

**VALÉRIA DE FALCO CAPARBO**

**Avaliação do papel da osteoclastogênese e  
ativação dos osteoclastos em pacientes com  
espondilite anquilosante**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina  
da Universidade de São Paulo para obtenção  
do título de Doutor em Ciências

Programa de Ortopedia e Traumatologia

Orientadora: Profa. Dra. Rosa Maria Rodrigues  
Pereira

**São Paulo  
2018**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Caparbo, Valéria de Falco

Avaliação do papel da osteoclastogênese e ativação dos osteoclastos em pacientes com espondilite anquilosante / Valéria de Falco Caparbo. -- São Paulo, 2018.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ortopedia e Traumatologia.

Orientadora: Rosa Maria Rodrigues Pereira.

Descritores: 1.Espondilite anquilosante  
2.Osteoclastos 3.Apoptose 4.Osteoprotegerina 5.  
Ligante RANK 6.Marcadores biológicos 7.Colágeno tipo  
I

USP/FM/DBD-215/18

Responsável: Kátia Maria Bruno Ferreira - CRB-8/6008

*“Feliz aquele que transfere o que  
sabe e aprende o que ensina”.*

*Cora Coralina*

Dedico este trabalho

A minha família, principalmente minha  
filha Victoria, que sempre me apoiaram  
incondicionalmente.

## **AGRADECIMENTOS**

À Profa. Dra. Rosa Maria Rodrigues Pereira pela oportunidade, ensinamentos e confiança a mim depositada em desenvolver este estudo além do apoio financeiro para o aprendizado na Universidade de Sherbrooke, Canadá.

À Profa. Dra. Eloisa Bonfá pela oportunidade e apoio para o desenvolvimento deste estudo.

Ao Prof. Dr. Artur José de Brum-Fernandes pelos ensinamentos iniciais na Disciplina de Reumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo acolhimento em seu laboratório na Universidade de Sherbrooke, Canadá, para aprendizado das metodologias empregadas neste estudo.

À Dra. Carla Gonçalves Schahin Saad e ao Dr. Júlio César Bertacini de Moraes pela disponibilidade e total apoio no recrutamento e avaliações clínicas dos pacientes.

À Cristina Maria Nazareth pela paciência e ajuda em separar os prontuários dos pacientes do ambulatório de espondiloartrites da Disciplina de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

À Claudia Benetti e à Liliam Takayama pela execução dos exames de densitometria óssea dos pacientes e controles.

Ao Eurimar Rogério Teixeira pela realização das coletas de sangue deste estudo, além da amizade e carinho.

Às colegas da disciplina de Reumatologia, Marilda e Juliana, sempre preocupadas em indicar os controles.

À Solange Carrasco pelo auxílio na padronização das análises da citometria de fluxo.

Ao Rogério Ruscitto do Prado pelo auxílio nas análises estatísticas.

Aos membros da banca examinadora de qualificação Dra. Sandra Golfinet Pasoto, Dr. Diogo Souza Domiciano e ao Dr. Marcelo Pinheiro pelas sugestões.

Às secretárias da Disciplina de Reumatologia Cláudia, Marta e Mayra, pela amizade, paciência e pela disponibilidade em auxiliar em qualquer situação.

À secretária da Pós-Graduação, Tania Borges, pela simpatia e eficiência.

A todos os pacientes e controles que voluntariamente concordaram participar do estudo e tornar possível o seu desenvolvimento.

A todos aqueles que porventura não estejam aqui citados, mas que com certeza contribuíram para o desenvolvimento deste estudo.

Muito obrigada a todos!

### Agradecimentos Especiais

**À FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo,**  
que aprovou e financiou a execução deste projeto, pela confiança que dedica  
aos pesquisadores e à pesquisa científica.

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. Serviço de Biblioteca e Documentação.  
*Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.*

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentações; 2011.

Abreviatura 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	
Lista de gráficos	
Resumo	
Abstract	
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 OBJETIVOS .....	7
3 MÉTODOS .....	9
3.1 Pacientes e Controles .....	10
3.2 Parâmetros Clínicos .....	11
3.3 Avaliação Radiológica .....	12
3.4 Densidade Mineral Óssea .....	12
3.5 Cultura de Células .....	13
3.6 Quantificação de precursores de osteoclastos (CD16 e CD14) .....	13
3.7 Ensaio de Diferenciação.....	14
3.8 Apoptose dos Osteoclastos.....	14
3.9 Avaliação Laboratorial de Marcadores Bioquímicos do Metabolismo Ósseo.....	15
3.9.1 Níveis séricos de OPG e sRANKL .....	15
3.9.2 Níveis séricos de CTX e P1NP .....	15
3.9.3 Citocinas e marcadores inflamatórios .....	16
3.10 Análise Estatística .....	17
4 RESULTADOS.....	18
4.1 Pacientes e Controles .....	19
4.2 Dados associados a osteoclastogênese <i>in vitro</i> - pareamento entre pacientes com EA e controles saudáveis.....	21
4.2.1 Osteoclastogênese <i>in vitro</i> .....	21
4.2.2 Precursores de osteoclastos circulantes .....	24
4.2.3 Níveis séricos de RANKL/OPG .....	25
4.2.4 Níveis séricos de CTX e P1NP .....	25
4.2.5 Apoptose.....	26
4.2.6 Níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias .....	27
4.2.7 Densidade mineral óssea.....	28
4.3 Osteoclastogênese e parâmetros de doença em pacientes com EA.....	29
5 DISCUSSÃO .....	31
6 CONCLUSÃO .....	39
7 ANEXOS .....	41
8 REFERÊNCIAS.....	49
APÊNDICES .....	60

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINH	- Anti-inflamatório não-hormonal
ASDAI	- <i>Bath ankylosing spondylitis disease activity index</i>
ASDAS	- <i>Ankylosing spondylitis disease activity score</i>
ASQoL	- <i>Ankylosing spondylitis quality of life questionnaire</i>
BASFI	- <i>Bath ankylosing spondylitis function index</i>
BASMI	- <i>Bath ankylosing spondylitis metrology index</i>
CAPPesq	- Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
COX	- Cicloxigenase
CT	- Controles saudáveis
CTX	- Telopectídeo C-terminal do colágeno tipo I
CV	- Coeficiente de variação
DMARDS	- Drogas antirreumáticas modificadora de doença
DMO	- Densidade mineral óssea
DP	- Desvio padrão
DXA	- Absorciometria por dupla emissão de raios-X
EA	- Espondilite anquilosante
ELISA	- Enzima imunoensaio
HC-FMUSP	- Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HLA	- Antígeno de leucócito humano
IL	- Interleucina
IMC	- Índice de massa corporal
ISCD	- Sociedade internacional de densitometria clínica
iTNF $\alpha$	- Inibidor de fator de necrose tumoral alfa
M-CSF	- Fator estimulador de colônias de macrófagos
MLG	- Modelo linear generalizado
mSASSS	- <i>Modified stoke ankylosing spondylitis spine score</i>
OC	- Osteoclasto

OPG	- Osteoprotegerina
P1NP	- Propeptídeo N-terminal do colágeno tipo 1
PBMCs	- Células mononucleares do sangue periférico
PBS	- Solução salina tamponada com fosfato
PCR	- Proteína C reativa
PE	- Ficoeritrina
RANK	- Receptor ativador do fator nuclear $\kappa$ B
RANKL	- Ligante do receptor ativador do fator nuclear $\kappa$ B
SFB	- Soro fetal bovino
TNF $\alpha$	- Fator de necrose tumoral alfa
TRAP	- Fosfatase ácida tartarato resistente
VHS	- Velocidade de hemossedimentação
$\alpha$ MEM	- Meio mínimo essencial de Eagle alfa modificado

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Osteoclastogênese mediada por M-CSF e por RANKL .....4
- Figura 2 - Origem das populações de monócitos a partir de células-tronco hematopoiéticas .....5
- Figura 3 - Fotomicrografia de células TRAP positivas (osteoclastos) de pacientes com EA e CT após 21 dias em cultura .....22
- Figura 4 - Fotomicrografia de osteoclasto em apoptose. Osteoclastos diferenciados a partir de células mononucleares de sangue periférico de pacientes com EA e CT .....27

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características demográficas, antropométricas e fatores de risco relacionados à massa óssea de pacientes com EA e CT .....	19
Tabela 2 - Características clínicas, parâmetros inflamatórios laboratoriais, mSASSS e tratamento em pacientes com EA .....	20
Tabela 3 - Ensaio de osteoclastogênese <i>in vitro</i> (número de osteoclastos, porcentagem de precursores de osteoclastos, apoptose), níveis séricos de marcadores de turnover ósseo, citocinas pró-inflamatórias e dados de DMO de pacientes em terapia de inibidor de TNF $\alpha$ (sem uso de AINH), de pacientes em uso de AINH (sem terapia de iTNF $\alpha$ ) comparados com o grupo controle .....	23
Tabela 4 - Valores dos marcadores do metabolismo ósseo (RANKL, OPG, CTX e P1NP), citocinas e da DMO dos pacientes com EA e CT .....	29
Tabela 5 - Modelo linear generalizado: número de osteoclastos associado à duração de doença e tratamentos com AINH e iTNF $\alpha$ .....	30

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Número de osteoclastos gerados a partir de células mononucleares do sangue periférico ( $1 \times 10^6$ células) de pacientes com EA e CT, após 21 dias em cultura .....	21
Gráfico 2 - Porcentagem de monócitos expressando antígeno de superfície CD16 em pacientes com EA e CT .....	24
Gráfico 3 - Razão do RANKL e OPG em pacientes com EA e CT .....	25
Gráfico 4 - Razão do CTX e P1NP em pacientes com EA e CT .....	26
Gráfico 5 - Porcentagem de osteoclastos em apoptose em pacientes com EA e CT .....	27

## RESUMO

Caparbo VF. *Avaliação do papel da osteoclastogênese e ativação dos osteoclastos em pacientes com espondilite anquilosante* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

