

RENATO BUSSADORI TOMIOKA

**Análise metabólica em mulheres jovens com artrite
idiopática juvenil**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade
de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências
Programa de Ciências do Sistema Musculoesquelético
Orientador: Prof. Dr. Clovis Artur Almeida da Silva

(Versão corrigida. Resolução CoPGr nº 6018, de 13 de outubro de 2011. A
versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo

2023

RENATO BUSSADORI TOMIOKA

**Análise metabolômica em mulheres jovens com artrite
idiopática juvenil**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade
de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências
Programa de Ciências do Sistema Musculoesquelético
Orientador: Prof. Dr. Clovis Artur Almeida da Silva

(Versão corrigida. Resolução CoPGr nº 6018, de 13 de outubro de 2011. A
versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo
2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Tomiooka, Renato Bussadori
Análise metabolômica em mulheres jovens com
artrite idiopática juvenil / Renato Bussadori
Tomiooka. -- São Paulo, 2023.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências do Sistema
Musculoesquelético.
Orientador: Clovis Artur Almeida da Silva.

Descritores: 1.Artrite idiopática juvenil
2.Metabolômica 3.Biomarcadores 4.Metotrexato
5.Subtipos de artrite idiopática juvenil

USP/FM/DBD-254/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Vera e Eduardo, por todo o amor, oportunidades e princípios.

Aos meus irmãos, Alexandre e Lury, minhas fontes de inspiração.

Ao meu filho, Filippo, minha energia vital.

E à minha esposa, Verusca, minha luz, que me apoia e me ensina até nos dias mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

Ao meu grande mentor, Prof. Dr. Clóvis Silva, por me incentivar e ensinar. Um médico pesquisador brilhante que ilumina a Ciência brasileira, capaz de colocar uma energia incrível no pensamento científico de cada aluno. O Sr. transformou a minha forma de pensar e escrever. Obrigado por toda sua paciência e confiança.

Ao Prof. Dr. Ismael Silva, pesquisador e cientista visionário, com quem tive a honra de passar horas e horas aprendendo muito sobre metabolômica.

Ao Prof. Dr. Edmund Baracat, meu professor durante toda a graduação, residência e preceptoria, momento em que sempre me apoiou e ensinou, dentro e fora da sala de aula. Professor e líder exemplar, sou muito grato pelo seu respeito e dedicação à Faculdade e Hospital das Clínicas.

Ao meu amigo-irmão e sócio, Lucas Yamakami, por ser um catalisador desse sonho. Pragmático e didático. Transparente e inteligente. Só tenho a agradecer por nossos caminhos terem se cruzado num momento tão especial nas nossas vidas, inclusive na idealização deste projeto de pesquisa.

Aos meus sócios e grandes amigos da VidaBemVinda, Conrado Alvarenga, Oscar Duarte, Lais Yassuda Yamakami, Cynthia van Tol, Larissa Matsumoto, Eduardo Miyadahira e Vanessa Heinrich, com quem continuo aprendendo e que sempre me inspiraram com muito conhecimento e energia profissional.

À Gabriela Viola, colega de pesquisa: sem a sua experiência e ajuda, essa tese estaria no campo onírico.

À Profa. Dra. Nadia Aikawa, que sempre trouxe sugestões profícuas e inteligentes, lapidando o trabalho.

Ao meu amigo Prof. Dr. Gustavo Maciel, por sugestões que levaram à confecção deste projeto voltado à metabolômica. Suas ideias inovadoras deram vida a uma linha de pesquisa inédita.

À Profa. Dra. Eloísa Bonfá, pela sua contribuição, objetividade e confiança depositada em todos os momentos.

Às minhas colegas àquela época do Centro de Reprodução Humana do HC-FMUSP: Regina (“Rê”, que tanto me ajudou no dia a dia da pesquisa), Rosângela, Fran, Eunice, Dayane, Josi e toda equipe. Muito obrigado por todo o suporte que me deram.

À toda equipe do LIM-17 que tanto nos ajudou no adequado manuseio e armazenamento das amostras, sempre com muita cordialidade e atenção.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, por ter viabilizado este projeto com recursos financeiros.

E, em especial, a todas as pacientes que participaram desta pesquisa, com toda paciência, carinho e generosidade. Muitas vinham de longe, gastavam o dia todo para serem atendidas por nós, inúmeras vezes. Obrigado por contribuírem tanto com a Ciência.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, MariaJulia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo. Divisão de Biblioteca e Documentação: 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas e Siglas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	6
4. RESULTADOS.....	12
5. DISCUSSÃO.....	24
6. CONCLUSÕES.....	29
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{M/L}$ =	Quantificação absoluta
21CFR=	Code of Federal Regulations
a=	Acil
aa=	Diacil
Aas=	Aminoácidos
ADMA=	Dimetilarginina assimétrica
ae=	Acil-alquil
AICAR=	Aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleotídeo
AIJ=	Artrite idiopática juvenil
ANOVA=	Análise de variância
AR=	Artrite reumatoide
BAs=	Aminas biogênicas
C0=	Carnitina livre
C10=	Decanoilcarnitina
C14:1=	Tetradecenoilcarnitina
C5:1=	Tigililcarnitina
C8=	Octanoilcarnitina
Cnt=	Controles saudáveis
DAS 28=	Disease Activity Score 28-Joint Counts
DMA=	Arginina dimetilada total
DMARD=	Medicamento antirreumático modificador da doença
e=	Alquil
EDTA=	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ESI=	Ionização por eletrospray
ESI-MS/MS=	Espectrometria de massas com ionização por eletrospray
FAO=	β -oxidação de ácidos graxos

FDR=	Taxa de falsa descoberta
HCFMUSP=	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Hex=	Hexoses
ILAR=	League of Associations for Rheumatology
IMC=	Índice de massa corporal
JADAS-71=	Juvenile Arthritis Disease Activity Score
kg/m ² =	Peso em quilogramas, dividido pela altura ao quadrado
LPCs=	Liso-fosfatidilcolinas
MS/MS=	Espectometria de massas tandem
MSEA=	Análise de enriquecimento do conjunto de metabólitos
MTX=	Metotrexato
NOS=	Óxido nítrico sintase
PC aa=	Fosfatidilcolinas diacil
PC ae C36:1=	Acil-alquil C36:1
PC ae C38:0=	Acil-alquil C38:0
PC ae=	Acil-alquil
PCR=	Proteína C reativa
PCs=	Fosfatidilcolinas
RF=	Fator reumatoide
SD=	Média ± desvio padrão
SMs=	Esfingomielinas
VAS=	Escala visual analógica
VHS=	Velocidade de hemossedimentação

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Análise de enriquecimento funcional quantitativo após o upload dos metabólitos quantitativos de pacientes com artrite idiopática juvenil (AIJ) para a análise de enriquecimento do conjunto metabólico com as 50 principais condições com fenótipos bioquímicos semelhantes aos da AIJ. A intensidade da cor (branca à vermelha) indica significância estatística crescente.....	15
Figura 2-	Comparação dos níveis de C0 (eixo Y) em pacientes com AIJ sem e com uso atual de MTX (eixo X). FDR (análise de correlação de Pearson).....	17
Figura 3-	Comparação dos níveis molares de tiglicarnitina (C5:1) (eixo Y) em pacientes com AIJ com e sem uso atual de MTX (eixo X). FDR (análise de correlação de Pearson).....	18
Figura 4-	Comparação dos níveis molares de octanoilcarnitina (C8) (eixo Y) em pacientes com AIJ com e sem uso atual de MTX (eixo X). FDR (análise de correlação de Pearson).....	18
Figura 5-	Comparação dos níveis molares de decanoilcarnitina (C10) (eixo Y) em pacientes com AIJ com e sem uso atual de MTX (eixo X). FDR (análise de correlação de Pearson).....	19
Figura 6-	Comparação dos níveis molares de tetradecenoilcarnitina (C14:1) (eixo Y) em pacientes com AIJ com e sem uso atual de MTX (eixo X). FDR (análise de correlação de Pearson).....	19
Figura 7-	Análise de correlação do tipo “r” de Pearson ilustra metabólitos positivamente (rosa) e negativamente (azul)	

correlacionados com os fenótipos envolvendo AIJ sem MTX, AIJ com MTX e controles saudáveis. Correlações positivas com concentrações elevadas de lipídios estruturais, como PC aa e PC ae (setas vermelhas), foram observadas em controles em comparação com AIJ com e sem uso atual de MTX.....	21
Figura 8- Fosfatidilcolina com soma de resíduo de PC ae C36:1 e Fosfatidilcolina com soma de resíduo de PC ae C38:0 níveis molares (eixo Y) na AIJ pacientes com e sem uso atual de MTX e Cnt (eixo X). FDR; AIJ sem MTX - AIJ sem uso atual de MTX; AIJ com MTX - AIJ com uso atual de MTX (ANOVA).....	22
Figura 9- Níveis molares de ADMA e DMA (eixo Y) em pacientes com AIJ com e sem uso atual de MTX e Cnt (eixo X) . FDR; AIJ sem MTX - AIJ sem uso atual de MTX; AIJ com MTX - AIJ com uso atual de MTX (ANOVA).....	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Parâmetros clínicos, laboratoriais e tratamentos concomitantes em pacientes com AIJ com e sem uso atual de MTX.....	13
-----------	---	----

