento telomérico em artrite reumatóide se deve mais a um defeito intrínseco da manutenção dos telômeros ou da atividade da telomerase em nível abaixo do ideal do que uma consequência da atividade inflamatória e do uso de imunossupressores.

Em face dos nossos resultados, deve se questionar qual seria o significado dos telômeros curtos em AIJ, mas isso ainda permanece uma questão a ser respondida por estudos de seguimento, agregando informações sobre risco de eventos clínicos inclusive.

Os achados deste estudo de certa forma vão ao encontro da “hipótese unificadora”, que defende que a erosão telomérica e a rigidez arterial sofrem impacto da atividade inflamatória secundária a influência dos fatores de risco

cardiovasculares. Nesta amostra, a presença de atividade inflamatória sem fatores de risco não impactou nos índices de rigidez, nem se correlacionou com telômeros encurtados.

Nossos dados não evidenciaram a correlação entre comprimento de telômeros e medidas de rigidez arterial, variáveis grandemente influenciadas pelo envelhecimento, em uma amostra de pacientes com AIJ, com subtipos oligoarticular e poliarticular, de evolução prolongada e com alto índice de atividade de doença. Acreditamos ser este um modelo interessante, *in vivo*, para estudar a influência da atividade inflamatória nessas variáveis, excluindo o impacto da idade e outros potenciais confundidores, os fatores de risco para doença cardiovascular. A exclusão dos pacientes com menos de sete anos de idade também retirou pacientes que poderiam ter suas medidas de rigidez arterial em processo fisiológico de elevação, confundindo os resultados. Até onde é de nosso conhecimento, este é o primeiro estudo em que a correlação entre essas variáveis foi estudada nas doenças reumáticas e na pediatria.

Limitações

A detecção da idade maior no grupo AIJ em relação aos controles dos TL pode ter representado um potencial viés. Porém, o tamanho da influência pode não ter sido importante, como sugerido pela permanência de diferença após ajuste para idade, já que ambos os grupos apresentaram uma idade média superior a 5 anos e nenhum grupo teve qualquer participante abaixo dos 7 anos de idade, período crucial na diferenciação da erosão telomérica (61).

A técnica da qPCR apresenta limitações referentes às técnicas de extração do DNA, a variação na quantidade do DNA presente nos tubos que podem impactar na sua qualidade e na precisão do ensaio. Ambos são limitantes do uso dessa técnica em grandes estudos populacionais e na rotina de avaliação clínica. A grande variabilidade em estimativas repetidas, mesmo quando feito por profissionais experientes, também é uma limitação do método que dificulta sua utilização em grandes populações. O coeficiente de variação alto também foi relatado em vários outros estudos (GRUN et al., 2015) e é uma limitação desse método.

A avaliação da rigidez arterial através da técnica oscilométrica apresentou pequena variabilidade na nossa amostra. A variabilidade parece ser maior com uso de outras técnicas, como a tonometria. O tamanho de amostra calculado para averiguar a diferença em medidas de VOP em pacientes com AIJ e controles pode não ter sido suficiente para detectar essas diferenças com a técnica escolhida. A diferença observada na VOP de 0.12 com desvio padrão no grupo controle de 0,06 sugere que seriam necessários entre 44 a 59 indivíduos para atingir significância estatística.

Outra limitação do nosso estudo pode ter sido o tamanho de amostra pequeno para testar a correlação entre rigidez arterial e comprimento de telômeros. Entretanto, a análise do presente estudo foi realizada com 24 pacientes incluídos, demonstrando diferença significativa no TL e uma VOP muito estável, não havendo qualquer diferença detectável de acordo com sexo e idade. Em função deste achado, a opção dos autores foi de proceder à análise dos dados. Assumindo o tamanho amostral, o estudo pode ser conceituado como piloto.

Mesmo que não tenha sido o nosso objetivo inicial, o tamanho de amostra pequeno também não permitiu detectar diferenças no comportamento dessas variáveis entre os diferentes subtipos de AIJ.

O desenho transversal também limita esclarecer a respeito da natureza dos achados encontrados quanto ao significado dos telômeros curtos em uma amostra de pacientes com AIJ.

Dessa forma, os resultados desse trabalho permitem concluir que:

- Não foi possível detectar diferenças quanto à velocidade de onda de pulso avaliada através da oscilometria entre pacientes com artrite idiopática juvenil e controles.
- Foi possível detectar diferença significativa quanto ao comprimento de telômeros avaliado através da técnica da reação em cadeia da polimerase quantitativa entre pacientes com artrite idiopática juvenil e controles.
- Não foi possível estabelecer correlação entre essas variáveis em uma amostra de pacientes com artrite idiopática juvenil de longa evolução e com atividade da doença classificada como alta a moderada.

PERSPECTIVAS

A observação de não concordância entre encurtamento de telômeros, VOP e JADAS sugere que este marcador seja mais investigado. É possível que erosão telomérica seja um sinal precoce de progressão clínica acelerada ou de pior prognóstico. Isto poderia ser investigado com estudos longitudinais, conforme sugerido na literatura (NILSSON et al., 2013). O seguimento dessa população, com incremento no número de participantes, poderá contribuir para estimar o risco das variáveis TL e VOP em desenvolver desfechos clínicos relacionados diretamente à AIJ e à DCV.