Objetivo: investigar a capacidade osteoclastogênica de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de pacientes do sexo masculino com espondilite anquilosante (EA), comparando com indivíduos saudáveis e determinar a relação da osteoclastogênese com parâmetros clínicos e laboratoriais. Métodos: células mononucleares do sangue periférico de 85 pacientes com espondilite anquilosante e 59 controles saudáveis (CT) foram marcadas para avaliar a presença de células CD16 positivas (precursores de osteoclastos). As PBMCs foram mantidas, *in vitro*, por 21 dias para indução da diferenciação em osteoclastos e avaliação da apoptose destas células. Os níveis séricos do ligante do receptor ativador de fator nuclear  $\kappa$ B (RANKL), osteoprotegerina (OPG), telopeptídeo C-terminal do colágeno tipo I (CTX) e propeptídeo N-terminal do procolágeno tipo I (P1NP) foram também avaliados. Resultados: PBMCs de pacientes com EA apresentaram menor porcentagem de células CD16 positivas ( $25,06 \pm 8,59$  vs.  $28,59 \pm 10,20\%$ ;  $p = 0,026$ ) e originaram menor número de osteoclastos comparados aos controles saudáveis ( $647,7 \pm 669,4$  vs.  $764,4 \pm 561,9$  OC/poço;  $p = 0,014$ ). A porcentagem de osteoclastos em apoptose foi menos frequente nos pacientes com EA *versus* CT ( $31,8 \pm 32,5$  vs.  $44,5 \pm 34,3\%$ ;  $p = 0,007$ ). Menores relações RANKL/OPG e CTX/P1NP foram observadas nos pacientes com EA em relação aos CT ( $0,05 \pm 0,03$  vs.  $0,07 \pm 0,07$ ;  $p = 0,046$  e  $0,008 \pm 0,003$  vs.  $0,010 \pm 0,003$ ;  $p < 0,001$ , respectivamente). Pacientes com EA em uso de terapia de anti-inflamatório não-hormonal (AINH) não apresentaram diferença associada ao número de osteoclastos gerados e à porcentagem de células CD16 positivas comparados aos CT ( $p > 0,05$ ). Entretanto, pacientes com EA em uso de terapia com inibidor de TNF $\alpha$  (iTNF $\alpha$ ) demonstraram menor número de osteoclastos gerados comparados aos indivíduos saudáveis ( $582,51 \pm 717,56$  vs.  $764,43 \pm 561,9$  OC/poço;  $p = 0,047$ ). Observou-se uma correlação negativa entre número de osteoclastos gerados a partir de PBMC de pacientes com EA e duração de doença ( $R = -0,220$ ,  $p = 0,043$ ). Conclusões: os presentes resultados demonstraram que monócitos de pacientes com EA apresentam uma menor capacidade em gerar osteoclastos comparados a indivíduos saudáveis, e que a osteoclastogênese esteve correlacionada negativamente à duração de doença. Estes dados sugerem que os osteoclastos possuem um papel importante na fisiopatologia da doença óssea nos pacientes com EA.

Descritores: espondilite anquilosante; osteoclastos; apoptose; osteoprotegerina; ligante RANK; marcadores biológicos; colágeno tipo I

## ABSTRACT

Caparbo VC. *Evaluation of the role of osteoclastogenesis and activation of osteoclasts in patients with ankylosing spondylitis* [thesis]: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

**Objective:** the aim of this study was to investigate if the osteoclastogenic capacity of PBMCs is different in AS patients compared to controls and the relationship between osteoclastogenesis and clinical/laboratory parameters. **Methods:** PBMCs from 85 male ankylosing spondylitis (AS) patients and 59 controls were tested for CD16+ cells and induced to differentiate into osteoclasts over 3 weeks *in vitro*. Serum levels of RANKL, osteoprotegerin (OPG), C-terminal telopeptide of type I collagen (CTX) and N-terminal propeptide of type 1 collagen (P1NP) were also evaluated. **Results:** PBMCs from AS patients had fewer CD16+ cells ( $25.06 \pm 8.59$  vs.  $28.59 \pm 10.20\%$ ;  $p = 0.026$ ) and produced fewer osteoclasts ( $647.7 \pm 669.4$  vs.  $764.4 \pm 561.9$  OC/well;  $p = 0.014$ ) compared to controls. Apoptosis occurred less frequently in osteoclasts obtained from AS patients than in osteoclasts from the controls ( $31.8 \pm 32.5$  vs.  $44.5 \pm 34.3\%$ ;  $p = 0.007$ ). A lower RANKL/OPG and CTX/P1NP were observed in AS patients compared to controls ( $0.05 \pm 0.03$  vs.  $0.07 \pm 0.07$ ;  $p = 0.046$  e  $0.008 \pm 0.003$  vs.  $0.010 \pm 0.003$ ;  $p < 0.001$ , respectively). AS patients taking NSAIDs presented no difference regarding the number of OCs produced and the percentage of CD16+ cells compared to controls ( $p > 0.05$ ). However, patients taking TNF $\alpha$  inhibitors (TNFi) presented lower OC numbers than controls ( $582.51 \pm 717.56$  vs.  $764.43 \pm 561.9$  OC/well;  $p = 0.047$ ). A negative correlation was demonstrated between the number of osteoclasts generated from PBMCs of AS patients and disease duration ( $R = -0.220$ ,  $p = 0.043$ ). **Conclusion:** monocytes from male AS patients display a lower capacity to generate osteoclasts *in vitro* compared to cells from controls. Osteoclastogenesis was negatively correlated with disease duration. This finding supports the idea that osteoclasts play a role in the physiopathology of bone disease in AS patients.

**Descriptors:** ankylosing spondylitis; osteoclasts; apoptosis; osteoprotegerin; RANK ligand; biological markers; type I collagen



# **1 INTRODUÇÃO**

O remodelamento ósseo é um processo contínuo e dinâmico que ocorre ao longo da vida e a homeostase do osso é dependente das atividades coordenadas entre osteoclastos e osteoblastos, que são, respectivamente, as células responsáveis pela reabsorção e formação óssea. Estudos no campo da osteoimunologia ressaltam o papel do sistema imune na homeostase do osso em condições fisiológicas e patológicas (Karsdal *et al.*, 2007; Goldring, 2013). Algumas patologias inflamatórias estão associadas ao desacoplamento ou desequilíbrio entre as atividades das células do tecido ósseo levando a um remodelamento ósseo anormal, que pode causar uma diminuição da massa óssea, como na osteoporose pós-menopausa e artrite reumatoide ou por outro lado, favorecer a formação óssea, como na osteopetrose e na espondilite anquilosante (EA) (Karsdal *et al.*, 2007). Os mecanismos envolvidos no remodelamento ósseo nessas doenças ainda são pouco compreendidos.

De um modo geral, o processo de perda da massa óssea está comumente associado ao aumento da reabsorção óssea promovido por um aumento da atividade dos osteoclastos, que são células derivadas da fusão de células precursoras mononucleares circulantes do sangue periférico, multinucleadas e especificamente células positivas para fosfatase ácida tartarato resistente. O processo de diferenciação de células mononucleares

em osteoclastos, denominado osteoclastogênese, ocorre a partir da fusão de monócitos na presença do fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF) e ligante do receptor ativador de fator nuclear  $\kappa$ B (RANKL) (Figura 1). M-CSF estimula a expressão de receptor ativador de fator nuclear  $\kappa$ B (RANK) em precursores de osteoclastos (monócitos), promovendo a diferenciação e prolongando a sobrevivência de osteoclastos (OCs) *in vivo* (Fuller *et al.*, 1993; Zhao *et al.*, 2016). O ligante do receptor ativador do fator nuclear- $\kappa$ B é considerado uma potente citocina estimuladora dos osteoclastos, enquanto que a osteoprotegerina (OPG), é uma proteína que atua como antagonista competitivo do RANKL, inibindo que este se ligue ao RANK e, conseqüentemente, inibe a osteoclastogênese (Rauner *et al.*, 2007). Desta maneira, a interação RANKL-RANK contribui para a diferenciação e ativação de osteoclastos e, portanto, pode ser considerada como a via de sinalização para a osteoclastogênese, com importante papel na manutenção do remodelamento ósseo fisiológico, assim como na degradação do osso em patologias inflamatórias crônicas (Theill *et al.*, 2002). Adicionalmente, produtos da formação e degradação óssea também podem ser avaliados por meio da dosagem de níveis séricos de propeptídeo N-terminal do procolágeno tipo I [(P1NP) *N-terminal propeptide of type I collagen*], um marcador de formação óssea; e do telopeptídeo C-terminal do colágeno tipo I [(CTX) *C-terminal telopeptide of type I collagen*], um marcador de reabsorção óssea, que podem ser considerados ferramenta adicional na avaliação do remodelamento ósseo (Wheater *et al.*, 2013).

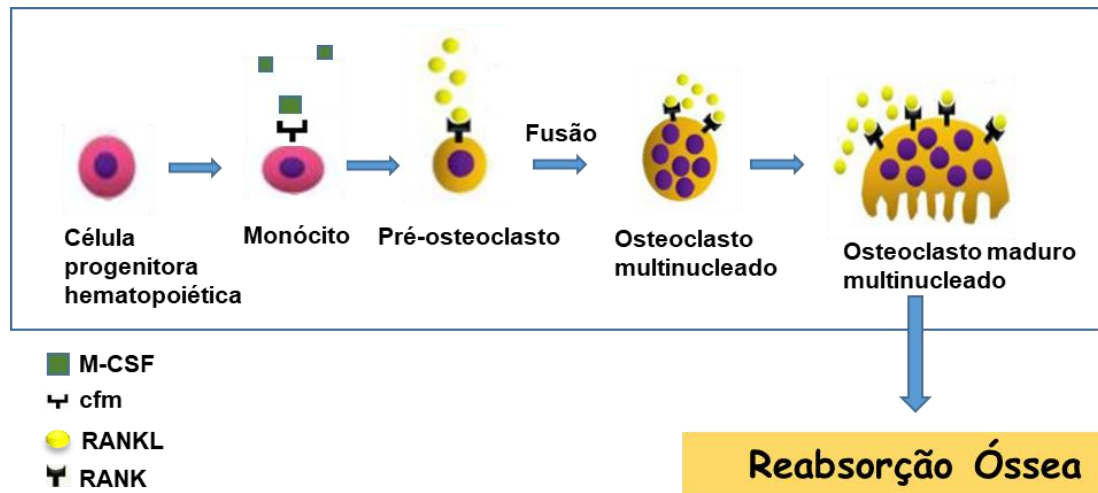
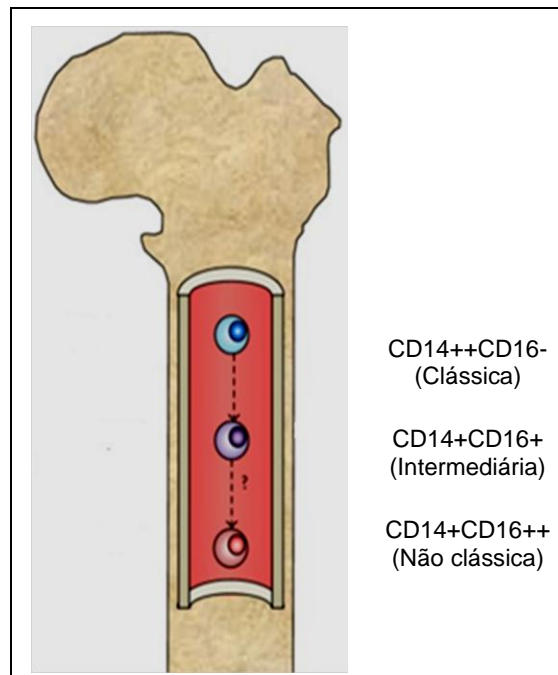


Figura 1 - Osteoclastogênese mediada por M-CSF e por RANKL [Fonte: Adaptada de Kajiya *et al.* (2010)]

Os monócitos são células fenotípica e funcionalmente heterogêneas e possuem um papel regulatório importante na inflamação e resposta imune inata (Auffray *et al.*, 2007; Wong *et al.*, 2012; Sprangers *et al.*, 2016a). No sangue periférico humano, foram identificados três subconjuntos de monócitos, funcionalmente diferentes, caracterizados com base na expressão dos marcadores de superfície CD14 e CD16 (Sprangers *et al.*, 2016b). Estas subpopulações são classificadas como: clássica ( $CD14^{++}CD16^{-}$ ), intermediária ( $CD14^{+}CD16^{+}$ ) e não clássica ( $CD14^{+}CD16^{++}$ ) (Figura 2), sendo a subpopulação clássica, a mais comumente considerada como célula precursora de osteoclastos. Entretanto, dados na literatura têm demonstrado uma maior porcentagem da subpopulação intermediária de monócitos em doenças inflamatórias como artrite reumatoide e artrite psoriásica (Chiu *et al.*, 2010; Rossol *et al.*, 2012).