RESUMO

Tomioka RB. Análise metabolômica em mulheres jovens com artrite idiopática juvenil [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar os metabólitos bioquímicos quantitativos nas amostras de sangue periférico de pacientes com artrite idiopática juvenil (AIJ) e indivíduos controle saudáveis. Neste estudo transversal foram incluídas 33 mulheres pós-púberes com AIJ (21 delas em tratamento com metotrexato-MTX e 12 sem tratamento) e 28 controles saudáveis e com idade compatível. As análises de metabolômica foram realizadas pela espectrometria de massas Tandem com ionização por eletrospray (ESI-MS) com o intuito de identificar possíveis alterações nas vias bioquímicas no soro de pacientes com AIJ. O uso contínuo de MTX foi associado a um aumento nas concentrações de carnitina livre em todas as pacientes com os diferentes subtipos de AIJ [21,74(12,7-35,2) vs. 27,49(14,5-41,3) $\mu\text{M/L}$, $p=0,02$], sugerindo uma melhora no metabolismo mitocondrial e na função da absorção intestinal. No entanto, foi constatada uma diminuição do metabolismo mitocondrial nos subtipos de AIJ poliarticular e sistêmica, com diminuição na concentração de diversas acilcarnitinas ($p<0,05$). Em conclusão, este estudo foi capaz de identificar padrões de assinaturas metabólicas diferentes nas pacientes com AIJ em tratamento com MTX. Nossos resultados indicam, ainda, que o uso do MTX está associado com maior eficiência na função mitocondrial.

Descritores: Artrite idiopática juvenil. Metabolômica. Biomarcadores. Metotrexato. Subtipos de artrite idiopática juvenil.

ABSTRACT

Tomioka RB. *Metabolomics in juvenile idiopathic arthritis: a distinct profile in patients under methotrexate* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2023.

The objective of the present study was to evaluate biochemical quantitative metabolites in peripheral blood serum samples of juvenile idiopathic arthritis (JIA) patients and healthy controls. A cross-sectional study included 33 post-pubertal JIA (21 without and 12 with methotrexate-MTX) women and 28 age-matched healthy controls. Metabolomic analyses based on targeted electrospray ionization tandem mass spectrometry was used to identify possible biochemical pathway modifications in serum from JIA patients. The mean current age ($p=0.065$) was similar in JIA patients and healthy controls. Current MTX use in all subtypes of JIA patients was associated with an increase in concentrations of free carnitine [21.74(12.7-35.2) vs. 27.49(14.5-41.3) $\mu\text{M/L}$, $p=0.02$], suggesting an enhanced mitochondrial metabolism and intestinal absorptive function. In contrast, a decreased mitochondrial metabolism was observed in polyarticular and systemic JIA subtypes, with a decrease of several acylcarnitines' concentrations($p<0.05$). In conclusion, the present study identified a distinctive pattern of serum metabolic signatures in JIA patients under MTX therapy. Our findings indicate that MTX use is associated with amore efficient mitochondrial function.

Descriptors: Juvenile idiopathic arthritis. Metabolomics. Biomarkers. Methotrexate. Juvenile idiopathic arthritis subtypes.

1. INTRODUÇÃO

A artrite idiopática juvenil (AIJ) inclui um grupo de artrites crônicas que afeta indivíduos menores de 16 anos^{1,2}. AIJ engloba sete diferentes subtipos de artrite crônica, classificados pela International League of Associations for Rheumatology (ILAR) como: artrite sistêmica, poliartrite fator reumatoide (RF) positivo, poliartrite RF negativo, oligoartrite (persistente ou estendida), artrite relacionada com entesite, artrite psoriática e artrite indiferenciada³. Esta rara condição se apresenta com vários fenótipos clínicos e laboratoriais, incluindo a presença de potenciais biomarcadores^{2,4,5}. Os biomarcadores são um componente importante dentro da medicina personalizada, possuindo utilidade diagnóstica, prognóstica e terapêutica⁶. Os biomarcadores séricos têm mostrado potencial de identificar diferentes fenótipos clínicos, atividade e grau de doenças, e de prever tratamentos para pacientes com AIJ^{7,8}.

Neste contexto, estudos de proteômica têm identificado um aumento sérico da metaloproteinase-3 da matriz em pacientes com AIJ, sugerindo que este é um biomarcador da atividade da doença⁹⁻¹¹. As proteínas 8/14, relacionada ao mieloide, e a S100A12, derivada de neutrófilo, também foram reportadas como biomarcadores da doença, com potencial de prever qual subgrupo de pacientes seria beneficiado pelo tratamento com metotrexato (MTX)^{12,13}.

Apesar de existirem evidências de que adultos com artrites e doenças reumatológicas sofrem de uma disfunção metabólica, não existem muitos estudos sobre análises de metabolômica¹⁴. De fato, esta técnica foi capaz de detectar mudanças nas concentrações de pequenos metabólitos endógenos em amostras biológicas de pacientes adultos com artrite reumatoide (AR)¹⁵, e a importância de eventos metabólicos relacionados à glicólise e ao metabolismo de aminoácidos relacionados com a resposta ao tratamento com MTX¹⁶.

No entanto, o conhecimento sobre análise de metabolômica se limita a um relato de caso de um paciente com AIJ¹⁷ e outro estudo em que a análise foi limitada à quantificação de grupos de lipoproteínas em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico juvenil¹⁸. O uso da espectrometria de massas não direcionada em um estudo¹⁹ dificulta a comparação de metabólitos quantitativos bioquímicos em pacientes em uso ou não de MTX.

2. OBJETIVOS

- Avaliar os metabólitos bioquímicos quantitativos em amostras séricas de pacientes com AIJ e controles saudáveis;
- Investigar condições que apresentam fenótipos bioquímicos semelhantes com AIJ através da análise dos resultados quantitativos dos metabólitos;
- Comparar o perfil metabolômico de pacientes com AIJ com e sem uso atual de metotrexato.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética do Hospital das Clínicas, HCFMUSP, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. Todos os participantes ou seus responsáveis legais forneceram um consentimento informado por escrito. Número CAAE: 33275214.8.0000.0068

Configuração caso-controle

A seleção dos pacientes incluiu 34 mulheres pós-púberes com AIJ com idades entre 15 e 38 anos. Todas as pacientes preencheram o critério da ILAR para a doença de AIJ³ e foram monitoradas na Divisão de Reumatologia ou na Unidade de Reumatologia pediátrica do nosso centro terceirizado. Uma das pacientes foi excluída do trabalho por degradação da amostra coletada. Por isso, o grupo de estudo foi composto por 33 pacientes com AIJ. O grupo controle incluiu um total de 28 mulheres pós-púberes saudáveis com 15 a 35 anos de idade.

As amostras de sangue de pacientes com AIJ ou controles foram coletadas no começo do ciclo menstrual (fase folicular) em tubos de coleta contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Após a centrifugação das amostras a 1000 x g por 10 min e a transferência para um novo tubo, as amostras de soro foram armazenadas a -80°C até o momento da análise.

Avaliação demográfica, clínica, laboratorial e terapêutica

A idade, índice de massa corporal (IMC) e tabagismo foram sistematicamente analisados. O IMC foi calculado como o peso, em quilogramas, dividido pela altura, em metros, ao quadrado (kg/m²). Com intuito de determinar a atividade da doença nas pacientes com AIJ, os seguintes parâmetros foram analisados:

(1) o número de articulações ativas e afetadas, determinado pela presença de edema articular ou presença de pelo menos duas das seguintes situações: dor articular à movimentação, sensibilidade articular ou limitação articular, e (2) avaliação global da atividade da artrite pelo paciente e pelo médico usando uma escala visual analógica (EVA) horizontal de 10 cm, em que 0 indicava nenhuma atividade e, 10, atividade máxima. Os níveis de proteína C reativa (PCR) foram medidos por nefelometria e a velocidade de hemossedimentação (VHS) foi medida pelo método de Westergren.

Para determinar a atividade da doença, foi utilizada a pontuação de 0 a 101 medida pela Juvenile Arthritis Disease Activity Score (JADAS-71) em pacientes com até 18 anos de idade²⁰ e a Disease Activity Score 28-Joint Counts (DAS 28) para aquelas maiores que 18 anos²¹.