- ABRAMSON, J. L.; WEINTRAUB, W. S.; VACCARINO, V. Association between pulse pressure and C-reactive protein among apparently healthy US adults. **Hypertension**, v. 39, n. 2, p. 197–202, fev. 2002.
- ALHUZAIMI, A. et al. Echo-Doppler assessment of arterial stiffness in pediatric patients with Kawasaki disease. **Journal of the American Society of Echocardiography: official publication of the American Society of Echocardiography**, v. 26, n. 9, p. 1084–9, set. 2013.
- ARGYROPOULOU, M. I. et al. Distensibility and pulse wave velocity of the thoracic aorta in patients with juvenile idiopathic arthritis: an MRI study. **Clinical and experimental rheumatology**, v. 21, n. 6, p. 794–7, jan. 2003.
- ARIDA, A. et al. Rheumatoid arthritis is sufficient to cause atheromatosis but not arterial stiffness or hypertrophy in the absence of classical cardiovascular risk factors. **Clinical rheumatology**, v. 34, n. 5, p. 853–9, maio 2015.
- AULIE, H. A. et al. Arterial haemodynamics and coronary artery calcification in adult patients with juvenile idiopathic arthritis. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 74, n. 8, p. 1515–21, ago. 2014.
- AVIV, A. Chronology versus biology: telomeres, essential hypertension, and vascular aging. **Hypertension**, v. 40, n. 3, p. 229–32, set. 2002.
- AVIV, A. et al. Impartial comparative analysis of measurement of leukocyte telomere length/DNA content by Southern blots and qPCR. **Nucleic acids research**, v. 39, n. 20, p. e134, 1 nov. 2011.
- BARNES, M. G. et al. Subtype-specific peripheral blood gene expression profiles in recent-onset juvenile idiopathic arthritis. **Arthritis and rheumatism**, v. 60, n. 7, p. 2102–12, jul. 2009.
- BARSALOU, J.; BRADLEY, T. J.; SILVERMAN, E. D. Cardiovascular risk in pediatric-onset rheumatological diseases. **Arthritis research & therapy**, v. 15, n. 3, p. 212, jan. 2013.
- BATISTA, M. S. et al. Factors associated with arterial stiffness in children aged 9-10 years. **Revista de saúde pública**, v. 49, p. 23, jan. 2015.
- BELANGERO, V. **Doença renal crônica na infância Definição, epidemiologia e alerta para o diagnóstico** Sociedade Brasileira de Pediatria, 2015.

- BENETOS, A. et al. Telomere length as an indicator of biological aging: the gender effect and relation with pulse pressure and pulse wave velocity. **Hypertension**, v. 37, n. 2 Pt 2, p. 381–5, fev. 2001.
- BERG, I. J. et al. CRP and ASDAS are associated with future elevated arterial stiffness, a risk marker of cardiovascular disease, in patients with ankylosing spondylitis: results after 5-year follow-up. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 74, n. 8, p. 1562–6, ago. 2015.
- BEUKELMAN, T. et al. 2011 American College of Rheumatology recommendations for the treatment of juvenile idiopathic arthritis: initiation and safety monitoring of therapeutic agents for the treatment of arthritis and systemic features. **Arthritis Care & Research**, v. 63, n. 4, p. 465–82, 2011.
- BULATOVIĆ CALASAN, M. et al. Interpretation of the Juvenile Arthritis Disease Activity Score: responsiveness, clinically important differences and levels of disease activity in prospective cohorts of patients with juvenile idiopathic arthritis. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 53, n. 2, p. 307–12, fev. 2014.
- CAWTHON, R. M. Telomere measurement by quantitative PCR. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 10, p. e47, 2002.
- CAWTHON, R. M. Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. **Nucleic acids research**, v. 37, n. 3, p. e21, fev. 2009.
- CHEUNG, Y. Arterial stiffness in the young: Assessment, determinants, and implications. **Korean Circulation Journal**, v. 40, n. 4, p. 153–162, 2010.
- CHOW, P.-C. et al. Relation of arterial stiffness to left ventricular structure and function in adolescents and young adults with pediatric-onset systemic lupus erythematosus. **The Journal of rheumatology**, v. 34, n. 6, p. 1345–52, jun. 2007.
- CONSOLARO, A. ET AL. Development and validation of a composite disease activity score for juvenile idiopathic arthritis. **Arthritis and rheumatism**, v. 61, n. 5, p. 658–66, 15 maio 2009.
- CONSOLARO, A. et al. Development and validation of a composite disease activity score for juvenile idiopathic arthritis. **Arthritis and rheumatism**, v. 61, n. 5, p. 658–66, 15 maio 2009.
- CONSOLARO, A. et al. Remission, minimal disease activity, and acceptable symptom state in juvenile idiopathic arthritis: Defining criteria based on the juvenile arthritis disease activity score. **Arthritis & Rheumatism**, v. 64, n. 7, p. 2366–2374, 2012.