**Figura 2 - Origem das populações de monócitos a partir de células-tronco hematopoiéticas [Fonte: Adaptada de Sprangers *et al.* (2016a)]**

A osteoclastogênese em pacientes com espondilite anquilosante é pouco abordada e os poucos estudos descritos na literatura apresentam dados controversos (Im *et al.*, 2009; Colina *et al.*, 2013; Perpétuo *et al.*, 2015; Perpétuo *et al.*, 2017). A espondilite anquilosante é uma doença inflamatória crônica caracterizada pela excessiva formação óssea levando ao desenvolvimento de sindesmófitos e anquilose vertebral (Dougados e Baeten, 2011; Carter e Lories 2011; Lories e Schett, 2012). Entretanto, concomitantemente à neoformação óssea, os pacientes com esta patologia frequentemente apresentam baixa densidade mineral óssea, que pode aumentar o risco de fraturas. Esta comorbidade está relacionada à inflamação sistêmica e, também, em decorrência da imobilidade física associada à doença (Dougados e Baeten, 2011; Carter e Lories, 2011; Lories e Schett, 2012; Singh *et al.*, 2013; Briot e Roux, 2015).

O processo inflamatório agudo em pacientes com EA são caracterizados anatomopatologicamente por uma predominância de infiltrados de células mononucleares, incluindo macrófagos e células T, assim como pelo aumento do número de osteoclastos (Appel *et al.*, 2006), corroborando com as alterações erosivas observadas inicialmente na avaliação radiográfica na EA, que são seguidas de uma resposta esquelética anabólica distinta, resultando em excessiva formação óssea (Diarra *et al.*, 2007; Lories *et al.*, 2009).

## **2 OBJETIVOS**

O objetivo primário deste estudo foi avaliar o papel dos osteoclastos na fisiopatologia da doença óssea em pacientes com EA do sexo masculino, comparando com indivíduos saudáveis por meio da análise de:

a) precursores de osteoclastos, osteoclastogênese, apoptose de osteoclastos.

b) marcadores séricos de reabsorção e formação óssea.

O objetivo secundário foi associar os parâmetros descritos acima com variáveis clínicas.



## **3 MÉTODOS**

### 3.1 Pacientes e Controles

Foram recrutados 85 pacientes do sexo masculino com idade de  $\geq 18$  a  $\leq 55$  anos, seguidos regularmente no ambulatório de espondiloartrite do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), no período de fevereiro de 2013 a janeiro de 2015. Todos os pacientes preenchem os critérios de Nova Iorque modificados para espondilite anquilosante (van der Linden *et al.*, 1984). Cinquenta e nove homens saudáveis, pareados pela idade e índice de massa corporal (IMC), que trabalhavam na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo ou seus familiares foram incluídos como grupo controle.

Critérios de inclusão utilizados:

- Para o grupo de pacientes com EA e para o grupo controle:
  - Sexo masculino.
  - Idade máxima de 55 anos.
- Para o grupo controle:
  - Ausência de doenças osteometabólicas.
  - Diagnóstico de osteoporose.

Critérios de exclusão utilizado:

- Para pacientes e controles:

- uso de drogas que poderiam ter efeito no metabolismo ósseo: bisfosfonatos, teriparatida, anticonvulsivantes, anticoagulantes, exceto drogas para tratamento da EA.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Local em Pesquisa Humana da Universidade de São Paulo (CAPPesq) sob o número 0061/11 (Anexo A). Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido de acordo com a Declaração de Helsinque (Anexos B e C).

Características individuais como idade, etnia, peso, altura foram coletados no dia dos exames e o índice de massa corporal foi calculado para todos os participantes. Foi aplicado um questionário para fatores de risco para osteoporose (história pessoal de fratura, hora/semana de exercício físico, tabagismo atual, consumo de álcool) nos dois grupos.

### **3.2 Parâmetros Clínicos**

Dados clínicos como duração de doença, índices de atividade de doença [*Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI)*], atividade funcional [*Bath Ankylosing Spondylitis Function Index (BASFI)*], metrologia [*Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index (BASMI)*], qualidade de vida [*Ankylosing Spondylitis quality of life questionnaire (ASQoL)*] foram registrados (Sieper *et al.*, 2009). Além dos parâmetros clínicos, foram avaliados no momento da consulta ambulatorial, as medicações utilizadas na época dos ensaios *in vitro* (anti-inflamatório não-hormonal, inibidor de TNF $\alpha$  (iTNF $\alpha$ ), DMARDS [sulfassalazina, metotrexate] e glicocorticoide). Foi avaliado, também, escore de atividade de doença ASDAS-PCR, conforme recomendado previamente (Machado *et al.*, 2011).

A pesquisa da presença do antígeno HLA-B27 foi realizada pelo método da citometria de fluxo, utilizando os anticorpos monoclonais anti-HLA-B27 ligado à fluoresceína e a análise foi feita no citômetro de fluxo FACScan (Becton-Dickinson).

### **3.3 Avaliação Radiológica**

Todos os pacientes realizaram radiografias laterais da coluna cervical e lombar e a análise radiográfica foi feita por um reumatologista experiente com a aplicação do escore *modified Stoke Ankylosing Spondylitis Spine Score* (mSASSS). O sistema de pontuação, desenvolvido por Creemers *et al.* (2005), foi aplicado da borda inferior da 12<sup>a</sup> vértebra torácica, em todas as cinco vértebras lombares até a borda superior da 1<sup>a</sup> vértebra sacral; e da borda inferior da 2<sup>a</sup> vértebra cervical até a borda superior da 1<sup>a</sup> vértebra torácica. Utilizou-se o seguinte sistema de pontuação: 0 = sem anormalidade; 1 = erosão, esclerose ou quadratura; 2 = sindesmófito; e 3 = ponte óssea total em cada local.

### **3.4 Densidade Mineral Óssea**

A densidade mineral óssea (DMO) da coluna lombar, colo femoral e quadril total foram medidas usando absorciometria por dupla emissão de raios-X (DXA) (Hologic Inc., Bedford, MA, USA). O erro de precisão para medições da DMO foi determinado por protocolos ISCD padrão.

### 3.5 Cultura de Células

Amostras de sangue (100 mL) foram coletadas e as células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram isoladas por densidade de Ficoll e sedimentação de dextrano. As PBMCs foram plaqueadas a  $1,5 \times 10^6$  células/cm<sup>2</sup> em placas de 48 poços. As células foram mantidas em meio de cultivo ( $\alpha$ -MEM) da Sigma-Aldrich, Inc. (St Louis, MO, EUA) suplementado com 10% de SFB da HyClone Laboratories, Inc. (Logan, Utah, EUA), 1% de penicilina-estreptomicina de Sigma-Aldrich, Inc. (St Louis, MO, EUA), 50 ng/mL de RANKL [proteína recombinante produzida como descrito (Manolson *et al.*, 2003)] e 10 ng/mL de M-CSF da Peprotech, Inc. (Rocky Hill, NJ, EUA). As células foram mantidas em incubadora de CO<sub>2</sub> a 37 °C durante 21 dias com trocas regulares do meio em intervalos de 3-4 dias (Durand *et al.*, 2011; Durand *et al.*, 2013).

### 3.6 Quantificação de precursores de osteoclastos (CD16 e CD14)

As células mononucleares foram marcadas com anticorpos monoclonais para CD16 e CD14, e analisadas por citometria de fluxo (FACScan, Becton Dickinson, Mississauga, Canadá).

As células mononucleares ( $1 \times 10^6$  células) foram incubadas à temperatura ambiente durante 30 minutos com dois anticorpos: 10  $\mu$ L de anticorpo monoclonal anti-CD14 conjugado com FITC e 5  $\mu$ L de anticorpo monoclonal anti-CD16 humano conjugado com PE (BD Biosciences, Mississauga, Canadá). Após lavagem com solução salina tamponada com fosfato (PBS), as células foram analisadas por citometria de fluxo. Os dados foram analisados utilizando o programa CellQuest (Becton Dickinson, Mississauga, Canadá) (Durand *et al.*, 2011; Durand *et al.*, 2013).

### 3.7 Ensaio de Diferenciação

Após 21 dias mantidas em placas de 48 poços (2 poços/paciente ou controle), as células foram lavadas com PBS e coradas para atividade de fosfatase ácida tartarato resistente (TRAP) (Sigma-Aldrich, Inc., St Louis, EUA). As células multinucleadas ( $\geq 3$  núcleos) TRAP-positivas foram consideradas como osteoclastos maduros. Os resultados estão expressos como número de osteoclastos por poço (Durand *et al.*, 2011; Durand *et al.*, 2013).

### 3.8 Apoptose dos Osteoclastos

A apoptose dos osteoclastos foi determinada como descrito anteriormente (Durand *et al.*, 2011; Durand *et al.*, 2013). Resumidamente, após 21 dias de diferenciação, as células foram mantidas durante 24 horas sem M-CSF e RANKL em  $\alpha$ -MEM com SFB a 5%. As células foram então fixadas, permeabilizadas e marcadas utilizando um kit de detecção de apoptose TACS TdT Blue Label *in situ* (R&D Systems, Minneapolis, EUA) e contra coradas com “fast red”. Os osteoclastos foram identificados com base na multinuclearidade. Os critérios para a apoptose incluíram a presença de três ou mais núcleos marcados em azul demonstrando fragmentação nuclear. Um total de 100 osteoclastos foi examinado em cada amostra.

### **3.9 Avaliação Laboratorial de Marcadores Bioquímicos do Metabolismo Ósseo**

#### **3.9.1 Níveis séricos de OPG e sRANKL**

Amostras de sangue de todos os indivíduos participantes foram coletadas em jejum no mesmo dia da consulta e início dos ensaios *in vitro* e armazenadas a -80 °C e somente descongeladas no momento dos ensaios.