A utilização do MTX ou outra droga antirreumática ou modificadora da doença (DMARDs: leflunomida, sulfasalazina e hidroxicloroquina), glucocorticoides e agentes biológicos (etanercepte, adalimumabe, golimumabe, certolizumabe pegol, abatacepte e tocilizumabe) foram levados em consideração.

Perfil metabólico

As amostras de soro armazenadas a -80°C foram mantidas em gelo seco durante o transporte até o local da análise. A quantificação absoluta ($\mu\text{M/L}$) de metabólitos no sangue periférico foi realizada mediante identificação e quantificação de 186 metabólitos utilizando a ionização por “eletrospray” (ESI) acoplada à espectrometria de massas em tandem (MS/MS). As análises foram realizadas no equipamento SCIEX 5500 QTRAP (SCIEX, Darmstadt, Germany), desconsiderando qualquer informação fenotípica.

Para isso, foi utilizada a plataforma da BIOCRATES Life Sciences AG, Innsbruck, Áustria (<https://biocrates.com/>) de forma centralizada e independente.

A patente US 2007/0004044 (disponível online em www.freepatentsonline.com/20070004044.html) apresenta uma descrição detalhada da abordagem experimental utilizada para as análises de metabolômica. Brevemente, um esquema de perfil direcionado foi utilizado para examinar quantitativamente os metabólitos anotados a partir de várias técnicas como o monitoramento de reações múltiplas, perda neutra e detecção de íons precursores. O pacote de software MetIQ (BIOCRATES Life Sciences AG, Innsbruck, Áustria) foi utilizado tanto para a quantificação da concentração de metabólitos quanto para a verificação de controle de qualidade, seguindo as recomendações do 21CFR (“Code of Federal Regulations” ou Código de Regulamentações Federais) Parte 11, que garante a reprodutibilidade das análises dentro de limites de erro aceitáveis. Em seguida, foi gerado um arquivo do Excel (.xls) contendo a identificação das amostras junto com os nomes e concentrações de 186 metabólitos apresentados em $\mu\text{M/L}$ de soro (<https://biocrates.com/>).

O presente estudo utilizou uma abordagem direcionada que incluiu quatro áreas metabólicas principais: aminoácidos (e aminas biogênicas), glicose, ácidos graxos (acilcarnitinas) e metabolismo lipídico (glicerofosfolipídios e esfingolipídios). Um total de 186 metabólitos anotados foram quantificados utilizando o kit AbsoluteIDQ[®] p180 (BIOCRATES Life Sciences AG, Innsbruck, Áustria): 21 aminoácidos (Aas); 19 aminas biogênicas (BAs); 40 acilcarnitinas (ACs); 1 soma de hexoses (Hex), que são principalmente representadas por glicose (até 95%); 76 fosfatidilcolinas (PCs); 14 liso-fosfatidilcolinas (LPCs) e 15 esfingomielinas (SMs).

Os glicerofosfolipídios foram diferenciados com base no tipo de ligação presente na porção do glicerol, especificamente éster (a) ou éter (e). Para a anotação, duas letras foram utilizadas para indicar que duas posições do glicerol estavam ligadas a um resíduo de ácido graxo (aa = diacil, ae = acil-alquil), enquanto que uma única letra indica a presença de somente um resíduo de ácido graxo (a = acil ou e = alquil) (<https://biocrates.com/>). Assim, as análises bioquímicas forneceram resultados referentes a ao menos 5 classes de metabólitos com suas estruturas, funções e concentrações sanguíneas, previamente estabelecidas para indivíduos saudáveis, o que é amplamente e rotineiramente utilizado em laboratórios clínicos ao redor do mundo, como uma ferramenta consolidada para o diagnóstico de erros inatos do metabolismo²².

Análise de enriquecimento do conjunto de metabólitos (MSEA)

Os dados obtidos a partir das análises quantitativas direcionadas de espectrometria de massas com ionização por “eletrospray” (ESI-MS/MS) foram carregados para o MSEA, uma ferramenta não supervisionada disponível em www.metaboanalyst.ca, que auxilia na identificação das alterações bioquímicas observadas em pacientes com AIJ.

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Statistical Package for the Social Sciences, versão 24.0 para Windows. Os resultados das variáveis contínuas são apresentados como mediana (com valores mínimos e máximos) ou como média $\pm$ desvio padrão (SD), enquanto as variáveis categóricas são apresentadas como frequência (porcentagem). Para avaliar a homogeneidade

das variâncias, foi utilizado o teste de Levene. Valores com distribuição normal foram comparados a partir do Teste t de Student, enquanto que os que apresentaram distribuição não-normal foram analisados pelo teste de Mann-Whitney. Diferenças nas variáveis categóricas foram calculadas utilizando o teste exato de Fisher ou o teste Chi-quadrado de Pearson, onde apropriado.

Para a análise dos dados de metabolômica, foi realizada transformação log para normalizar as distribuições das concentrações dos metabólitos quantificados. Estes dados transformados foram então carregados no site de análise de dados metabolômicos do software MetaboAnalyst 5.0 (www.metaboanalyst.ca)²³. A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para comparar as variáveis entre os três grupos, seguida pela análise post hoc com o teste de comparação múltipla de Dunn para identificar diferenças específicas entre os grupos. A análise “ r ” de Pearson foi realizada para verificar a extensão da correlação linear entre variáveis quantitativas. O nível de significância para todas as análises foi definido em 5%.

4. RESULTADOS

Avaliação demográfica, clínica, laboratorial e terapêutica

A idade média dos indivíduos com AIJ e do grupo controle foi similar ($23,15 \pm 6,34$ vs. $26,14 \pm 6,03$ anos, $p=0,065$). Também não foi constatada diferença no IMC ($23,04 \pm 3,18$ vs. $23,26 \pm 3,27$ kg/m², $p=0,797$) e frequência de tabagismo (12% vs. 3%, $p=0,363$) entre os grupos (Tabela 1).

Tabela 1 - Parâmetros clínicos, laboratoriais e tratamentos concomitantes em pacientes com AIJ com e sem uso atual de MTX

Variáveis	Com MTX (n=12)	sem MTX (n=21)	p
Parâmetros clínicos e laboratoriais			
Número de articulações ativas	0,5 (0-10)	0,5 (0-10)	0,868
Número de articulações limitadas	4 (0-32)	6 (0-43)	0,427
EVA global do paciente (0-10)	3 (1-9)	1 (0-6)	0,027
EVA global do medico (0-10)	1 (0-2)	1 (0-5)	0,449
VHS, mm/1h	$11,25 \pm 7,67$	$11,67 \pm 9,42$	0,897
PCR, mg/L	$4,17 \pm 4,98$	$6,76 \pm 16,51$	0,602
JADAS-71	$5,00 \pm 0,00$	$1,57 \pm 2,63$	0,123
DAS-28	$2,40 \pm 1,17$	$2,36 \pm 1,00$	0,924
Tratamento atual			
Prednisona	2 (16,7)	4 (19)	1,000
Leflunomida	2 (16,7)	7 (33,3)	0,429
Hidrocloroquina	1 (8,3)	0 (0)	0,364
Agente biológico	7 (58,3)	12 (57,1)	1,000
Tipo de agentes biológicos			
Etanercept	4 (33,3)	4 (19%)	0,420
Adalimumabe	1 (8,3)	1 (4,8)	1,000
Golimumabe	1 (8,3)	0 (0)	0,364
Certolizumab pegol	0 (0)	1 (4,8)	1,000
Abatacept	0 (0)	2 (9,5)	0,523
Tocilizumabe	1 (8,3)	4 (19)	0,630

Valores expressos em n (%), mediana (valores mínimo e máximo) ou média $\pm$ desvio padrão; EVA - escala visual analógica; VHS - velocidade de hemossedimentação; PCR - proteína C reativa; JADAS-71 - Juvenile Arthritis Disease Activity Score; DAS-28 - Disease Activity Score 28-Joint Counts

De acordo com os subtipos, a AIJ poliarticular ocorreu em 21/33 (63,7%) dos pacientes, a sistêmica em 7/33 (21,2%), a oligoarticular em 4/33 (12,1%) e a artrite relacionada com entesite em 1/33 (3%) dos pacientes.

Os parâmetros clínicos e laboratoriais associados aos tratamentos com ou sem MTX dos pacientes com AIJ estão descritos na Tabela 1. O EVA geral dos pacientes com AIJ em terapia com MTX foi significativamente maior do que o observado nos pacientes que não receberam o tratamento [3 (1-9) vs. 1 (0-6), $p=0,027$]. Os parâmetros clínicos e laboratoriais da doença, como articulações ativas ou limitadas, e valores de EVA, VHS, PCR, JADAS-71 e DAS-28 foram similares entre os grupos ($p>0,05$). Também não foi observada diferença significativa entre os grupos AIJ sem e com MTX em relação ao uso de prednisona, leflunomida, hidroxiclороquina e agentes biológicos ($p>0,05$) (Tabela 1).