- CONSOLARO, A. et al. Defining criteria for high disease activity in juvenile idiopathic arthritis based on the juvenile arthritis disease activity score. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 73, n. 7, p. 1380–3, jul. 2014.
- COULSON, E. J. et al. Cardiovascular risk in juvenile idiopathic arthritis. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 52, n. 7, p. 1163–71, 2013.
- COX M , DOUDNA JA, O. **Biologia Molecular: Princípios e Técnicas**. [s.l.] Artmed Editora, 2009.
- CUNHA, R. Brazilian Journal of Hypertension. **Brazilian Journal of Hypertensio**, v. 11, n. 3, p. 152–156, 2005.
- DE MEYER, T. et al. No shorter telomeres in subjects with a family history of cardiovascular disease in the Asklepios study. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 32, n. 12, p. 3076–81, dez. 2012.
- DOST, A. et al. Pulse pressure in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus in Germany and Austria. **Pediatric Diabetes**, v. 15, n. 3, p. 236–243, 28 maio 2014.
- DOYON, A. et al. Carotid artery intima-media thickness and distensibility in children and adolescents: reference values and role of body dimensions. **Hypertension**, v. 62, n. 3, p. 550–6, 1 set. 2013.
- DVERGSTEN, J. A. et al. Premature cell senescence and T cell receptor-independent activation of CD8+ T cells in juvenile idiopathic arthritis. **Arthritis and rheumatism**, v. 65, n. 8, p. 2201–10, ago. 2013.
- ELBERS, C. C. et al. Comparison between southern blots and qPCR analysis of leukocyte telomere length in the health ABC study. **The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences**, v. 69, n. 5, p. 527–31, maio 2014.
- ELMENDORST, J. et al. Percentiles for central blood pressure and pulse wave velocity in children and adolescents recorded with an oscillometric device. **Atherosclerosis**, v. 238, n. 1, p. 9–16, jan. 2015.
- FEITOSA, S. K. **Reumatologia Pediátrica**.
- FYHRQUIST, F.; SAIJONMAA, O.; STRANDBERG, T. The roles of senescence and telomere shortening in cardiovascular disease. **Nature reviews. Cardiology**, v. 10, n. 5, p. 274–83, maio 2013.
- GEORGIN-LAVIALLE, S. et al. The telomere/telomerase system in autoimmune and systemic immune-mediated diseases. **Autoimmunity Reviews**, v. 9, n. 10, p. 646–

651, 2010.

GIANNINI, E. H. et al. Preliminary definition of improvement in juvenile arthritis. **Arthritis and rheumatism**, v. 40, n. 7, p. 1202–9, jul. 1997.

GODOY-MATOS AF, OLIVEIRA J, GUEDES EP, CARRARO L, LOPES AC, MANCINI MC, S.; HL, BRITO CLS, BYSTRONSKI DP, MOMBACH KD, STENZEL LM, REPETTO G, R. R.; HALPERN ZSC, VILLARES SMF, ARRAIS RF, RODRIGUES MDB, MAZZA FC, BITTAR T, B. A. Diretrizes Brasileiras de Obesidade - ABESO. 2009.

GORONZY, J. J.; FUJII, H.; WEYAND, C. M. Telomeres, immune aging and autoimmunity. **Experimental gerontology**, v. 41, n. 3, p. 246–51, mar. 2006.

GRUN et al. **Padronização da técnica de PCR em tempo real para a determinação do comprimento relativo de telômeros em diferentes desordens associadas ao envelhecimento.** [s.l: s.n.].

HOHENSINNER, P. J.; GORONZY, J. J.; WEYAND, C. M. Telomere dysfunction, autoimmunity and aging. **Aging and disease**, v. 2, n. 6, p. 524–37, dez. 2011.

ILISSON, J. et al. Increased carotid artery intima-media thickness and myeloperoxidase level in children with newly diagnosed juvenile idiopathic arthritis. **Arthritis Research & Therapy**, v. 17, n. 1, p. 180, 2015.

JAMES T. CASSIDY, ROSS E PETTY, RONALD M. LAXER, C. B. L. **Textbook of Pediatric Rheumatology.**

JARVIS, J. N. et al. Evidence for chronic, peripheral activation of neutrophils in polyarticular juvenile rheumatoid arthritis. **Arthritis research & therapy**, v. 8, n. 5, p. R154, jan. 2006.

JEANCLOS, E. et al. Telomere length inversely correlates with pulse pressure and is highly familial. **Hypertension**, v. 36, n. 2, p. 195–200, ago. 2000.

KAJANTIE, E. et al. No association between body size at birth and leucocyte telomere length in adult life--evidence from three cohort studies. **International journal of epidemiology**, v. 41, n. 5, p. 1400–8, out. 2012.

LAURENT, S. et al. Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. **European heart journal**, v. 27, n. 21, p. 2588–605, nov. 2006.

LI, X. et al. Gender-specific association between pulse pressure and C-reactive protein in a Chinese population. **Journal of Human Hypertension**, v. 19, n. 4, p. 293–299, 27 jan. 2005.