Os níveis séricos de OPG, que utiliza um anticorpo monoclonal anti-OPG para capturar OPG a partir do soro e os níveis séricos de sRANKL não complexado (livre), que utiliza um anticorpo policlonal anti-RANKL, foram quantificados por kit de ELISA (Biomedica, Viena, Áustria) de acordo com as instruções do fabricante (Spelling *et al.*, 2008). Os coeficientes de variação (CVs) interensaio e intraensaio foram de 6,5% e 2,6% para OPG; 6,9% e 4,8% para sRANKL, respectivamente. Todos os testes foram realizados em duplicata. O limite de detecção estabelecido pelo fabricante foi de 0,14 pmol/L para OPG e 0,02 pmol/L para sRANKL. A medida da absorbância foi realizada em equipamento Awareness Technology Inc, modelo Stat Fax 3200, a 450 nm (FL, USA).

#### **3.9.2 Níveis séricos de CTX e P1NP**

Amostras de sangue de todos os indivíduos participantes foram coletadas em jejum no dia da realização da consulta/ensaios *in vitro* e armazenados a -80 °C e somente descongeladas no momento dos ensaios. As concentrações séricas do marcador de formação óssea, P1NP e do marcador de reabsorção óssea, CTX foram determinadas por um sistema

automatizado de eletroquimioluminescência da Roche (E411, Roche Diagnostics<sup>®</sup>, Mannheim, Germany). O coeficiente de variação para P1NP foi 2,2% e para CTX foi 2,5% (Seguro *et al.*, 2015).

### 3.9.3 Citocinas e marcadores inflamatórios

As concentrações séricas de IL6, IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  foram quantificadas utilizando painel de esferas magnéticas humanas do Milliplex<sup>®</sup> Map Kit (N<sup>o</sup> de catálogo HBNMAG-51K, Billerica, MA), de acordo com as instruções do fabricante. As placas foram executadas em equipamento Luminex<sup>®</sup> 200TM-xMAP<sup>®</sup> Technology e os dados capturados utilizando o software Luminex xPONENT<sup>®</sup>. A análise da intensidade fluorescente mediana da citocina/quimiocina (IMF) foi realizada utilizando o programa Milliplex<sup>®</sup> Analyst (v.5.1). O coeficiente de variação interensaio para todas as citocinas testadas foi de 11,93%. Os níveis séricos de IL17 foram determinados utilizando kit de ELISA de alta sensibilidade [eBioscience (Viena, Austria)] e o coeficiente de variação foi de 3,6% (He *et al.*, 2017).

A atividade inflamatória laboratorial foi determinada pela dosagem de proteína C reativa (PCR). Este exame foi realizado no laboratório central do HC-FMUSP na semana anterior ao início dos ensaios *in vitro*, seguindo a rotina de agendamento dos pacientes.



### 3.10 Análise Estatística

Os resultados são expressos como a média  $\pm$  desvio padrão (DP) para as variáveis contínuas ou porcentagens para as variáveis categóricas. Os dados de pacientes com EA foram comparados com dados de controles saudáveis (CT) usando teste t-student (distribuição normal) ou teste de Mann Whitney (distribuição não normal) para variáveis contínuas e teste de qui-quadrado ou Fisher para variáveis categóricas. O número de osteoclastos foi correlacionado (coeficiente de Spearman) com parâmetros clínicos e laboratoriais. Um modelo linear generalizado (MLG) com distribuição gama e função de ligação longa foi construído para identificar os fatores associados ao número de OCs no grupo EA. A análise incluiu tratamento [anti-inflamatórios não-hormonal (AINH) e inibidor do fator de necrose tumoral [iTNF $\alpha$ ]] e parâmetros clínicos. A significância estatística foi aceita em  $p < 0,05$ . As análises foram realizadas com o software SPSS versão 20.0 para Windows (McCulluch e Searle, 2001).

## **4 RESULTADOS**

#### 4.1 Pacientes e Controles

Não foram encontradas diferenças demográficas significativas entre o grupo de pacientes com EA e o grupo controle. Ambos os grupos apresentaram valores similares em relação à frequência de história pessoal de fratura, tabagismo ou consumo de álcool ( $p > 0,05$ ). A frequência de exercício físico foi menor nos pacientes com EA em relação aos controles saudáveis (40,0% vs. 57,6%,  $p = 0,037$ ) (Tabela 1).

**Tabela 1 - Características demográficas, antropométricas e fatores de risco relacionados à massa óssea de pacientes com EA e CT**

	Pacientes com EA n = 85	Controles saudáveis n = 59	p
Idade, anos (mín-máx)	42,6 ± 9,0 (19-55)	40,7 ± 10,0 (19-55)	0,23
Etnia branca, %	85,9	72,9	0,053
IMC, kg/m <sup>2</sup>	27,3 ± 4,4	27,1 ± 2,7	0,72
História de fratura, %	23,5	27,1	0,70
Exercício físico, h/semana	4,03 ± 2,12	5,11 ± 1,87	0,042
Fumante atual, %	14,1	8,5	0,30
Etilismo, > 3 U/dia	0	0	1,00

Valores expressos em média ± desvio padrão e porcentagem (%); IMC: índice de massa corporal.

A média de duração de doença dos pacientes com EA foi  $17,4 \pm 9,72$  anos. Setenta e sete por cento deles apresentava HLA-B27 positivo. Os parâmetros de avaliação clínica avaliados nos pacientes com EA foram:

BASDAI ( $2,73 \pm 1,87$ ), BASFI ( $3,68 \pm 2,52$ ), BASMI ( $3,47 \pm 2,40$ ), ASQoI ( $5,92 \pm 4,97$ ), ASDAS-PCR ( $2,14 \pm 0,95$ ). Quanto ao dano radiográfico avaliado pelo mSASSS, os pacientes apresentaram escore de  $27,0 \pm 17,8$ . No momento do estudo, os pacientes faziam uso de AINH (76,5%), prednisona (11,8%), DMARDS [metotrexate (4,7%), sulfassalazina (45,9%)] e inibidores de TNF $\alpha$  (43,5%) (Tabela 2).

**Tabela 2 - Características clínicas, parâmetros inflamatórios laboratoriais, mSASSS e tratamento em pacientes com EA**

Parâmetros	
Duração de doença, anos	17,4 $\pm$ 9,72
Artrite periférica, %	51,8
Dor articular, n	0,63 $\pm$ 1,55
Edema articular, n	0,22 $\pm$ 0,92
BASDAI	2,73 $\pm$ 1,87
BASFI	3,68 $\pm$ 2,52
BASMI	3,47 $\pm$ 2,40
ASQoI	5,92 $\pm$ 4,97
HLA-B27 positivo, %	76,9
PCR, mg/L	8,8 $\pm$ 11,17
ASDAS-PCR	2,14 $\pm$ 0,95
mSASSS	27,0 $\pm$ 17,8
Uso de AINH, %	76,5
Uso de glicocorticoide, %	11,8
Uso de metotrexate, %	4,7
Uso de sulfassalazina, %	45,9
Uso iTNF $\alpha$ , %	43,5

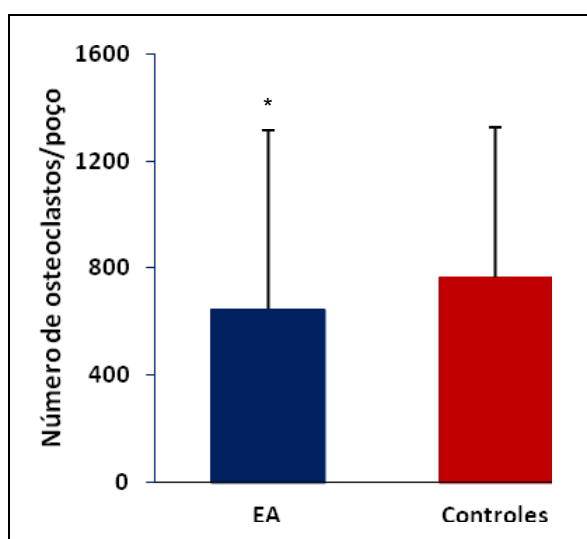
Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão e porcentagem (%); BASDAI: *bath ankylosing spondylitis disease activity index*; BASFI: *bath ankylosing spondylitis function index*. BASMI: *bath ankylosing spondylitis metrology index*; ASQoI: *ankylosing spondylitis quality of life questionnaire*; HLA: antígeno de leucócito humano; PCR: proteína C reativa; VHS: velocidade de hemossedimentação; ASDAS: *ankylosing spondylitis disease activity score*; mSASSS: *modified stoke ankylosing spondylitis spine score*; AINH: anti-inflamatório não-hormonal iTNF $\alpha$ : inibidor de fator de necrose tumoral alfa.

## 4.2 Dados associados a osteoclastogênese *in vitro* - pareamento entre pacientes com EA e controles saudáveis

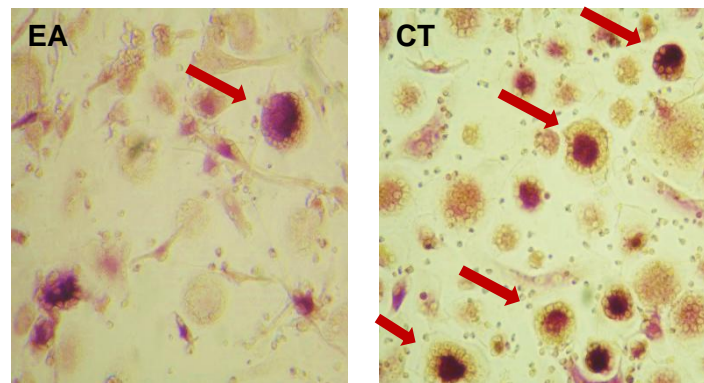
### 4.2.1 Osteoclastogênese *in vitro*

A capacidade para gerar osteoclastos *in vitro* a partir de PBMC foi significativamente menor nos pacientes com EA comparado ao grupo controle ( $647,7 \pm 669,4$  vs.  $764,4 \pm 561,9$  OC/poço;  $p = 0,014$ ) (Gráfico 1 e Figura 3). Os monócitos de pacientes com duração de doença igual ou superior a 15 anos apresentaram menor capacidade em gerar osteoclastos comparados àqueles pacientes com menor tempo de doença ( $< 15$  anos) ( $517,9 \pm 636,2$  vs.  $800,7 \pm 801,6$  OC/poço;  $p = 0,036$ ). Não houve diferença significativa no número de osteoclastos gerados associado a parâmetros inflamatórios e aos índices de atividade da doença avaliados nos pacientes com EA: ASDAS-PCR  $\geq 2,1$  e ASDAS-PCR  $< 2,1$  ( $622,2 \pm 723,0$  vs.  $677,5 \pm 624,5$  OC/poço;  $p = 0,65$ ); BASDAI  $\geq 4$  e BASDAI  $< 4$  ( $752,0 \pm 943,4$  vs.  $606,6 \pm 529,2$  OC/poço;  $p = 0,85$ ).