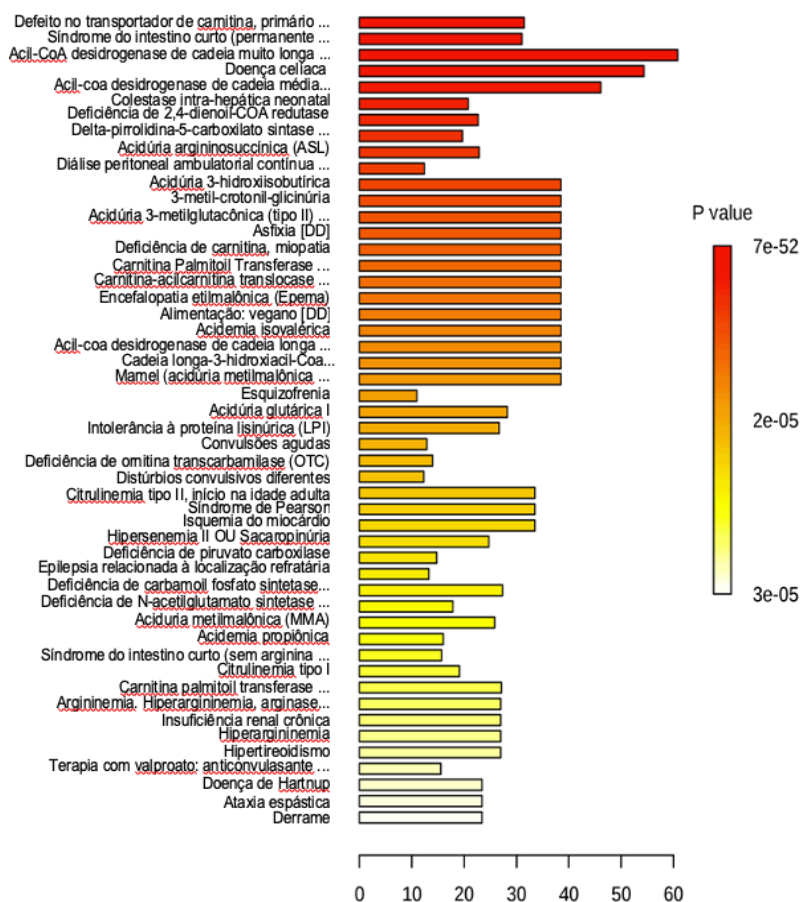
Condições que apresentaram fenótipos bioquímicos semelhantes à AIJ

Os resultados quantitativos dos metabólitos foram inseridos em um software de bioinformática específico para análise metabolômica disponível pela Universidade de Alberta (Canadá) em www.metaboanalyst.ca. O estudo foi iniciado utilizando a ferramenta de enriquecimento funcional quantitativo (MSEA) em que, de forma não supervisionada, os resultados bioquímicos obtidos foram comparados com um banco de dados metabolômico que possui informações bioquímicas sobre centenas de condições metabólicas humanas.

Em caso detecção de similaridades com alguma disfunção, os resultados foram organizados em ordem decrescente de significância estatística na Figura 1. Assim, o enriquecimento funcional apresentado em vermelho indica as diferenças que foram mais associadas aos valores gerados pela espectrometria de massas quantitativa realizada em amostras de pacientes com AIJ. Os resultados mais significativos, considerando um corte altamente exigente de $10e-52$, revelaram cinco

condições com altas chances de estarem envolvidas em vias metabólicas, que no presente estudo parecem se sobrepôr em sua origem. As cinco condições que apresentaram fenótipos bioquímicos semelhantes à AIJ foram: defeitos no transporte de carnitina, síndrome do intestino curto, deficiências em acil-CoA desidrogenases de cadeia muito longa, doença celíaca e deficiências em acil-CoA desidrogenases de cadeia média.

Análise de enriquecimento do conjunto de metabólitos (50 principais)



Enriquecimento funcional

Conjunto de metabólitos	P	Holm p	FDR
Defeito no transportador de carnitina	7,72e-54	7,18E-52	7.18e-52
Deficiência sistêmica primária de carnitina			

Figura 1 - Análise de enriquecimento funcional quantitativo após o upload dos metabólitos quantitativos de pacientes com artrite idiopática juvenil (AIJ) para a análise de enriquecimento do conjunto metabólico com as 50 principais condições com fenótipos bioquímicos semelhantes aos da AIJ. A intensidade da cor (branca à vermelha) indica significância estatística crescente

O uso atual de MTX em pacientes com AIJ está associado a um aumento das concentrações de carnitina livre, sugerindo uma melhora do metabolismo mitocondrial e da função absorptiva intestinal.

Os valores de carnitina livre (C0) detectados em pacientes com AIJ tratadas ou não com MTX são mostrados na Figura 2. Pacientes com AIJ sem tratamento com MTX obtiveram menores níveis de C0 quando comparados com as pacientes com AIJ em uso de MTX [21,74 $\mu\text{M/L}$ (12,7-35,2) vs. 27,49 $\mu\text{M/L}$ (14,5-41,3), $p=0,02$]. É importante mencionar que os níveis de C0 descritos na população saudável são de 25 a 50 $\mu\text{M/L}$ ²⁴. Os defeitos no transporte da carnitina são desvios bioquímicos com causas primárias (mutações hereditárias nos transportadores intestinais, como erros inatos do metabolismo) ou secundárias, particularmente relacionados a deficiências de absorção intestinal de outras origens, como a síndrome do intestino curto e a doença celíaca²⁵⁻²⁷. As disfunções nas desidrogenases mitocondriais fazem parte de um distúrbio secundário por baixas concentrações de C0, levando à baixa formação de acilcarnitinas com consequente diminuição da função mitocondrial em pacientes com AIJ sem MTX.

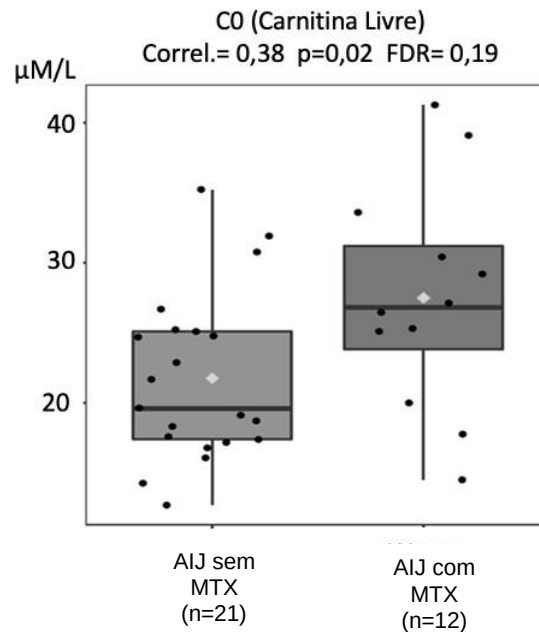


Figura 2- Comparação dos níveis de C0 (eixo Y) em pacientes com AIJ sem e com uso atual de MTX (eixo X). FDR (análise de correlação de Pearson)

A utilização atual de MTX nas pacientes com AIJ está associada a um aumento nas concentrações de acilcarnitinas.

Sabe-se que pacientes com deficiência na absorção de carnitina livre possuem quantidades menores de acilcarnitinas^{27,28}. Devido às alterações bioquímicas encontradas nas deficiências de carnitina, é sabido que essas alterações metabólicas levam a uma diminuição do perfil sanguíneo de todas as acilcarnitinas, sejam elas transportadoras de ácidos graxos de cadeia pequena, média ou grande. As análises das acilcarnitinas que foram realizadas nos três grupos estão representadas nas Figuras 3, 4, 5 e 6.