- MALAQUIAS, M. Arterial stiffness as a damage marker in the present and a risk predictor in the future. **Brazilian Journal of Hypertension**, v. 11, n. 3, p. 157–160, 2004.
- MARTÍN-MARTÍNEZ, M. A. et al. Recommendations for the management of cardiovascular risk in patients with rheumatoid arthritis: scientific evidence and expert opinion. **Seminars in arthritis and rheumatism**, v. 44, n. 1, p. 1–8, ago. 2014.
- MATTACE-RASO, F. U. S. et al. C-reactive protein and arterial stiffness in older adults: the Rotterdam Study. **Atherosclerosis**, v. 176, n. 1, p. 111–6, set. 2004.
- MCENIERY, C. M. et al. An analysis of prospective risk factors for aortic stiffness in men: 20-year follow-up from the Caerphilly prospective study. **Hypertension**, v. 56, n. 1, p. 36–43, jul. 2010.
- MEUNE C, TOUZÉ E, TRINQUART L, A. Y. High risk of clinical cardiovascular events in rheumatoid arthritis: Levels of associations of myocardial infarction and stroke through a systematic review and meta-analysis. **Archives of cardiovascular diseases**, v. 103, n. 4, p. 253–61, abr. 2010.
- MONTPETIT, A. J. et al. Telomere length: a review of methods for measurement. **Nursing research**, v. 63, n. 4, p. 289–99, jan. .
- NAGANO, M. et al. Association between serum C-reactive protein levels and pulse wave velocity: a population-based cross-sectional study in a general population. **Atherosclerosis**, v. 180, n. 1, p. 189–95, maio 2005.
- NILSSON, P. M. et al. Telomeres and cardiovascular disease risk: an update 2013. **Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine**, v. 162, n. 6, p. 371–80, dez. 2013.
- NOGUEIRA, R. et al. Comunicações Breves A importância clínica da pressão de pulso. v. 10, n. 2, p. 140–141, 2003.
- OEN, K. et al. Juvenile rheumatoid arthritis in a Canadian First Nations (aboriginal) population: onset subtypes and HLA associations. **The Journal of rheumatology**, v. 25, n. 4, p. 783–90, abr. 1998.
- OGUZ, F. et al. Parvovirus B19 in the acute arthropathies and juvenile rheumatoid arthritis. **Journal of Paediatrics and Child Health**, v. 38, n. 4, p. 358–362, ago. 2002.
- OLIVEIRA, J. E. P. DE; VENCIO, S. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2013-2014/Sociedade Brasileira de Diabetes.**, 2014.
- PARK, S.; LAKATTA, E. G. Role of inflammation in the pathogenesis of arterial

- stiffness. **Yonsei medical journal**, v. 53, n. 2, p. 258–61, mar. 2012.
- PRAHALAD, S.; GLASS, D. N. A comprehensive review of the genetics of juvenile idiopathic arthritis. **Pediatric rheumatology online journal**, v. 6, p. 11, jan. 2008.
- PRELOG, M. et al. Premature aging of the immune system in children with juvenile idiopathic arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 58, n. 7, p. 2153–2162, 2008.
- PROVAN, S. A. et al. Early prediction of increased arterial stiffness in patients with chronic inflammation: a 15-year followup study of 108 patients with rheumatoid arthritis. **The Journal of rheumatology**, v. 38, n. 4, p. 606–12, abr. 2011.
- RIGANTE, D. The Etiology of Juvenile Idiopathic Arthritis. **Clinical reviews in allergy & immunology**, 2014.
- SALGADO, C. ET AL. Hipertensão arterial na infância. **Sociedade Brasileira de Pediatria**, v. Supl. 1, p. 10, 2003.
- SANTOS J, GUIMARÃES AC, D. J. Consenso Brasileiro Sobre Dislipidemias Detecção, Avaliação e Tratamento. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 43, n. 4, p. 287–305, ago. 1999.
- SATIJA, M. et al. Endothelial function, arterial wall mechanics and intima media thickness in juvenile idiopathic arthritis. **Clinical and experimental rheumatology**, v. 32, n. 3, p. 432–9, jan. 2014.
- SHAMMAS, M. A. Telomeres, lifestyle, cancer, and aging. **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**, v. 14, n. 1, p. 28–34, jan. 2011.
- SHANG, Q. et al. Increase in ventricular-arterial stiffness in patients with psoriatic arthritis. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 51, n. 12, p. 2215–23, dez. 2012.
- SHEN, J. et al. Cumulative inflammatory burden is independently associated with increased arterial stiffness in patients with psoriatic arthritis: a prospective study. **Arthritis research & therapy**, v. 17, p. 75, jan. 2015.
- SHENOI, S.; SHAFFER, M. L.; WALLACE, C. A. Environmental risk factors and early life exposures for Juvenile Idiopathic Arthritis; a case: Control study. **Arthritis care & research**, 30 nov. 2015.
- SHIRWANY, N. A.; ZOU, M. Arterial stiffness: a brief review. **Acta pharmacologica Sinica**, v. 31, n. 10, p. 1267–76, out. 2010.
- SOZERI, B. et al. The early cardiovascular changes in pediatric patients with systemic lupus erythematosus. **Pediatric nephrology (Berlin, Germany)**, v. 28, n. 3, p. 471–6, mar. 2013.
- STELMASZCZYK-EMMEL, A. et al. Identification, frequency, activation and function

- of CD4⁺ CD25^{high}FoxP3⁺ regulatory T cells in children with juvenile idiopathic arthritis. **Rheumatology International**, v. 32, n. 5, p. 1147–1154, 2012.
- STOLL, M. L.; CRON, R. Q. Treatment of juvenile idiopathic arthritis: a revolution in care. **Pediatric rheumatology online journal**, v. 12, p. 13, jan. 2014.
- STONER, L. et al. Validation of oscillometric pulse wave analysis measurements in children. **American journal of hypertension**, v. 27, n. 6, p. 865–72, jun. 2014.
- STRAZHESKO, I. et al. Association of Insulin Resistance, Arterial Stiffness and Telomere Length in Adults Free of Cardiovascular Diseases. **PloS one**, v. 10, n. 8, p. e0136676, jan. 2015.
- URBINA, E. M. et al. Noninvasive assessment of subclinical atherosclerosis in children and adolescents: recommendations for standard assessment for clinical research: a scientific statement from the American Heart Association. **Hypertension**, v. 54, n. 5, p. 919–50, nov. 2009.
- VEIJALAINEN, A. et al. Metabolic risk factors are associated with stiffness index, reflection index and finger skin temperature in children--Physical Activity and Nutrition in Children (PANIC) study. **Circulation journal: official journal of the Japanese Circulation Society**, v. 77, n. 5, p. 1281–8, jan. 2013.
- VLAHOS, A. P. et al. Changes in vascular function and structure in juvenile idiopathic arthritis. **Arthritis care & research**, v. 63, n. 12, p. 1736–44, dez. 2011.
- VOGES, I. et al. Normal values of aortic dimensions, distensibility, and pulse wave velocity in children and young adults: a cross-sectional study. **Journal of cardiovascular magnetic resonance: official journal of the Society for Cardiovascular Magnetic Resonance**, v. 14, p. 77, jan. 2012.
- VOGHEL, G. et al. Cellular senescence in endothelial cells from atherosclerotic patients is accelerated by oxidative stress associated with cardiovascular risk factors. **Mechanisms of ageing and development**, v. 128, n. 11-12, p. 662–71, jan. 2007.
- WALKER, D. J. et al. The associations between cardiovascular risk factors, physical activity, and arterial stiffness in youth. **Journal of physical activity & health**, v. 10, n. 2, p. 198–204, fev. 2013.
- WANG, M.; LAKATTA, E. G. Altered regulation of matrix metalloproteinase-2 in aortic remodeling during aging. **Hypertension**, v. 39, n. 4, p. 865–73, abr. 2002.
- WANG, Y.-Y. et al. Association of shorter mean telomere length with large artery stiffness in patients with coronary heart disease. **The aging male: the official journal of the International Society for the Study of the Aging Male**, v. 14, n. 1,