**Gráfico 1 - Número de osteoclastos gerados a partir de células mononucleares do sangue periférico ( $1 \times 10^6$  células) de pacientes com EA e CT, após 21 dias em cultura**



\*  $p < 0,05$



**Figura 3 - Fotomicrografia de células TRAP positivas (osteoclastos) de pacientes com EA e CT após 21 dias em cultura**

Os dados não mostraram qualquer diferença no número de osteoclastos gerados a partir de PBMC de pacientes tratados com AINH (sem terapia de iTNF $\alpha$ ) no momento do estudo ( $723,35 \pm 792,3$  OC/poço,  $n = 40$ ) comparado com o número de osteoclastos gerados pelos controles saudáveis ( $764,43 \pm 561,9$  OC/poço) ( $p = 0,10$ ). No entanto, a osteoclastogênese demonstrou-se menor nos pacientes com EA que faziam uso de iTNF $\alpha$  (sem terapia de AINH) no momento do estudo ( $582,51 \pm 717,56$  OC/poço,  $n = 12$ ) comparados aos controles ( $764,43 \pm 561,9$  OC/poço) ( $p = 0,047$ ). (Tabela 3). Somente 12% dos pacientes fazia uso de glicocorticoide ( $\leq 5$  mg). Excluindo estes pacientes em uma análise posterior, observou-se que a porcentagem de CD16 ( $p = 0,028$ ) e o número de osteoclastos gerados permanecia menor no grupo de pacientes comparado ao grupo controle ( $p = 0,022$ ).

**Tabela 3 - Ensaio de osteoclastogênese *in vitro* (número de osteoclastos, porcentagem de precursores de osteoclastos, apoptose), níveis séricos de marcadores de turnover ósseo, citocinas pró-inflamatórias e dados de DMO de pacientes em terapia de inibidor de TNF $\alpha$  (sem uso de AINH), de pacientes em uso de AINH (sem terapia de iTNF $\alpha$ ) comparados com o grupo controle**

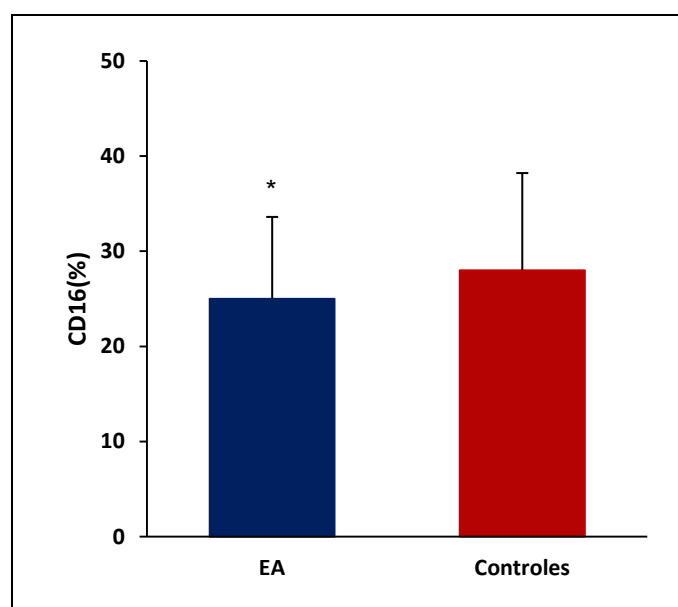
	EA em terapia de iTNF $\alpha$ n = 12	EA em uso de AINH n = 40	EA em terapia de iTNF vs. EA em uso de AINH p	Controles n = 59	EA em terapia de iTNF vs. CT p	EA em uso de AINH vs. CT p
Número de osteoclastos/poço	582,51 $\pm$ 717,56	723,35 $\pm$ 792,3	0,43	764,43 $\pm$ 561,9	<b>0,048</b>	0,10
<i>Precursores de osteoclastos (%)</i>						
CD16+	29,87 $\pm$ 10,17	24,63 $\pm$ 8,01	0,07	28,59 $\pm$ 10,20	0,70	0,07
CD14+	10,47 $\pm$ 5,6	10,97 $\pm$ 7,18	0,82	10,58 $\pm$ 6,31	0,99	0,81
Apoptose, %	11,0 $\pm$ 8,94	35,65 $\pm$ 31,28	<b>0,011</b>	44,53 $\pm$ 34,3	<b>&lt; 0,001</b>	0,17
RANKL, pmol/L	0,152 $\pm$ 0,091	0,205 $\pm$ 0,118	0,16	0,227 $\pm$ 0,128	0,06	0,40
OPG, pmol/L	4,63 $\pm$ 1,74	5,72 $\pm$ 4,09	0,53	4,34 $\pm$ 1,52	0,58	0,12
RANKL/OPG	0,040 $\pm$ 0,030	0,045 $\pm$ 0,031	0,70	0,068 $\pm$ 0,071	0,15	0,07
CTX, ng/mL	0,494 $\pm$ 0,141	0,428 $\pm$ 0,168	0,13	0,471 $\pm$ 0,197	0,70	0,34
P1NP, ng/mL	72,93 $\pm$ 48,06	58,30 $\pm$ 21,24	0,34	48,39 $\pm$ 16,92	<b>0,008</b>	<b>0,019</b>
CTX/P1NP	0,008 $\pm$ 0,002	0,008 $\pm$ 0,003	0,53	0,100 $\pm$ 0,003	<b>0,019</b>	<b>&lt; 0,001</b>
IL6, pg/mL	1,45 $\pm$ 3,10	4,36 $\pm$ 5,50	0,09	1,25 $\pm$ 1,72	0,10	<b>&lt; 0,001</b>
IL1, pg/mL	0,195 $\pm$ 0,098	0,34 $\pm$ 0,84	0,69	0,178 $\pm$ 0,119	0,46	<b>0,049</b>
IL17, pg/mL	2,30 $\pm$ 4,27	2,42 $\pm$ 4,25	0,92	1,49 $\pm$ 2,65	0,73	0,44
<i>DMO</i>						
L1-L4, g/cm <sup>2</sup>	1,186 $\pm$ 0,206	1,085 $\pm$ 0,220	0,17	1,041 $\pm$ 0,117	<b>0,019</b>	0,50
Colo de fêmur, g/cm <sup>2</sup>	0,835 $\pm$ 0,110	0,813 $\pm$ 0,122	0,64	0,875 $\pm$ 0,125	0,37	<b>0,021</b>
Fêmur total, g/cm <sup>2</sup>	0,964 $\pm$ 0,123	0,936 $\pm$ 0,125	0,55	1,003 $\pm$ 0,114	0,36	<b>0,009</b>

Valores são expressos em média  $\pm$  desvio padrão e porcentagem (%); significância: p < 0,05; TNF: fator de necrose tumoral; AINH: anti-inflamatório não-hormonal; RANKL: ligante do receptor ativador de fator nuclear kB; OPG: osteoprotegerina; CTX: Telo-peptídeo C-terminal do colágeno tipo I; P1NP: Propeptídeo N-terminal do colágeno tipo I; IL: interleucina; DMO: densidade mineral óssea.

#### 4.2.2 Precusores de osteoclastos circulantes

Foi observada uma menor porcentagem de células mononucleares CD16+ no grupo de pacientes com EA do que aquelas do grupo controle ( $25,06 \pm 8,59$  vs.  $28,59 \pm 10,20$ ,  $p = 0,026$ ) (Gráfico 2). Não foi observada diferença quanto à porcentagem de células CD14 positivas nas preparações de PBMCs entre pacientes com EA e controles saudáveis ( $p > 0,05$ ) (Tabela 4).

**Gráfico 2 - Porcentagem de monócitos expressando antígeno de superfície CD16 em pacientes com EA e CT**



\* $p < 0,05$

Quanto ao tratamento terapêutico no momento das avaliações, não foi observada significância estatística quanto a porcentagem de células mononucleares CD16 positivas entre pacientes com EA que faziam uso de AINH (sem a terapêutica de  $iTNF\alpha$ ) ( $24,63 \pm 8,01$ ) e o grupo controle ( $28,6 \pm 10,20$ ),  $p = 0,08$ . Similarmente, não foi encontrada diferença estatística quanto à porcentagem de células mononucleares CD16+ entre pacientes com terapia de  $iTNF\alpha$  (sem uso de AINH) e controles saudáveis ( $p > 0,05$ ) (Tabela 3).



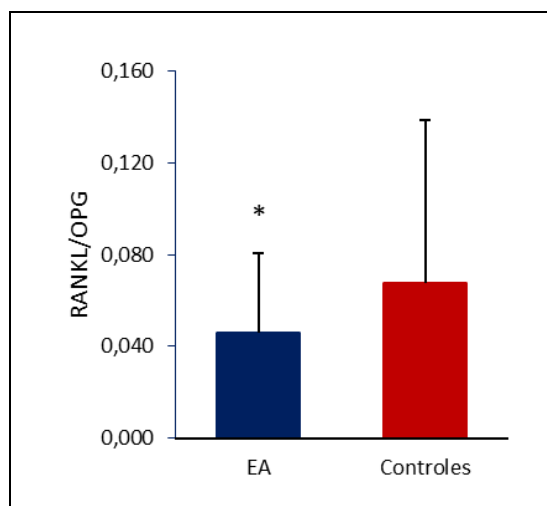
### 4.2.3 Níveis séricos de RANKL/OPG

A análise dos níveis séricos de RANKL e OPG demonstrou uma menor relação RANKL/OPG em pacientes com EA comparado ao grupo controle ( $0,05 \pm 0,03$  vs.  $0,07 \pm 0,07$ ,  $p = 0,046$ ) (Gráfico 3), no entanto, os níveis séricos de RANKL ( $0,19 \pm 0,11$  vs.  $0,23 \pm 0,13$  pmol/L;  $p = 0,07$ ) e OPG ( $5,20 \pm 3,18$  vs.  $4,34 \pm 1,52$  pmol/L,  $p = 0,20$ ) analisados independentemente, foram semelhantes nos dois grupos (Tabela 4).