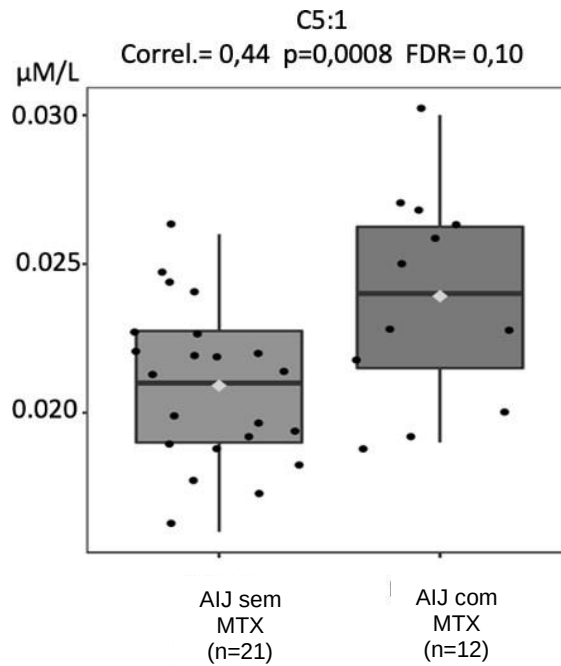


Figura 3- Comparação dos níveis molares de tigliccarnitina (C5:1) (eixo Y) em pacientes com AIJ com e sem uso atual de MTX (eixo X). FDR (análise de correlação de Pearson)

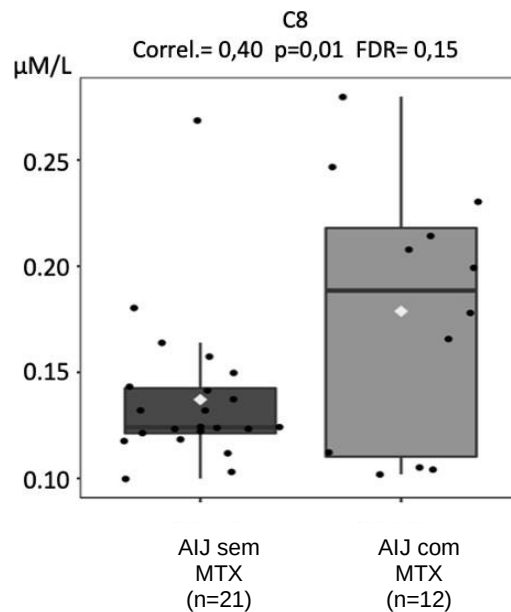


Figura 4- Comparação dos níveis molares de octanoilcarnitina (C8) (eixo Y) em pacientes com AIJ com e sem uso atual de MTX (eixo X). FDR (análise de correlação de Pearson)

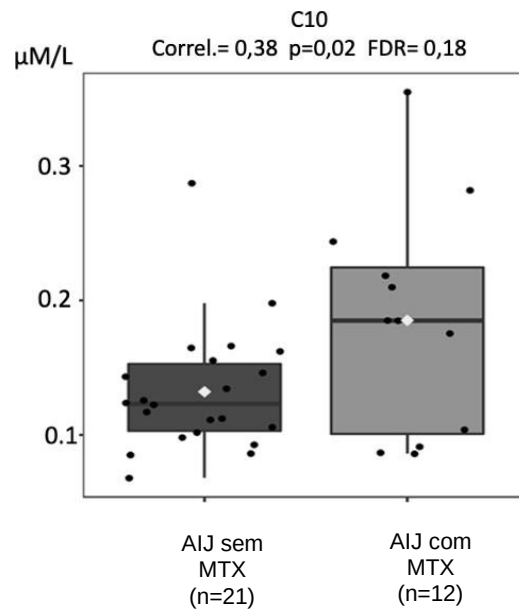


Figura 5- Comparação dos níveis molares de decanoilcarnitina (C10) (eixo Y) em pacientes com AIJ com e sem uso atual de MTX (eixo X). FDR (análise de correlação de Pearson)

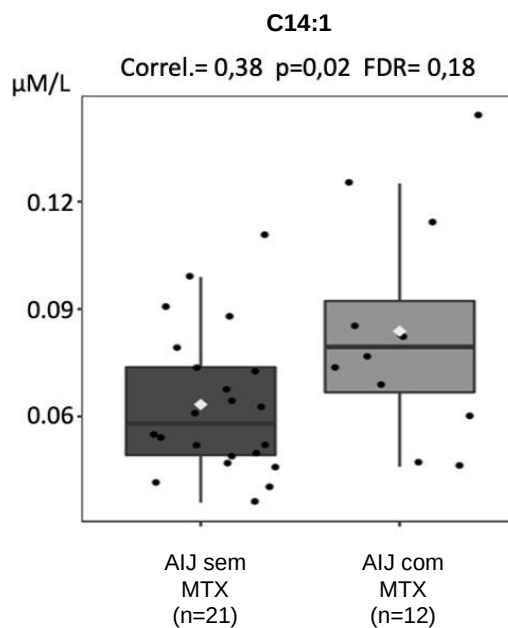


Figura 6- Comparação dos níveis molares de tetradecenoilcarnitina (C14:1) (eixo Y) em pacientes com AIJ com e sem uso atual de MTX (eixo X). FDR (análise de correlação de Pearson)

Os níveis das diferentes acilcarnitinas foram menores nos pacientes com AIJ que não utilizaram MTX quando comparados àqueles em terapia com MTX. Entre estas acilcarnitinas, se encontraram o tiglilcarnitina (C5:1; $p=0,008$), octanoilcarnitina (C8; $p=0,01$), decanoilcarnitina (C10; $p=0,02$), tetradecenoilcarnitina (C14:1, $p=0,02$), isto é, acilcarnitinas curtas, médias a longas (Figuras 3, 4, 5 e 6).

Pacientes com AIJ apresentaram disfunções bioquímicas, indicando distúrbio no metabolismo de lipídios estruturais, dimetilarginina assimétrica e arginina desmetilada.

A possível associação entre a disfunção absorptiva e baixos níveis lipídicos foi estudada. Na Figura 7, a análise de correlação “r” de Pearson indicou metabólitos positivamente (rosa) e negativamente (azul) correlacionados com os fenótipos dos três grupos: AIJ sem MTX, AIJ com MTX e controles saudáveis. Lipídios estruturais como fosfatidilcolinas diacil (PC aa) e acil-alquil (PC ae) (setas vermelhas) foram positivamente correlacionados, mostrando maiores níveis no grupo AIJ com MTX comparado aos grupos controle.

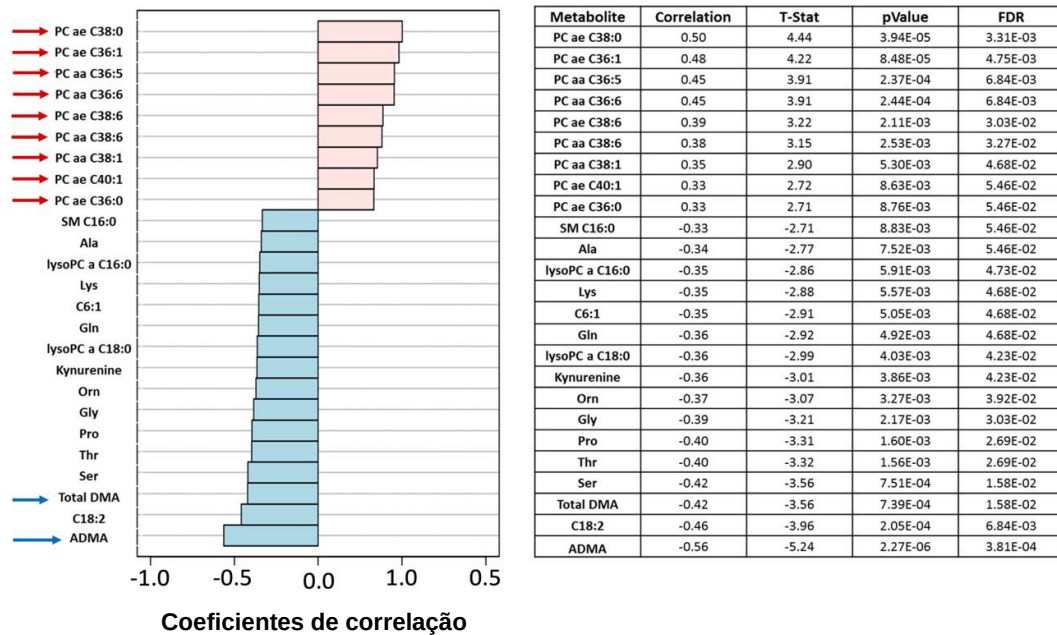


Figura 7- Análise de correlação do tipo “r” de Pearson ilustra metabólitos positivamente (rosa) e negativamente (azul) correlacionados com os fenótipos envolvendo AIJ sem MTX, AIJ com MTX e controles saudáveis. Correlações positivas com concentrações elevadas de lipídios estruturais, como PC aa e PC ae (setas vermelhas), foram observadas em controles em comparação com AIJ com e sem uso atual de MTX

Os níveis de Fosfatidilcolina com soma de resíduo de acil-alquil C36:1 (PC ae C36:1) e Fosfatidilcolina com soma de resíduo acil-alquil C38:0 (PC ae C38:0) foram significativamente maiores em controles saudáveis em comparação com AIJ com ou sem MTX ($p=4,11E-04$ e $p=1,45E-04$, respectivamente) (Figura 8).