p. 27–32, mar. 2011.

WASSERTHEURER, S. et al. A new oscillometric method for pulse wave analysis: comparison with a common tonometric method. **Journal of human hypertension**, v. 24, n. 8, p. 498–504, ago. 2010.

WEISSBRICH, B. Seroprevalence of parvovirus B19 IgG in children affected by juvenile idiopathic arthritis. **Arthritis research & therapy**, v. 9, n. 4, p. R82, jan. 2007.

YAMASHITA, E. et al. Prevalence of juvenile idiopathic arthritis in children aged 6 to 12 years in Embu das Artes, state of Sao Paulo, Brazil. **Revista brasileira de reumatologia**, v. 53, n. 6, p. 542–5, jan. .

ZANET, D. L. et al. Blood and dried blood spot telomere length measurement by qPCR: assay considerations. **PloS one**, v. 8, n. 2, p. e57787, jan. 2013.

11 – ANEXOS

ANEXO A – Aceitação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da Rigidez Arterial e Comprimento de Telômeros em Pacientes com Artrite Idiopática Juvenil

Pesquisador: MARCUS HERBERT JONES

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 42853615.6.0000.5336

Instituição Proponente: UNIAO BRASILEIRA DE EDUCACAO E ASSISTENCIA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.136.891

Data da Relatoria: 24/07/2015

Apresentação do Projeto:

Projeto para avaliação de rigidez arterial através de oscilometria e comprimento de telômeros na artrite reumatóide juvenil. Retorno por pendências.

Objetivo da Pesquisa:

Confirmar a rigidez arterial e a diminuição dos telômeros como indicativos de envelhecimento genômico e vascular.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Mínimos conforme avaliação anterior.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Importante face avaliação de marcadores de envelhecimento genômico e vascular.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados.

Recomendações:

Pendências e recomendações resolvidas.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pendências e recomendações resolvidas.

Endereço: Av. Ipiranga, 6681, prédio 40, sala 505
Bairro: Partenon CEP: 90.619-900
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3320-3345 Fax: (51)3320-3345 E-mail: cep@pucrs.br

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS



Continuação do Parecer: 1.136.891

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

PORTO ALEGRE, 03 de Julho de 2015

Assinado por:
Rodolfo Herberto Schneider
(Coordenador)

ANEXO B- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DIRIGIDO AO
RESPONSÁVEL

Seu filho/filha está sendo convidado a participar da pesquisa denominada **“avaliação de rigidez arterial e comprimento de telômeros em pacientes com artrite idiopática juvenil”** desenvolvida pelo Serviço de Reumatologia do Hospital São Lucas da PUCRS. Esta pesquisa tem por objetivo investigar a presença de alterações vasculares e genéticas em pacientes com artrite idiopática. Estas alterações podem surgir ao longo da evolução da artrite. Serão convidados a participar deste projeto pacientes a partir dos sete anos de idade que tenham o diagnóstico de artrite idiopática juvenil.

Os procedimentos que serão realizados neste estudo com seu filho/filha, caso você concorde com a participação, são:

- **Coleta de dados demográficos, história médica e histórico do diagnóstico:** Serão coletadas informações do prontuário médico do seu filho/filha no Serviço de Reumatologia do Hospital São Lucas da PUCRS. Estas informações são relativas à história médica e outras informações relevantes que serão importantes ao longo do estudo.
- **Coleta de sangue:** Será coletada uma amostra de sangue do seu filho/filha para avaliação da alteração genética, que ocorrerá no mesmo momento em que ele/ela realizar os exames de rotina para o acompanhamento da doença reumática. Desse modo, não será feita uma nova punção além da já programada. Será obtido 4 ml de sangue para esta análise (aproximadamente 1 colher de sopa).