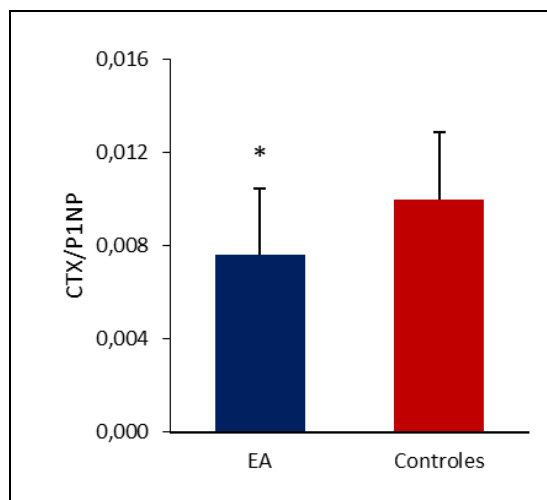
### 4.2.4 Níveis séricos de CTX e P1NP

A análise dos níveis séricos de CTX e P1NP demonstrou uma menor relação CTX/P1NP em pacientes com EA comparados aos controles saudáveis ( $0,008 \pm 0,003$  vs.  $0,010 \pm 0,003$ ,  $p < 0,001$ ) (Gráfico 4), entretanto, nenhuma diferença foi observada nos níveis séricos de CTX analisados entre pacientes e controle ( $p > 0,05$ ) (Tabela 4). Os valores de P1NP foram maiores nos pacientes com EA comparados com os controles saudáveis ( $62,77 \pm 34,71$  vs.  $48,39 \pm 16,92$  ng/mL,  $p = 0,004$ ).

**Gráfico 3 - Razão do RANKL e OPG em pacientes com EA e CT**



\*  $p < 0,05$

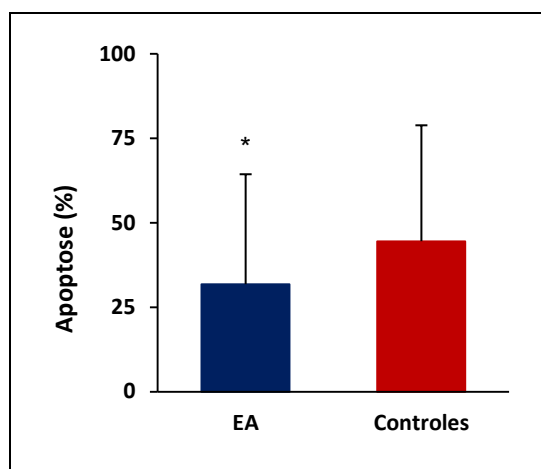
**Gráfico 4 - Razão do CTX e P1NP em pacientes com EA e CT**

\*  $p < 0,05$

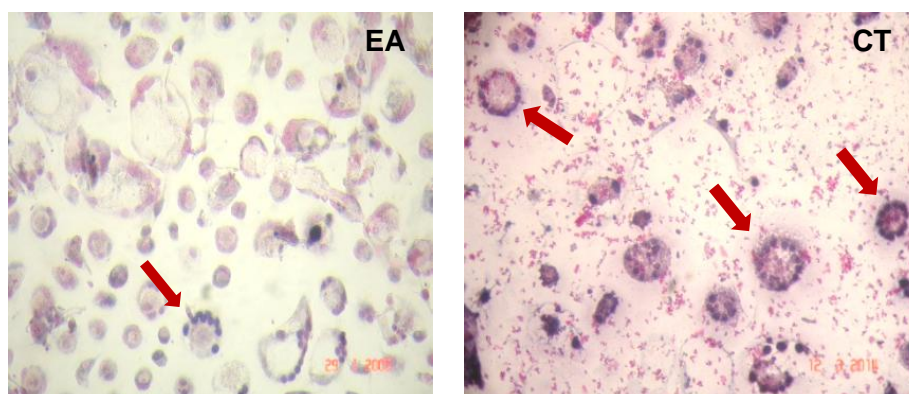
#### 4.2.5 Apoptose

O Gráfico 5 e a Figura 4 ilustram significativamente a menor porcentagem de osteoclastos em apoptose nos pacientes com EA comparada ao grupo controle, respectivamente ( $31,8 \pm 32,5$  vs.  $44,5 \pm 34,3$ ,  $p = 0,007$ ) (Tabela 4). Não foi encontrada qualquer associação na porcentagem de osteoclastos em apoptose entre os pacientes com EA em uso de AINH (sem terapia de  $iTNF\alpha$ ) e o grupo controle ( $35,65 \pm 31,28$  vs.  $44,53 \pm 34,3$ ,  $p = 0,17$ ). Os osteoclastos de pacientes com EA que recebiam terapia com  $iTNF\alpha$  (sem uso de AINH) sofreram menos apoptose comparados aos osteoclastos do grupo controle ( $11 \pm 8,94$  vs.  $44,53 \pm 34,3$ ,  $p < 0,001$ ) (Tabela 3).

**Gráfico 5 - Porcentagem de osteoclastos em apoptose em pacientes com EA e CT**



\*  $p < 0,05$



**Figura 4 - Fotomicrografia de osteoclasto em apoptose. Osteoclastos diferenciados a partir de células mononucleares de sangue periférico de pacientes com EA e CT. Setas indicam osteoclastos em apoptose**

#### **4.2.6 Níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias**

A análise das citocinas pró-inflamatórias demonstrou que os níveis séricos de IL-6 apresentaram maiores valores nos pacientes com EA comparados com os controles ( $2,95 \pm 4,3$  vs.  $1,25 \pm 1,72$  pg/mL,  $p = 0,002$ ). Não foi observada qualquer diferença estatisticamente significativa em relação aos níveis séricos das citocinas inflamatórias circulantes (IL-17, IL- $1\beta$  e TNF $\alpha$ ) entre os pacientes com EA e o grupo controle: IL-17 ( $2,41 \pm 4,0$

vs.  $1,49 \pm 2,65$  pg/mL,  $p = 0,21$ ), IL1 $\beta$  ( $0,27 \pm 0,58$  vs.  $0,18 \pm 0,12$  pg/mL,  $p = 0,11$ ), TNF $\alpha$  ( $2,04 \pm 2,11$  vs.  $1,69 \pm 0,57$  pg/mL,  $p = 0,49$ ). A frequência de amostras de pacientes e controles que alcançaram o limite de detecção na determinação dos níveis de IL-17 foram 85% e 75%, respectivamente (Tabela 4). A média (DP) de PCR encontrada foi de  $8,8 \pm 11,2$  mg/L.

#### 4.2.7 Densidade mineral óssea

Em relação à densidade mineral óssea, pacientes com EA apresentaram maiores valores de DMO da coluna lombar comparados com controles saudáveis ( $1,104 \pm 0,206$  vs.  $1,041 \pm 0,117$  g/cm<sup>2</sup>,  $p = 0,023$ ), mas a DMO do fêmur total apresentou valores menores nos pacientes com EA do que no grupo controle ( $0,951 \pm 0,130$  vs.  $1,003 \pm 0,114$  g/cm<sup>2</sup>,  $p = 0,017$ ) (Tabela 4).

Não houve diferença significativa na DMO de coluna lombar entre pacientes com EA em uso de AINH (sem terapia com iTNF $\alpha$ ) comparada aos controles saudáveis ( $1,085 \pm 0,220$  vs.  $1,041 \pm 0,117$  g/cm<sup>2</sup>,  $p = 0,50$ ). Entretanto, foi encontrada uma diferença significativamente maior na DMO da coluna lombar dos pacientes em uso de iTNF $\alpha$  (sem terapia de AINH) comparada a DMO dos controles saudáveis ( $1,186 \pm 0,206$  vs.  $1,041 \pm 0,117$  g/cm<sup>2</sup>,  $p = 0,019$ ). As idades entre os grupos de pacientes em uso de AINH (sem terapia de iTNF $\alpha$ ) e controles saudáveis eram similares ( $43,62 \pm 8,53$  vs.  $40,73 \pm 10,0$  anos,  $p = 0,14$ ). Da mesma maneira, não houve diferença na média de idade entre os pacientes com EA em terapia de iTNF $\alpha$  (sem o uso de AINH) comparado com o grupo controle ( $43,83 \pm 11,08$  vs.  $40,73 \pm 10,0$  anos,  $p = 0,38$ ) (Tabela 3).

**Tabela 4 - Valores dos marcadores do metabolismo ósseo (RANKL, OPG, CTX e P1NP), citocinas e da DMO dos pacientes com EA e CT**

	Pacientes com EA n = 85	Controles saudáveis n = 59	p
RANKL, pmol/L	0,189 ± 0,109	0,227 ± 0,128	0,082
OPG, pmol/L	5,19 ± 3,18	4,33 ± 1,52	0,200
RANKL/OPG	0,046 ± 0,035	0,068 ± 0,071	<b>0,030</b>
CTX, ng/mL	0,46 ± 0,28	0,47 ± 0,20	0,827
P1NP, ng/mL	62,77 ± 34,71	48,39 ± 16,92	<b>0,004</b>
CTX/P1NP	0,008 ± 0,003	0,010 ± 0,003	<b>&lt; 0,001</b>
IL6, pg/mL	2,95 ± 4,3	1,25 ± 1,72	<b>0,002</b>
IL1β, pg/mL	0,27 ± 0,58	0,18 ± 0,12	0,109
IL17, pg/mL	2,41 ± 4,0	1,49 ± 2,65	0,208
TNFα, pg/mL	2,04 ± 2,11	1,69 ± 0,57	0,487
<i>DMO</i>			
L1-L4, g/cm <sup>2</sup>	1,104 ± 0,206	1,041 ± 0,117	<b>0,023</b>
Colo de fêmur, g/cm <sup>2</sup>	0,837 ± 0,145	0,875 ± 0,125	0,120
Fêmur total, g/cm <sup>2</sup>	0,951 ± 0,130	1,003 ± 0,114	<b>0,017</b>

Valores são expressos em média ± desvio padrão e porcentagem (%). Significância:  $p < 0,05$ ; RANKL: ligante do receptor ativador do fator nuclear kB; OPG: osteoprotegerina; CTX: telopeptídeo C-terminal do colágeno tipo I; P1NP: propeptídeo N-terminal do procolágeno tipo I; IL: interleucina; DMO: densidade mineral óssea.

### 4.3 Osteoclastogênese e parâmetros de doença em pacientes com EA

Foi encontrada correlação negativa entre o número de osteoclastos e o tempo de duração da doença ( $r = -0,220$ ,  $p = 0,043$ ). Não foram encontradas correlações com os dados laboratoriais, atividade da doença (BASDAI) ou índices funcionais (BASFI) ou mobilidade (BASMI) e mSASSS ( $p > 0,05$ ).

Um modelo linear generalizado com análise de distribuição gama (incluindo duração da doença e tratamento) demonstrou que a tempo de doença estava associado negativamente à osteoclastogênese de maneira independente: para cada ano de duração da doença, foi encontrado um decréscimo de 15,6% no número médio de osteoclastos ( $p < 0,001$ ) (Tabela 5).