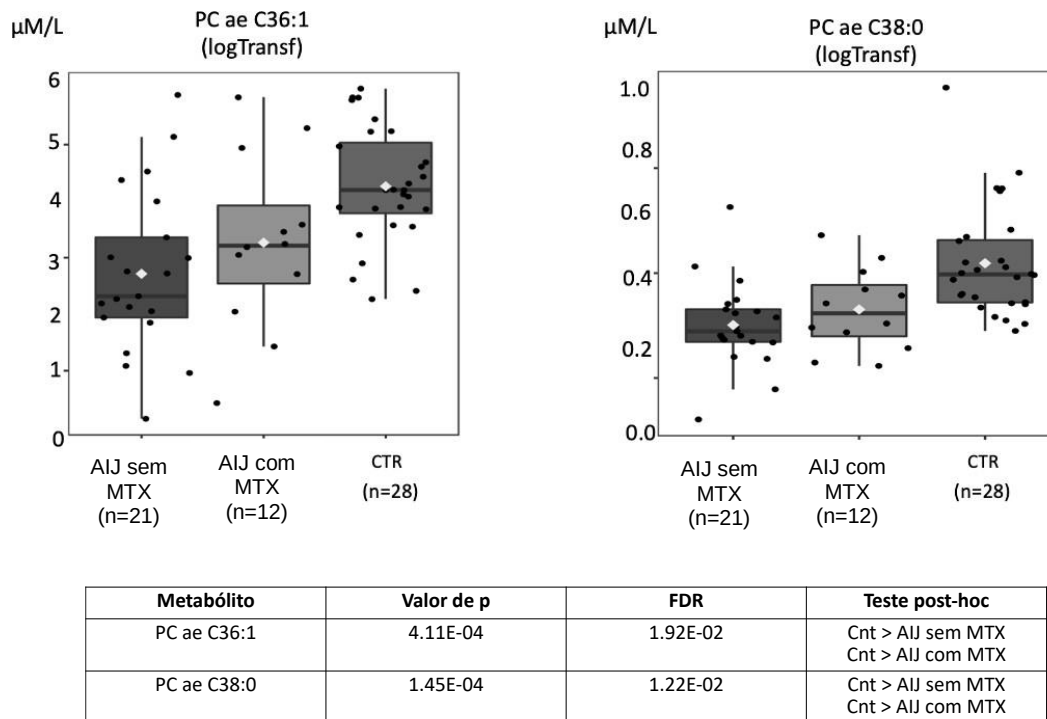
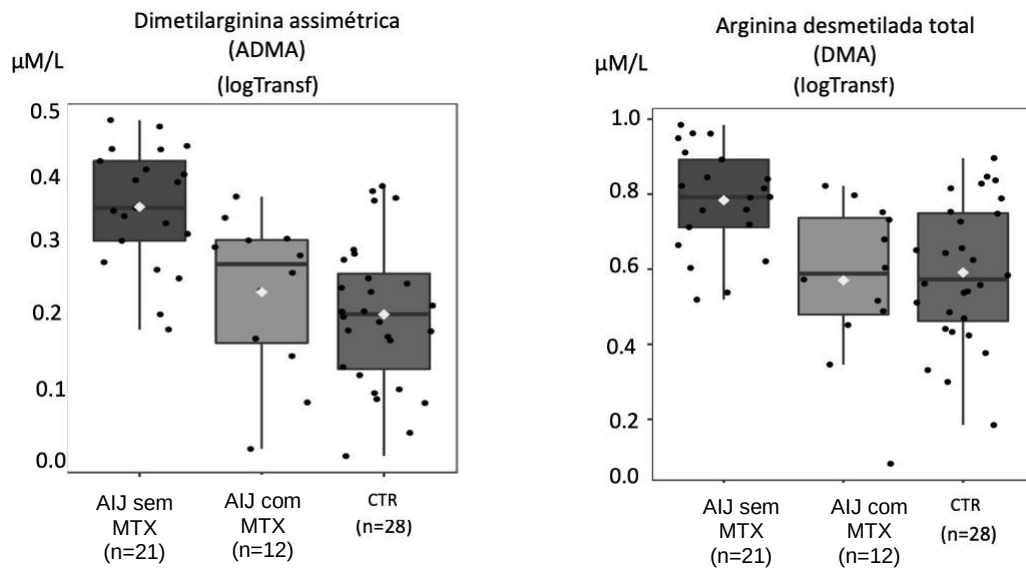


Figura 8- Fosfatidilcolina com soma de resíduo de PC ae C36:1 e Fosfatidilcolina com soma de resíduo de PC ae C38:0 níveis molares (eixo Y) na AIJ pacientes com e sem uso atual de MTX e Cnt (eixo X). FDR; AIJ sem MTX - AIJ sem uso atual de MTX; AIJ com MTX - AIJ com uso atual de MTX (ANOVA)

Por outro lado, foram identificadas diminuições nos níveis de dimetilação sistêmica de resíduos de arginina (ADMA e DMA) (setas azuis) no grupo controle saudável, quando comparado com pacientes com AIJ com e sem MTX. Os níveis séricos de ADMA foram maiores em AIJ sem MTX versus AIJ com MTX versus controles saudáveis ($p=5,87E-06$; $FDR=9,86E-04$). Os níveis de DMA também foram maiores em AIJ sem MTX versus AIJ com MTX versus controles ($p=4,58E-04$; $FDR=1,92E-02$) (Figura 9).



Metabolito	Valor de p	FDR	PostRoc Testa
ADMA	5.87E-06	9.86E-04	AIJ w/o MTX>AIJ w/MTX; AIJ w/o MTX >Cnt
Total DMA	4.58E-04	1.92E-02	AIJ w/o MTX>AIJ w/MTX; AIJ w/o MTX >Cnt

Figura 9- Níveis molares de ADMA e DMA (eixo Y) em pacientes com AIJ com e sem uso atual de MTX e Cnt (eixo X) FDR; AIJ sem MTX - AIJ sem uso atual de MTX; AIJ com MTX - AIJ com uso atual de MTX (ANOVA)

5. DISCUSSÃO

Mediante uma abordagem metabolômica quantitativa direcionada, demonstramos um perfil metabólico sérico distinto em pacientes com AIJ. Este padrão metabolômico foi caracterizado por menores níveis molares de carnitina livre, acilcarnitinas e lipídios, com maiores concentrações de dimetilarginina assimétrica e arginina dimetilada em pacientes sem terapia com MTX.

O principal ponto forte do presente estudo foi o uso de uma ferramenta metabolômica direcionada em mulheres pós-púberes com AIJ e controles saudáveis, com a padronização da coleta de sangue após 8 a 12 horas de jejum. Todas as amostras foram coletadas na fase folicular do ciclo menstrual, pois alterações metabólicas já foram demonstradas entre as diferentes fases do ciclo²⁹. Outra vantagem deste estudo foi o uso de uma abordagem metabolômica direcionada que permite a correta identificação dos metabólitos e o cálculo preciso de suas concentrações, diferenciando-se com um estudo anterior que utilizou um método não direcionado em pacientes com AIJ¹⁹. Foram selecionadas mulheres com AIJ e mulheres controle com menos de 40 anos e com frequência de tabagismo e IMC similares, uma vez que o sexo, idade, tabagismo, sobrepeso e obesidade podem influenciar nos níveis de biomarcadores metabólicos^{30,31}. Ainda, excluímos paciente que possuía difícil acesso venoso, necessitando coletas em momentos diferentes, o que levou à degradação do material coletado e possíveis erros na quantificação dos metabólitos³². Uma possível limitação deste estudo pode ser o pequeno número amostral devido à baixa frequência da doença, e ao desenho transversal, impossibilitando a generalização dos resultados.

O presente trabalho está de acordo com estudos anteriores identificando novos biomarcadores séricos e assinaturas metabólicas com expressão de carnitina livre e acilcarnitinas em pacientes com AIJ sob terapia com MTX^{17,19}.

Nossos achados mostraram a presença de distúrbios metabólicos semelhantes a distúrbios mitocondriais como condições subjacentes. A carnitina possui papel essencial na transferência de ácidos graxos de cadeia longa através da membrana mitocondrial interna, onde são metabolizados via β -oxidação³³. Apesar de servir como teste crítico de triagem para erros inatos do metabolismo em recém-nascidos, a dosagem de carnitina livre não é usual na população adulta³⁴. Além de serem conhecidas por participarem da β -oxidação de ácidos graxos (FAO) em mitocôndrias e peroxissomos, a carnitina livre e acilcarnitinas são consideradas potenciais biomarcadores para doenças e resposta a drogas²⁸. A interrupção da função mitocondrial está relacionada a inúmeras doenças agudas e crônicas como câncer, sepse, doenças cardiovasculares e imunológicas³⁵.