Iniciais do paciente/representante legal: _____

Iniciais do investigador: _____

- **Avaliação da rigidez arterial:** O exame consiste numa medida de pressão arterial. Seu filho/filha deverá ficar deitado em uma sala tranqüila por um período de dez minutos. Após esse período a medida da pressão arterial deverá ser realizada duas vezes e depois ele será liberado. Nas quatro horas antes do exame, seu filho/filha não poderá ingerir alimentos contendo cafeína (chá preto, café, chocolate, Nescau, coca-cola, guaraná) ou cigarro. Remédios para desobstruir o nariz contendo vasoconstritores ou qualquer medicação com ação vascular. Durante a medida da pressão, seu filho/filha não deverá falar, pois isso pode interferir no resultado do exame. Essa avaliação será feita pela Dr. Maria Mercedes Picarelli, Coordenadora do Ambulatório de Reumatologia Pediátrica do Hospital São Lucas da PUCRS.

Ao participar deste estudo, seu filho/filha corre o risco de se sentir desconfortável em responder algumas perguntas para a pesquisadora sobre a história da sua saúde. Seu filho/filha poderá sentir um desconforto e uma leve dor durante a punção para a coleta de sangue. Porém esta dor é leve e passageira. Seu filho/filha também poderá sentir um desconforto no braço ao ser medida a pressão arterial, porém este desconforto é leve e passageiro.

O benefício da participação do seu filho/filha consiste na possibilidade de avaliar alterações que podem estar associados à artrite. Estes exames não fazem parte da rotina de avaliação dos pacientes com artrite. Além disso, você ajudará a gerar mais conhecimento sobre a presença de alterações vasculares e genéticas associadas à artrite e com isso ajudar a outros pacientes com a mesma condição.

As informações e as amostras coletadas serão guardadas e o nome dos pacientes será mantido em sigilo. Os resultados destes testes poderão ser utilizados em outros estudos

A participação é voluntária. Caso você opte pela não participação do seu filho/filha neste projeto, não haverá nenhum prejuízo. Seu filho/filha seguirá o acompanhamento no Ambulatório de Reumatologia do Hospital São Lucas da PUCRS, sem qualquer modificação.

Iniciais do paciente/representante legal: _____

Iniciais do investigador: _____

Você poderá fazer todas as perguntas que julgar necessárias antes de decidir sobre a participação neste estudo.. O pesquisador responsável por este projeto é o Dr. Marcus Jones. Ele e sua equipe estarão disponíveis nos telefones (51)33203318 para atender você em qualquer momento que for necessário.

Você também pode entrar em contato com o Comitê de ética em Pesquisa do Hospital São Lucas da PUCRS para buscar informações sobre o estudo pelo telefone: (51) 3320-3345. Você também poderá entrar em contato com o Comitê de ética em Pesquisa do Hospital São Lucas da PUCRS, localizado na Avenida Ipiranga, 6690, Prédio 60, sala 314, em Porto Alegre, através do telefone/fax (51): 33203345 (8:00-12:00h e 13:30-17h) ou pelo e-mail: cep@pucrs.br.

Se você concordar com a participação neste estudo, será solicitado que você assine duas vias deste documento. O pesquisador também assinará as duas vias e fornecerá uma via para você.

Você concorda em fornecer as informações de seu filho/filha para uso neste projeto de pesquisa? () sim () não

Você concorda com a coleta de sangue e com a medida da pressão arterial do seu filho/filha para uso neste projeto de pesquisa? () sim () não

PARTICIPANTE

Nome completo: _____

Assinatura: _____ Data: _____

REPRESENTANTE LEGAL

Nome completo: _____

Assinatura: _____ Data: _____

PESQUISADOR

Nome completo: _____

Assinatura: _____ Data: _____

TERMO DE ASSENTIMENTO INFORMADO I

Este formulário de assentimento informado é para crianças e adolescentes entre as idades de 7 a 16 anos de idade que comparecerão ao Ambulatório de Reumatologia Pediátrica do Hospital São Lucas da PUCRS e que estamos convidando a participar da pesquisa: **“avaliação de rigidez arterial e comprimento de telômeros em pacientes com artrite idiopática juvenil”**

Meu nome é Maria Mercedes Picarelli e meu trabalho é pesquisar sobre artrite (juntas que doem). Nós vamos fazer uma medida da pressão do sangue e um exame de sangue que podem estar alterados devido à artrite. Esta pesquisa pode nos ajudar a confirmar isso. Eu vou informar você e convidá-lo/ convidá-la a participar desta pesquisa. Você pode escolher se quer participar ou não. Discutimos esta pesquisa com seus pais e responsáveis e eles sabem que estamos pedindo seu acordo. Se você vai participar desta pesquisa, seus pais ou responsáveis também terão de concordar. Se você não deseja fazer parte desta pesquisa, não é obrigado, até mesmo se seus pais concordarem.

Você pode discutir qualquer coisa deste formulário com seus pais, amigos ou qualquer um com quem você sentir vontade de conversar. Você pode decidir se quer participar ou não depois de ter conversado sobre a pesquisa e não é preciso decidir imediatamente. Pode haver algumas palavras que você não entenda ou coisas que você quer que eu explique mais detalhadamente porque você ficou mais interessado ou preocupado. Por favor, peça a qualquer momento que eu explicarei.

O objetivo desta pesquisa é ver se existem alterações da pressão do sangue e de um tipo de exame de sangue nos pacientes que tem o mesmo tipo de artrite que você. Isso pode ser importante para melhorar o cuidado que os médicos têm ao cuidar de pacientes com artrite de crianças.

Iniciais do paciente/representante legal: _____

Iniciais do investigador: _____

Estamos fazendo estes exames em pacientes que tem artrite a partir dos sete anos de idade e que estejam em acompanhamento no Hospital São Lucas da PUCRS.