**Tabela 5 - Modelo linear generalizado: número de osteoclastos associado à duração de doença e tratamentos com AINH e iTNF $\alpha$**

Parâmetros	Coeficiente	Erro padrão	95% intervalo de confiança		Chi-Quadrado	p
			Menor	Maior		
AINH	77,61	109,91	-137,799	293,025	0,50	0,48
iTNF $\alpha$	-75,20	103,00	-277,073	126,668	0,53	0,47
Duração de doença (anos)	-15,64	4,54	-24,546	-6,734	11,85	<b>0,001</b>

AINH: anti-inflamatório não-hormonal; iTNF $\alpha$ : inibidor de fator de necrose tumoral alfa

## **5 DISCUSSÃO**

O presente estudo demonstrou que PBMCs de pacientes com EA apresentam uma menor capacidade em gerar osteoclastos *in vitro* e uma menor porcentagem de células CD16+ do que aquelas PBMCs de controles saudáveis. Corroborando com uma menor atividade osteoclástica, observou-se também uma menor razão RANKL/OPG e menor razão CTX/P1NP em pacientes com EA comparados com os controles. Adicionalmente, o número de osteoclastos gerados a partir de PBMCs de pacientes com EA correlacionou-se negativamente com a duração da doença, demonstrando a relevância do estudo dos osteoclastos na espondilite anquilosante.

Algumas vantagens importantes do presente estudo estão associadas aos critérios de inclusão quanto ao gênero e idade, evitando fatores de confusão, uma vez que pacientes com EA podem apresentar características clínicas e de gravidade de doença diferentes em relação a estas duas características (Webers *et al.*, 2016). As mulheres não foram incluídas devido ao papel dos hormônios esteroides sexuais na reabsorção óssea, evitando-se fatores confusionais nesta análise. Foram também excluídos pacientes do sexo masculino com faixa etária acima de 56 anos, pois poderiam apresentar comprometimento ósseo em coluna associado à presença de osteófitos (Dubost e Sauvezie, 1989).



Pacientes e controles também foram pareados em relação à idade e índice de massa corporal, fatores reconhecidamente associados ao metabolismo ósseo. Os dados em relação à obesidade são controversos; além do efeito positivo do sobrepeso na massa óssea, estudos associam esta comorbidade a um efeito negativo resultante do aumento da reabsorção óssea em função das citocinas inflamatórias (Cao, 2011).

A capacidade de células mononucleares do sangue periférico gerar osteoclastos na espondilite anquilosante foi avaliada em poucos estudos, no entanto, os resultados são conflitantes e os mecanismos envolvidos neste processo nesta doença não estão bem esclarecidos (Im *et al.*, 2009; Colina *et al.*, 2013; Perpétuo *et al.*, 2015; Perpétuo *et al.*, 2017). Segundo estudo de Im *et al.* (2009) PBMCs de pacientes com EA apresentaram uma maior capacidade em gerar osteoclastos comparados ao grupo controle e estes autores associaram estes parâmetros à anquilose radiográfica da articulação sacroilíaca, mas não à atividade da doença ou a parâmetros de inflamação sistêmica. Deve-se considerar que, nesse estudo, uma amostra pequena de pacientes foi avaliada. Dois outros estudos que avaliaram a osteoclastogênese na EA demonstraram uma menor diferenciação de osteoclastos em pacientes com EA comparada a controles (Perpétuo *et al.*, 2015; Perpétuo *et al.*, 2017). O estudo de Perpétuo *et al.* (2015), também avaliou longitudinalmente a osteoclastogênese em pacientes com espondilite anquilosante em uso de iTNF $\alpha$  e, contrariamente aos achados do presente estudo, demonstrou que monócitos de pacientes com EA após 6 meses de uso de iTNF $\alpha$  apresentavam uma maior capacidade em gerar osteoclastos.

Diferentemente, os resultados do presente estudo demonstraram que a menor capacidade em gerar osteoclastos *in vitro* em pacientes com EA esteve associada ao uso de  $iTNF\alpha$  e não ao uso de DMARDs ou AINH, a índices de atividade da doença, parâmetros inflamatórios ou danos radiográficos.

Interessantemente, o estudo de Colina, em 2013, foi o único que demonstrou resultados associados a apoptose de osteoclastos em EA e similarmente, aos achados desse estudo observou-se, também, uma menor taxa de osteoclastos de pacientes com EA em apoptose comparada com indivíduos saudáveis. Colina *et al.* (2013) associaram este fato a uma expressão elevada de proteínas relacionadas a apoptose, Bcl-xL e Survivin, no entanto, sugere-se que esta característica poderia ser decorrente da diminuição primária na osteoclastogênese e precursores de osteoclastos, como um mecanismo compensatório em função da exaustão destas células em relação a neoformação óssea.

A menor porcentagem de células precursoras de osteoclastos (células CD16 positivas) nos pacientes com EA observada no estudo de Perpétuo *et al.* (2017), corrobora com os achados do presente estudo, que revelaram uma menor diferenciação de osteoclastos, limitando o *homing* de precursores para a superfície óssea, com conseqüente diminuição da reabsorção óssea favorecendo a formação óssea. Surdarcki *et al.* (2014) observaram que pacientes com EA em uso de AINH apresentavam menor porcentagem de monócitos não clássicos (CD16+) no sangue periférico quando comparados a controles saudáveis, ao contrário do observado em

outras doenças reumatológicas. De fato, na artrite reumatoide e artrite psoriásica, condições em que predomina dano ósseo erosivo, foi observada maior porcentagem de precursores CD14+ e CD16+, respectivamente (Chiu *et al.*, 2010; Durand *et al.*, 2011; Rossol *et al.*, 2012).

A menor razão RANKL/OPG observada no presente estudo em pacientes com EA sugere que os mesmos apresentam uma menor reabsorção óssea. Estudos prévios demonstraram resultados controversos em relação aos níveis séricos de RANKL, OPG e suas razões na espondilite anquilosante (Chen *et al.*, 2010; Perpétuo *et al.*, 2015; Perpétuo *et al.*, 2017). Adicionalmente, a menor relação entre CTX/P1NP observada no presente estudo reforça a hipótese do desequilíbrio ósseo nestes pacientes, corroborando com a ideia do esgotamento da atividade dos osteoclastos.

Uma possível interpretação para uma menor reabsorção óssea encontrada nos pacientes deste estudo pode estar associada ao longo tempo de doença (mais de 10 anos) encontrada em 75% destes pacientes (Goh *et al.*, 2008). De fato, os dados do presente estudo vão de acordo com a escassa literatura, que demonstrou que monócitos de pacientes com EA com longa duração da doença apresentavam menor capacidade osteoclastogênica (Colina *et al.*, 2013; Perpétuo *et al.*, 2015). Estes dados sugerem um desacoplamento entre osteoclastos e osteoblastos possivelmente em decorrência de um processo de remodelamento ósseo exausto, marcado inicialmente por neoformação excessiva. É importante ressaltar, que mesmo com um longo tempo de doença, maiores níveis séricos de IL6 foram observados nestes pacientes, indicando ainda um processo inflamatório persistente.

Curiosamente, as PBMCs dos pacientes com EA que faziam uso de AINH (sem terapia de iTNF $\alpha$ ) não apresentaram uma diminuição na osteoclastogênese *in vitro*, diferente das PBMCs de pacientes com terapia de iTNF $\alpha$  (sem uso de AINH) que revelaram uma menor capacidade em gerar osteoclastos quando comparadas com as do grupo controle. Os anti-inflamatórios não-hormonais atuam no metabolismo ósseo pela inibição das enzimas COX, reduzindo a síntese de prostaglandinas que são reguladoras multifuncionais do metabolismo ósseo (Salari e Abdollahi, 2009; Blackwell *et al.*, 2010). Estudos prévios, demonstraram que celecoxibe e diclofenaco podem reduzir a osteoclastogênese *in vitro* (Kellinsalmi *et al.*, 2007; Krischak *et al.*, 2007; Kawashima *et al.*, 2009; Karakawa *et al.*, 2009), assim como em modelos de artrite murina *in vivo* (Jimi *et al.*, 2004). No entanto, estudos com osteoclastos humanos não confirmaram esses efeitos dos inibidores da ciclooxigenase (Kotake *et al.*, 2010) e além disso, o uso de AINH tem demonstrado efeito inibitório na cicatrização óssea após procedimento cirúrgico, pois a prostaglandina E2 seria também uma potente agonista dos osteoclastos e estimularia a reabsorção óssea (Chen e Dragoo, 2013) associado a este efeito catabólico.

Conforme esperado, no presente estudo os pacientes com EA comparados com controles saudáveis, demonstraram uma maior densidade mineral óssea na coluna lombar e não na região de fêmur. Este achado sugere que o aumento da massa óssea na coluna, poderia ser secundário à presença de sindesmófitos ou também em decorrência de fratura nesta região, representando uma interpretação errônea da DMO medida pelo DXA

(Grazio *et al.*, 2012; Briot e Roux, 2015). A menor DMO na região de fêmur total nestes pacientes poderia estar associada a fatores como diminuída prática de atividade física e menor mobilidade dos membros inferiores (Sarikaya *et al.*, 2007).

Interessantemente, pacientes em uso de AINH (sem terapia de iTNF $\alpha$ ) apresentaram DMO de coluna lombar e valores de osteoclastos gerados similares ao grupo controle, sugerindo que os AINH poderiam contrabalançar o remodelamento ósseo, diminuindo a neoformação óssea nesses pacientes. Estes dados corroboram com evidências na literatura sobre o efeito do uso de AINH na redução da progressão radiográfica em pacientes com EA (Wanders *et al.*, 2005; Schett e Rudwaleit, 2010; Poddubnyy *et al.*, 2012).

A eficácia da terapia com iTNF $\alpha$  na melhora clínica na EA está bem documentada, no entanto a influência desta terapia na formação óssea e na progressão radiográfica na EA ainda é controversa (Baraliakos *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2013; Durnez *et al.*, 2013; Molnar *et al.*, 2018). No presente estudo, os pacientes em terapia com iTNF $\alpha$  (sem uso de AINH) apresentaram uma osteoclastogênese significativamente menor em relação ao grupo controle e uma maior DMO da coluna lombar. Estes achados encontram suporte em dados da literatura, sugerindo que a terapia com iTNF $\alpha$  poderia inibir a osteoclastogênese e também ter um impacto no reparo ósseo em pacientes com EA (van der Heijde *et al.*, 2009; Kang *et al.*, 2013; Durnez *et al.*, 2013). Perpétuo *et al.* (2015) observaram níveis diminuídos de CTX em pacientes em uso terapia com iTNF $\alpha$ , sugerindo uma menor atividade dos osteoclastos nesses pacientes.

No entanto, existem evidências na literatura demonstrando o efeito do uso a longo prazo da terapia com iTNF $\alpha$  na redução de formação de sindesmófitos e na diminuição na progressão radiográfica (Baraliakos *et al.*, 2014; Molnar *et al.*, 2018). Dessa forma, a influência da terapia com iTNF $\alpha$  na formação óssea e progressão radiográfica na EA ainda é controversa e avaliações longitudinais da osteoclastogênese em pacientes com EA são necessárias.

Desta maneira, os presentes achados demonstraram que monócitos de pacientes com espondilite anquilosante comparados com monócitos de controles saudáveis, apresentam uma baixa capacidade em diferenciar-se em osteoclastos, representando uma capacidade da reabsorção óssea diminuída nesta patologia.