O MTX continua sendo o principal DMARD convencional utilizado e é o agente não biológico mais eficaz para pacientes com AIJ³⁶. Este medicamento é reconhecido principalmente por sua potente inibição do metabolismo do folato, afetando vários alvos envolvidos no metabolismo de um carbono, síntese de nucleotídeos e biossíntese de aminoácidos³⁷. O MTX atua inibindo a aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleotídeo (AICAR) transformilase, levando ao acúmulo de adenosina no interior das células, que se liga aos receptores da superfície celular e suprime inúmeras respostas inflamatórias e imunes³⁸. É importante ressaltar que as concentrações de metabólitos específicos diferiram entre pacientes com AR recebendo tratamento com MTX e aqueles sem o tratamento, concordando com achados anteriores sugerindo uma correlação potencial entre eventos metabólicos e a resposta ao MTX nos adultos com AR¹⁶. livre e acilcarnitinas em pacientes com AIJ sem MTX podem refletir uma disfunção na absorção intestinal de carnitina, com consequente piora da função mitocondrial

e FAO. Portanto, levantamos a hipótese de que os valores de carnitina livre que se aproximam dos níveis normais²⁴ que observamos em pacientes com AIJ em uso de MTX sejam provavelmente consequência de uma melhora do quadro bioquímico por meio dos efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores dessa droga³⁸. De fato, níveis mais elevados de acilcarnitinas em pacientes em uso de MTX corroboram com o conceito de melhor função mitocondrial em pacientes com AIJ em uso deste medicamento. Pacientes com AIJ podem apresentar anormalidades no metabolismo energético, provavelmente devido à disfunção mitocondrial³⁹⁻⁴¹.

No presente estudo, demonstramos que pacientes com AIJ apresentam disfunções bioquímicas, indicando distúrbio no metabolismo de lipídios estruturais, de acordo com alterações lipídicas descritas anteriormente em pacientes com AIJ e lúpus eritematoso sistêmico⁴²⁻⁴⁴, que estão associadas ao maior risco cardiovascular nesses pacientes⁴⁵.

As esfingomielinas (SM) são compostas por uma ceramida conectada a um ácido graxo simples e a uma fosfocolina ou fosfoetanolamida. Junto às fosfatidilcolinas (FC), estes fosfolipídios são os maiores componentes das membranas celulares e podem participar da sinalização da transdução⁴⁶. Constituem uma grande proporção do lipidoma encontrado no plasma humano por serem altamente abundantes nas lipoproteínas⁴⁷. O metabolismo dos fosfolipídios possui um papel importante na regulação de lipídios, lipoproteínas e produção energética mitocondrial, e está associado à progressão de doenças⁴⁸. De fato, dentre as vias metabólicas que a terapia com MTX inibe nos pacientes com AIJ, encontra-se o metabolismo lipídico, inibindo o metabolismo do ácido araquidônico, além das mudanças na composição lipídica celular descritos *in vitro*.

Estes achados sugerem que o MTX influencie na homeostase lipídica celular, resultando na diminuição dos lipídios contendo ácidos graxos saturados e ésteres de colesterol e aumentando os níveis de lipídios contendo ácidos graxos insaturados⁴⁹. Estes efeitos levam a um efeito benéfico cardiovascular, e por isso, a terapia com MTX nos casos de artrite autoimune está associada a uma diminuição do risco cardiovascular⁵⁰.

Além disso, assinaturas metabólicas circulantes pró/anti-inflamatórias indicando atividade da doença e estado inflamatório foram relatadas em pacientes com AR¹⁵ em nossas pacientes com AIJ, possivelmente porque a maioria das pacientes estava utilizando DMARDs e agentes biológicos, o que mantinha a doença sob controle.

Concentrações séricas aumentadas de ADMA, um inibidor endógeno da óxido nítrico sintase (NOS), foram relatadas em várias doenças reumatológicas, como lúpus eritematoso sistêmico, artrite psoriática, síndrome de Sjogren, doença de Behçet, espondilite anquilosante e esclerose sistêmica, indicando um potencial papel patogênico para o acúmulo de ADMA na ocorrência e progressão da disfunção endotelial, enrijecimento arterial e aterosclerose⁵¹. No presente trabalho, foram verificados níveis mais elevados de ADMA no grupo AIJ sem MTX, o que pode estar relacionado ao efeito anti-inflamatório e cardioprotetor do MTX^{38,52}.

Novos estudos longitudinais são necessários para definir se o perfil metabólico da AIJ sob MTX aqui identificado é um biomarcador valioso para a resposta ao tratamento em pacientes com essa condição.

6. CONCLUSÕES

Pacientes com AIJ apresentam fenótipos bioquímicos de metabólitos que sugerem disfunção mitocondrial e alteração na função absorptiva intestinal, assemelhando-se a defeitos no transporte da carnitina, síndrome do intestino curto, deficiências nas acil-CoA desidrogenases de cadeia muito longa e média e doença celíaca. Ainda, o uso de MTX em pacientes com AIJ possui potencial de melhorar a função mitocondrial.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pugliese C, van der Vinne RTA, Campos LMA, Guardieiro PR, Saviolli C, Bonfá E, et al. Juvenile idiopathic arthritis activity and function ability: deleterious effects in periodontal disease? Clin Rheumatol. 1º de janeiro de 2016;35(1):81–91.
2. Prakken B, Albani S, Martini A. Juvenile idiopathic arthritis. The Lancet. junho de 2011;377(9783):2138–49.
3. Petty RE, Southwood TR, Manners P, Baum J, Glass DN, Goldenberg J, et al. International League of Associations for Rheumatology classification of juvenile idiopathic arthritis: second revision, Edmonton, 2001. J Rheumatol. fevereiro de 2004;31(2):390–2.
4. van den Ham HJ, de Jager W, Bijlsma JWJ, Prakken BJ, de Boer RJ. Differential cytokine profiles in juvenile idiopathic arthritis subtypes revealed by cluster analysis. Rheumatology. agosto de 2009;48(8):899–905.
5. Barnes MG, Grom AA, Thompson SD, Griffin TA, Pavlidis P, Irtter L, et al. Subtype-specific peripheral blood gene expression profiles in recent-onset juvenile idiopathic arthritis. Arthritis Rheum. julho de 2009;60(7):2102–12.
6. Trindade VC, Carneiro-Sampaio M, Bonfa E, Silva CA. An Update on the Management of Childhood-Onset Systemic Lupus Erythematosus. Pediatric Drugs. 10 de julho de 2021;23(4):331–47.
7. Hunter PJ, Nistala K, Jina N, Eddaoudi A, Thomson W, Hubank M, et al. Biologic predictors of extension of oligoarticular juvenile idiopathic arthritis as determined from synovial fluid cellular composition and gene expression. Arthritis Rheum. 25 de fevereiro de 2010;62(3):896–907.
8. Consolaro A, Varnier GC, Martini A, Ravelli A. Advances in biomarkers for paediatric rheumatic diseases. Nat Rev Rheumatol. 16 de maio de 2015;11(5):265–75.

-
9. Aoki C, Inaba Y, Choe H, Kaneko U, Hara R, Miyamae T, et al. Discrepancy Between Clinical and Radiological Responses to Tocilizumab Treatment in Patients with Systemic-onset Juvenile Idiopathic Arthritis. *J Rheumatol.* junho de 2014;41(6):1171–7.
 10. Myles A, Aggarwal A. Expression of Toll-like receptors 2 and 4 is increased in peripheral blood and synovial fluid monocytes of patients with enthesitis-related arthritis subtype of juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology.* março de 2011;50(3):481–8.
 11. ISWANATH V, MYLES A, DAYAL R, AGGARWAL A. Levels of Serum Matrix Metalloproteinase-3 Correlate with Disease Activity in the Enthesitis-related Arthritis Category of Juvenile Idiopathic Arthritis. *J Rheumatol.* novembro de 2011;38(11):2482–7.
 12. Moncrieffe H, Ursu S, Holzinger D, Patrick F, Kassoumeri L, Wade A, et al. A subgroup of juvenile idiopathic arthritis patients who respond well to methotrexate are identified by the serum biomarker MRP8/14 protein. *Rheumatology.* agosto de 2013;52(8):1467–76.
 13. Holzinger D, Frosch M, Kastrup A, Prince FHM, Otten MH, Van Suijlekom-Smit LWA, et al. The Toll-like receptor 4 agonist MRP8/14 protein complex is a sensitive indicator for disease activity and predicts relapses in systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Ann Rheum Dis.* junho de 2012;71(6):974–80.
 14. Wang M, Huang J, Fan H, He D, Zhao S, Shu Y, et al. Treatment of Rheumatoid Arthritis Using Combination of Methotrexate and Tripterygium Glycosides Tablets—A Quantitative Plasma Pharmacochemical and Pseudotargeted Metabolomic Approach. *Front Pharmacol.* 9 de outubro de 2018;9.
 15. Hur B, Gupta VK, Huang H, Wright KA, Warrington KJ, Taneja V, et al. Plasma metabolomic profiling in patients with rheumatoid arthritis identifies biochemical features predictive of quantitative disease activity. *Arthritis Res Ther.* 8 de dezembro de 2021;23(1):164.