Você não precisa participar desta pesquisa se não quiser. É você quem decide. Se decidir não participar da pesquisa, é seu direito e nada mudará no seu tratamento de saúde. Mesmo assim, este Serviço estará disponível para você. Até mesmo se você disser “sim” agora, poderá mudar de idéia depois, sem nenhum problema.

Quando você vier ao Hospital da PUCRS, você fará sua consulta como você está acostumado/acostumada. Nesta consulta, nós faremos perguntas sobre o que você está sentindo e eu irei examiná-lo. Você pode se sentir desconfortável ou entediado. Após, você deverá ficar descansando durante dez minutos numa sala em silêncio. Seu acompanhante deverá ficar todo o tempo ao seu lado. Após este tempo, eu vou medir a pressão do sangue. Isso é feito colocando um manguito (um tipo de borracha) no seu braço e enchendo de ar esse manguito. Durante alguns poucos segundos, você vai sentir seu braço sendo apertado. Durante esse período, você não poderá falar, pois isto muda o resultado da medida da pressão. Logo em seguida, nós esvaziaremos esse manguito. Nós vamos fazer isso mais uma vez e esta terminada esta parte da avaliação.

Nas quatro horas antes desse exame, você não poderá comer chocolate, beber coca-cola, guaraná, café, Nescau, chá preto ou cigarro. Também não pode fazer uso de remédios para desentupir o nariz nas doze horas antes do exame.

Após, você será encaminhado para a sala de coleta de exames de sangue, para coletar os exames do seu tratamento. A coletadora irá tirar um pouco a mais de sangue, menos de uma colher de sopa, que será usado para esta pesquisa. Isso significa que não será necessário fincar o seu braço mais uma vez para fazer este exame. Mas você sentirá uma dor passageira pela fincada da agulha. Você pode me pedir que eu explique a qualquer momento mais informações sobre o que estiver acontecendo.

Iniciais do paciente/representante legal: _____

Iniciais do investigador: _____

Ao participar desta pesquisa, pode ser que seus exames estejam normais e você não veja qualquer benefício em ter participado deste estudo. Mas, se eles vierem alterados, isso poderá modificar algumas coisas do seu tratamento, que poderão ser boas para você no futuro. Além disso, estes exames só podem ser feitos por uma pesquisa, pois eles não estão disponíveis no Hospital, normalmente.

Não falarei para outras pessoas que você está nesta pesquisa e também não dividirei esta informação para qualquer um que não trabalhe na pesquisa. Após este estudo acabar, os resultados serão informados para você e para seus pais. Eu me sentarei com vocês e falaremos sobre o que aprendemos com a pesquisa. Os resultados destes testes poderão ser utilizados em outros estudos.

Você não tem que estar nesta pesquisa. Ninguém estará furioso ou desapontado com você se você disser não, a escolha é sua. Você pode pensar nisto e falar depois se você quiser. Você pode dizer “sim” agora e mudar de idéia depois e tudo continuará bem.

Você poderá entrar em contato comigo a qualquer momento pelo telefone: (51)97070093 ou com o Dr. Marcus Jones, médico responsável por esta pesquisa pelo telefone: (51) 33203318 ou com o Comitê de ética do Hospital São Lucas da PUCRS pelo telefone: (51) 3320-3345. Você também poderá entrar em contato com o Comitê de ética em Pesquisa do Hospital São Lucas da PUCRS, localizado na Avenida Ipiranga, 6690, Prédio 60, sala 314, em Porto Alegre, através do telefone/fax (51): 33203345(8:00-12:00h e 13:30-17h) ou pelo e-mail: cep@pucrs.br.

Eu entendi os riscos e desconfortos da pesquisa: ___ sim___ não.

Eu entendi que a pesquisa é sobre crianças e adolescentes com artrite, uma medida da pressão do sangue e um exame de sangue que podem estar alterados
Eu entendi que virei a minha consulta farei uma medida de pressão e darei uma amostra de sangue através de uma picada no braço.

Assinatura da criança/adolescente: _____

Assinatura dos pais/responsáveis: _____

Ass. Pesquisador: _____

Dia/mês/ano: _____

TERMO DE ASSENTIMENTO INFORMADO II
(para o grupo controle de rigidez arterial)

Este formulário de assentimento informado é para crianças e adolescentes entre as idades de 7 a 16 anos de idade que comparecerão ao Ambulatório de Reumatologia Pediátrica do Hospital São Lucas da PUCRS e que estamos convidando a participar da pesquisa: **“avaliação de rigidez arterial e comprimento de telômeros em pacientes com artrite idiopática juvenil”**

Meu nome é Maria Mercedes Picarelli e meu trabalho é pesquisar sobre artrite (juntas que doem). Nós vamos fazer uma medida da pressão do sangue que pode estar alterados devido à artrite. Esta pesquisa pode nos ajudar a confirmar isso. Eu vou informar você e convidá-lo/ convidá-la a participar desta pesquisa. Você pode escolher se quer participar ou não. Discutimos esta pesquisa com seus pais e responsáveis e eles sabem que estamos pedindo seu acordo. Se você vai participar desta pesquisa, seus pais ou responsáveis também terão de concordar. Se você não deseja fazer parte desta pesquisa, não é obrigado, até mesmo se seus pais concordarem.

Você pode discutir qualquer coisa deste formulário com seus pais, amigos ou qualquer um com quem você se sentir vontade de conversar. Você pode decidir se quer participar ou não depois de ter conversado sobre a pesquisa e não é preciso decidir imediatamente. Pode haver algumas palavras que você não entenda ou coisas que você quer que eu explique mais detalhadamente porque você ficou mais interessado ou preocupado. Por favor, peça a qualquer momento que eu explicarei.

O objetivo desta pesquisa é ver se existem alterações da pressão do sangue em crianças. Isso pode ser importante para melhorar o cuidado que os médicos têm ao cuidar de crianças.

Iniciais do paciente/representante legal: _____

Iniciais do investigador: _____

Estamos fazendo estes exames em pacientes que tem artrite a partir dos sete anos de idade e que estejam em acompanhamento no Hospital São Lucas da PUCRS.

Você não precisa participar desta pesquisa se não quiser. É você quem decide. Se decidir não participar da pesquisa, é seu direito e nada mudará no seu tratamento de saúde. Mesmo assim, este Serviço estará disponível para você. Até mesmo se você disser “sim” agora, poderá mudar de idéia depois, sem nenhum problema.

Quando você vier ao Hospital da PUCRS, você fará sua consulta como você está acostumado/acostumada. Nesta consulta, nós faremos perguntas sobre o que você está sentindo e eu irei examiná-lo. Você pode se sentir desconfortável. Após, você deverá ficar descansando durante dez minutos numa sala em silêncio. Seu acompanhante deverá ficar todo o tempo ao seu lado. Após este tempo, eu vou medir a pressão do sangue. Isso é feito colocando um manguito (um tipo de borracha) no seu braço e enchendo de ar esse manguito. Durante alguns poucos segundos, você vai sentir seu braço sendo apertado. Durante esse período, você não poderá falar, pois isto muda o resultado da medida da pressão. Logo em seguida, nós esvaziaremos esse manguito. Nós vamos fazer isso mais uma vez e esta terminada esta parte da avaliação.

Nas quatro horas antes desse exame, você não poderá comer chocolate, beber coca-cola, guaraná, café, Nescau, chá preto ou cigarro. Também não pode fazer uso de remédios para desentupir o nariz nas doze horas antes do exame.

Você pode me pedir que eu explique a qualquer momento mais informações sobre o que estiver acontecendo.

Ao participar desta pesquisa, pode ser que seus exames estejam normais e você não veja qualquer benefício em ter participado deste estudo. Mas, se eles vierem alterados, isso poderá modificar algumas coisas do seu tratamento, que poderão ser boas para você no futuro. Além disso, estes exames só podem ser feitos por uma pesquisa, pois eles não estão disponíveis no Hospital, normalmente.

Iniciais do paciente/representante legal: _____

Iniciais do investigador: _____

Não falarei para outras pessoas que você está nesta pesquisa e também não dividirei esta informação para qualquer um que não trabalhe na pesquisa. Após este estudo acabar, os resultados serão informados para você e para seus pais. Eu me sentarei com vocês e falaremos sobre o que aprendemos com a pesquisa. Os resultados destes testes poderão ser utilizados em outros estudos.

Você não tem que estar nesta pesquisa. Ninguém estará furioso ou desapontado com você se você disser não, a escolha é sua. Você pode pensar nisto e falar depois se você quiser. Você pode dizer “sim” agora e mudar de idéia depois e tudo continuará bem.

Você poderá entrar em contato comigo a qualquer momento pelo telefone: (51)97070093 ou com o Dr. Marcus Jones, médico responsável por esta pesquisa pelo telefone: (51) 33203318 ou com o Comitê de ética do Hospital São Lucas da PUCRS pelo telefone: (51) 3320-3345. Você também poderá entrar em contato com o Comitê de ética em Pesquisa do Hospital São Lucas da PUCRS, localizado na Avenida Ipiranga, 6690, Prédio 60, sala 314, em Porto Alegre, através do telefone/fax (51): 33203345 (8:00-12:00h e 13:30-17h) ou pelo e-mail: cep@pucrs.br.

Eu entendi os riscos e desconfortos da pesquisa:

_____ sim_____ não.

Eu entendi que a pesquisa é sobre crianças e adolescentes com artrite, uma medida da pressão do sangue que pode estar alterado. Eu entendi que virei a minha consulta farei uma medida de pressão.

Assinatura da criança/adolescente: _____

Assinatura dos pais/responsáveis: _____

Ass. Pesquisador: _____

Dia/mês/ano: _____

ANEXO D - FICHA DE AVALIAÇÃO CLÍNICA

QUESTIONÁRIO

PESO: _____

ALTURA: _____

IMC: _____

NOME: _____

DATA DE NASCIMENTO: _____ IDADE: _____

TEMPO DE GESTAÇÃO (EM SEMANAS): _____

DATA DO DIAGNÓSTICO: _____

SUBTIPO DE AIJ: _____

TRATAMENTOS EM USO ATUAL: _____

TRATAMENTOS PRÉVIOS: _____

TA: _____

VSG: _____

PCR: _____

CONTAGEM ARTICULAR: PRESENÇA DE ARTRITE ATIVA

--

VAS:



JADAS: $1 + 2 + 3 + 4 =$ _____

1. - CERVICAL _____

- COTOVELO D _____ E _____

- PUNHO D _____ E _____

- MCF 1° _____ 2° _____ 3° _____

- IFP 1° _____ 2° _____ 3° _____

- COXO-FEMORAL D _____ E _____

- JOELHO D _____ E _____

- TORNOZELO D _____ E _____

2. VAS DO MÉDICO _____

3. VAS DO PACIENTE / PAIS _____

4. VSG _____ VSG – 20 / 10

(< 20 → 0 / > 120 → 120)

PCR _____ PCR – 10 / 10

(< 10 → 0 / > 110 → 10)