16. Gosselt HR, Muller IB, Jansen G, van Weeghel M, Vaz FM, Hazes JMW, et al. Identification of Metabolic Biomarkers in Relation to Methotrexate Response in Early Rheumatoid Arthritis. *J Pers Med*. 10 de dezembro de 2020;10(4):271.
17. Berntson L, Agback P, Dicksved J. Changes in fecal microbiota and metabolomics in a child with juvenile idiopathic arthritis (JIA) responding to two treatment periods with exclusive enteral nutrition (EEN). *Clin Rheumatol*. 29 de junho de 2016;35(6):1501–6.
18. Robinson GA, Waddington KE, Coelewij L, Peng J, Naja M, Wincup C, et al. Increased apolipoprotein-B:A1 ratio predicts cardiometabolic risk in patients with juvenile onset SLE. *EBioMedicine*. março de 2021;65:103243.
19. Lewis KA, Osier N, Carrasco R, Chiou J, Carter P, Garcia A, et al. Serine, N-acetylaspartate differentiate adolescents with juvenile idiopathic arthritis compared with healthy controls: a metabolomics cross-sectional study. *Pediatric Rheumatology*. 10 de dezembro de 2022;20(1):12.
20. Consolaro A, Ruperto N, Bazso A, Pistorio A, Magni-Manzoni S, Filocamo G, et al. Development and validation of a composite disease activity score for juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum*. 15 de maio de 2009;61(5):658–66.
21. van Riel PLCM. The development of the disease activity score (DAS) and the disease activity score using 28 joint counts (DAS28). *Clin Exp Rheumatol*. 2014;32(5 Suppl 85):S-65-74.
22. Ismail, Showalter, Fiehn. Inborn Errors of Metabolism in the Era of Untargeted Metabolomics and Lipidomics. *Metabolites*. 21 de outubro de 2019;9(10):242.
23. da Silva I, da Costa Vieira R, Stella C, Loturco E, Carvalho AL, Veo C, et al. Inborn-like errors of metabolism are determinants of breast cancer

- risk, clinical response and survival: a study of human biochemical individuality. *Oncotarget*. 3 de agosto de 2018;9(60):31664–81.
- 24.Longo N, Amat di San Filippo C, Pasquali M. Disorders of carnitine transport and the carnitine cycle. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 15 de maio de 2006;142C(2):77–85.
- 25.HIROSE S, HIRATA M, AZUMA N, SHIRAI Z, MITUDOME A, ODA T. Carnitine depletion during total parenteral nutrition despite oral L- carnitine supplementation. *Pediatrics International*. abril de 1997;39(2):194–200.
- 26.Curione M, Danese C, Viola F, Di Bona S, Anastasia A, Cugini P, et al. Carnitine deficiency in patients with coeliac disease and idiopathic dilated cardiomyopathy. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. agosto de 2005;15(4):279–83.
- 27.Flanagan JL, Simmons PA, Vehige J, Willcox MD, Garrett Q. Role of carnitine in disease. *Nutr Metab (Lond)*. 2010;7(1):30.
- 28.McCann MR, George De la Rosa MV, Rosania GR, Stringer KA. L- Carnitine and Acylcarnitines: Mitochondrial Biomarkers for Precision Medicine. *Metabolites*. 14 de janeiro de 2021;11(1):51.
- 29.Wallace M, Hashim YZHY, Wingfield M, Culliton M, McAuliffe F, Gibney MJ, et al. Effects of menstrual cycle phase on metabolomic profiles in premenopausal women. *Human Reproduction*. 1º de abril de 2010;25(4):949–56.
- 30.Frigerio G, Favero C, Savino D, Mercadante R, Albetti B, Dioni L, et al. Plasma Metabolomic Profiling in 1391 Subjects with Overweight and Obesity from the SPHERE Study. *Metabolites*. 24 de março de 2021;11(4):194.
- 31.Rist MJ, Roth A, Frommherz L, Weinert CH, Krüger R, Merz B, et al. Metabolite patterns predicting sex and age in participants of the Karlsruhe Metabolomics and Nutrition (KarMeN) study. *PLoS One*. 16 de agosto de 2017;12(8):e0183228.

-
32. Breier M, Wahl S, Prehn C, Fugmann M, Ferrari U, Weise M, et al. Targeted Metabolomics Identifies Reliable and Stable Metabolites in Human Serum and Plasma Samples. *PLoS One*. 24 de fevereiro de 2014;9(2):e89728.
33. VAZ FM, WANDERS RJA. Carnitine biosynthesis in mammals. *Biochemical Journal*. 1º de fevereiro de 2002;361(3):417.
34. Wanders RJA, Ruiten JPN, IJlst L, Waterham HR, Houten SM. The enzymology of mitochondrial fatty acid beta-oxidation and its application to follow-up analysis of positive neonatal screening results. *J Inher Metab Dis*. 20 de outubro de 2010;33(5):479–94.
35. Wallace DC. A mitochondrial bioenergetic etiology of disease. *Journal of Clinical Investigation*. 1º de abril de 2013;123(4):1405–12.
36. Blazina Š, Markelj G, Avramović MZ, Toplak N, Avčin T. Management of Juvenile Idiopathic Arthritis: A Clinical Guide. *Pediatric Drugs*. 2 de dezembro de 2016;18(6):397–412.
37. Gonen N, Assaraf YG. Antifolates in cancer therapy: Structure, activity and mechanisms of drug resistance. *Drug Resistance Updates*. agosto de 2012;15(4):183–210.
38. Cronstein BN, Aune TM. Methotrexate and its mechanisms of action in inflammatory arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 17 de março de 2020;16(3):145–54.
39. Omoyinmi E, Hamaoui R, Bryant A, Jiang MC, Athigapanich T, Eleftheriou D, et al. Mitochondrial and oxidative stress genes are differentially expressed in neutrophils of sJIA patients treated with tocilizumab: a pilot microarray study. *Pediatric Rheumatology*. 9 de dezembro de 2016;14(1):7.

-
40. Ishikawa S, Mima T, Aoki C, Yoshio-Hoshino N, Adachi Y, Imagawa T, et al. Abnormal expression of the genes involved in cytokine networks and mitochondrial function in systemic juvenile idiopathic arthritis identified by DNA microarray analysis. *Ann Rheum Dis.* fevereiro de 2009;68(2):264–72.
 41. Rochette E, Bourdier P, Pereira B, Echaubard S, Borderon C, Caron N, et al. Impaired Muscular Fat Metabolism in Juvenile Idiopathic Arthritis in Inactive Disease. *Front Physiol.* 1º de maio de 2019;10.
 42. Robinson GA, Waddington KE, Coelewij L, Peng J, Naja M, Wincup C, et al. Increased apolipoprotein-B:A1 ratio predicts cardiometabolic risk in patients with juvenile onset SLE. *EBioMedicine.* março de 2021;65:103243.
 43. Rodrigues WDR, Sarni ROS, Fonseca FLA, Araújo A, Len CA, Terreri MT. Biomarkers of lipid metabolism in patients with juvenile idiopathic arthritis: relationship with disease subtype and inflammatory activity. *Pediatric Rheumatology.* 3 de maio de 2021;19(1):66.
 44. Marangoni RG, Hayata AL, Borba EF, Azevedo PM, Bonfá E, Goldenstein-Schainberg C. Decreased high-density lipoprotein cholesterol levels in polyarticular juvenile idiopathic arthritis. *Clinics.* setembro de 2011;66(9):1549–52.
 45. Jednacz E, Rutkowska-Sak L. Atherosclerosis in Juvenile Idiopathic Arthritis. *Mediators Inflamm.* 2012;2012:1–5.
 46. Cole LK, Vance JE, Vance DE. Phosphatidylcholine biosynthesis and lipoprotein metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids.* maio de 2012;1821(5):754–61.
 47. Quehenberger O, Dennis EA. The Human Plasma Lipidome. *New England Journal of Medicine.* 10 de novembro de 2011;365(19):1812–23.

-
48. van der Veen JN, Kennelly JP, Wan S, Vance JE, Vance DE, Jacobs RL. The critical role of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine metabolism in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. setembro de 2017;1859(9):1558–72.
49. Funk RS, Singh RK, Becker ML. Metabolomic Profiling to Identify Molecular Biomarkers of Cellular Response to Methotrexate *In Vitro*. *Clin Transl Sci*. 25 de janeiro de 2020;13(1):137–46.
50. Ference BA, Graham I, Tokgozoglu L, Catapano AL. Impact of Lipids on Cardiovascular Health. *J Am Coll Cardiol*. setembro de 2018;72(10):1141–56.
51. Erre GL, Mangoni AA, Castagna F, Paliogiannis P, Carru C, Passiu G, et al. Meta-Analysis of Asymmetric Dimethylarginine Concentrations in Rheumatic Diseases. *Sci Rep*. 1º de abril de 2019;9(1):5426.
52. Marks JL, Edwards CJ. Protective effect of methotrexate in patients with rheumatoid arthritis and cardiovascular comorbidity. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. 2 de junho de 2012;4(3):149–57.