## **6 CONCLUSÃO**

Em conclusão, estes resultados demonstraram que os monócitos de pacientes do sexo masculino com espondilite anquilosante apresentam menor capacidade de gerar osteoclastos em relação aos indivíduos controle e estes achados estão correlacionados com a maior duração da doença, reforçando a ideia de que os osteoclastos podem desempenhar um papel na fisiopatologia do reparo ósseo em pacientes com EA.



## **7 ANEXOS**

## Anexo A - Aprovação do Comitê de Ética Local em Pesquisa Humana da Universidade de São Paulo



### APROVAÇÃO

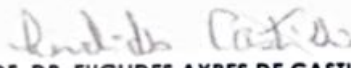
A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 08/06/2011, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0061/11**, intitulado: **"AVALIAÇÃO DO PAPEL DA OSTEOLASTOGÊNESE E ATIVAÇÃO DOS OSTEOLASTOS EM PACIENTES COM ESPONDILITE ANQUILOSANTE"**, apresentado pelo Departamento de **CLÍNICA MÉDICA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Profa. Dra. Rosa Maria Rodrigues Pereira**

Pesquisador (a) Executante: **Valéria de Falco Caparbo**

CAPPesq, 13 de Junho de 2011

  
**PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO**  
Coordenador  
Comissão de Ética para Análise de  
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

## Anexo B - Termo de Consentimento Informado Livre e Esclarecido do Grupo Controle

### HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

##### DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: .....
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: ..... SEXO: M  F
- DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
- ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....
- BAIRRO: ..... CIDADE .....
- CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....
2. RESPONSÁVEL LEGAL .....
- NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE:.....SEXO: M  F
- DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
- ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....
- BAIRRO: ..... CIDADE: .....
- CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....).....

##### DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **Avaliação do papel da osteoclastogênese e ativação dos osteoclastos em pacientes com Espondilite Anquilosante**
2. PESQUISADORES: Profa Dra. Rosa Maria Rodrigues Pereira
- CARGO/FUNÇÃO: Profa Associada
- INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 45920
- UNIDADE DO HCFMUSP: Reumatologia
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
- RISCO MÍNIMO  RISCO MÉDIO
- RISCO BAIXO  RISCO MAIOR
4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 3 anos

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável \_\_\_\_\_

Rubrica do pesquisador \_\_\_\_\_

1 – O objetivo deste estudo é avaliar como células do seu sangue (monócitos/macrófagos) que normalmente se transformam em células ósseas (osteoclastos) se comportam de acordo com a atividade e gravidade da sua doença reumatológica (Espondilite Anquilosante).

2 – Serão colhidos 100 ml de sangue para separação de células do seu sangue (monócitos) e destas células vamos extrair proteínas e RNA (um marcador genético), e você irá realizar exame de densitometria óssea para avaliação de massa óssea.

3 – Existem mínimos riscos para quem participa do estudo como sangramentos e hematomas no local da coleta de sangue e no exame de densitometria você receberá uma pequena dose de radiação.

4 – A partir dos resultados desta pesquisa poderemos tentar compreender melhor os mecanismos envolvidos no crescimento e perda de osso que ocorre na Espondilite Anquilosante.

5 – Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a **Profa. Dra Rosa Maria Rodrigues Pereira** que pode ser encontrada no endereço **Av. Dr. Arnaldo, 455 – 3º andar – sala 3105 - Cerqueira César - CEP: 01246-903, São Paulo-SP** Telefone(s) 11-3061-7213. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: [cappesq@hcnet.usp.br](mailto:cappesq@hcnet.usp.br)

6 – Você pode suspender a autorização a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

7 – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

8 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

9 – Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo, o participante tem direito a tratamento médico na Instituição.

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável \_\_\_\_\_

Rubrica do pesquisador \_\_\_\_\_



## Anexo C - Termo de Consentimento Informado Livre e Esclarecido dos Pacientes

<b>HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP</b>	
<b>TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO</b>	
<b>DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL</b>	
1.	NOME: ..... DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: ..... SEXO: M <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/> DATA NASCIMENTO: ...../...../..... ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: ..... BAIRRO: ..... CIDADE ..... CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....) .....
2.	<b>RESPONSÁVEL LEGAL</b> ..... NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) ..... DOCUMENTO DE IDENTIDADE: ..... SEXO: M <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/> DATA NASCIMENTO: ...../...../..... ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: ..... BAIRRO: ..... CIDADE: ..... CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....) .....
<b>DADOS SOBRE A PESQUISA</b>	
1.	<b>TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Avaliação do papel da osteoclastogênese e ativação dos osteoclastos em pacientes com Espondilite Anquilosante</b>
2.	<b>PESQUISADORES:</b> Profa Dra. Rosa Maria Rodrigues Pereira CARGO/FUNÇÃO: Profa Associada INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 45920 UNIDADE DO HCFMUSP: Reumatologia
3.	<b>AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:</b> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 10px;"> <div style="text-align: center;">RISCO MÍNIMO <input checked="" type="checkbox"/></div> <div style="text-align: center;">RISCO MÉDIO <input type="checkbox"/></div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 10px;"> <div style="text-align: center;">RISCO BAIXO <input type="checkbox"/></div> <div style="text-align: center;">RISCO MAIOR <input type="checkbox"/></div> </div>
4.	<b>DURAÇÃO DA PESQUISA:</b> 3 anos
Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____ Rubrica do pesquisador _____	

1 – O objetivo deste estudo é avaliar como células do seu sangue (monócitos/macrófagos) que normalmente se transformam em células ósseas (osteoclastos) se comportam de acordo com a atividade e gravidade da sua doença reumatológica (Espondilite Anquilosante).

2 – Serão colhidos 100 ml de sangue para separação de células do seu sangue (monócitos) e destas células vamos extrair proteínas e RNA (um marcador genético), e você irá realizar exame de densitometria óssea para avaliação de massa óssea.

3 – Serão aplicados questionários para avaliar atividade, função e dor da sua doença, raio x de coluna e ressonância magnética de coluna, procedimentos que você faz pela rotina.

4 – Existem mínimos riscos para quem participa do estudo como sangramentos e hematomas no local da coleta de sangue, e nos exames de raio x e densitometria você receberá uma pequena dose de radiação e na ressonância magnética que você poderá sentir incomodo de ficar dentro do aparelho.

5 – A partir dos resultados desta pesquisa poderemos tentar compreender melhor os mecanismos envolvidos no crescimento e perda de osso que ocorre na sua doença.

6 – Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a **Profa. Dra Rosa Maria Rodrigues Pereira** que pode ser encontrada no endereço **Av. Dr. Arnaldo, 455 – 3º andar – sala 3105 - Cerqueira César - CEP: 01246-903, São Paulo-SP** Telefone(s) 11-3061-7213. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: [cappesq@hcnet.usp.br](mailto:cappesq@hcnet.usp.br)

7 – Você pode suspender a autorização a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

8 – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

9 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

10 – Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo, o participante tem direito a tratamento médico na Instituição.

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável \_\_\_\_\_

Rubrica do pesquisador \_\_\_\_\_





## **8 REFERÊNCIAS**

Appel H, Kuhne M, Spiekermann S, Köhler D, Zacher J, Stein H, Sieper J, Loddenkemper C. Immunohistochemical analysis of hip arthritis in ankylosing spondylitis: evaluation of the bone-cartilage interface and subchondral bone marrow. *Arthritis Rheum.* 2006;54(6):1805-13.

Auffray C, Fogg D, Garfa M, Elain G, Join-Lambert O, Kayal S, Sarnacki S, Cumano A, Lauvau G, Geissmann F. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science.* 2007;317(5838):666-70.

Baraliakos X, Haibel H, Listing J, Sieper J, Braun J. Continuous long-term antiTNF therapy does not lead to an increase in the rate of new bone formation over 8 years in patients with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis.* 2014;73(4):710-5.

Baraliakos X, Listing J, Brandt J, Haibel H, Rudwaleit M, Sieper J, Braun J. Radiographic progression in patients with ankylosing spondylitis after 4 yrs of treatment with the anti-TNF-alpha antibody infliximab. *Rheumatology (Oxford).* 2007;46(9):1450-3.

Blackwell KA, Raisz LG, Pilbeam CC. Prostaglandins in bone: bad cop, good cop? *Trends Endocrinol Metab.* 2010;21(5):294-301.

Briot K, Roux C. Inflammation, bone loss and fracture risk in spondyloarthritis. *RMD Open*. 2015;1(1):e000052.

Cao JJ. Effects of obesity on bone metabolism. *J Orthop Surg Res*. 2011;6:30.

Carter S, Lories RJ. Osteoporosis: a paradox in ankylosing spondylitis. *Curr Osteoporos Rep*. 2011;9(3):112-5.

Chen CH, Chen HA, Liao HT, Liu CH, Tsai CY, Chou CT. Soluble receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin in ankylosing spondylitis: OPG is associated with poor physical mobility and reflects systemic inflammation. *Clin Rheumatol*. 2010;29(10):1155-61.

Chen MR, Dragoo JL. The effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on tissue healing. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2013;21(3):540-9.

Chiu YG, Shao T, Feng C, Mensah KA, Thullen M, Schwarz EM, Ritchlin CT. CD16 (FcR $\gamma$ III) as a potential marker of osteoclast precursors in psoriatic arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(1):R14.

Colina M, Penolazzi L, di Ciano M, Lambertini E, Ciancio G, Orzincolo C, Trotta F, Govoni M, Piva R. Osteoclasts from peripheral blood mononuclear cells culture of ankylosing spondylitis subjects are resistant to apoptosis. *Biom & Prev Nutr*. 2013; 3:253-9.

Creemers MC, Franssen MJ, van't Hof MA, Gribnau FW, van de Putte LB, van Riel PL. Assessment of outcome in ankylosing spondylitis: an extended radiographic scoring system. *Ann Rheum Dis*. 2005;64(1):127-9.

Diarra D, Stolina M, Polzer K, Zwerina J, Ominsky MS, Dwyer D, Korb A, Smolen J, Hoffmann M, Scheinecker C, van der Heide D, Landewe R, Lacey D, Richards WG, Schett G. Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat Med.* 2007;13(2):156-63.

Dougados M, Baeten D. Spondyloarthritis. *Lancet.* 2011;377(9783):2127-37.

Dubost JJ, Sauvezie B. Late onset peripheral spondyloarthropathy. *J Rheumatol.* 1989;16(9):1214-7.

Durand M, Boire G, Komarova SV, Dixon SJ, Sims SM, Harrison RE, Nabavi N, Maria O, Manolson MF, Mizianty M, Kurgan L, de Brum-Fernandes AJ. The increased in vitro osteoclastogenesis in patients with rheumatoid arthritis is due to increased percentage of precursors and decreased apoptosis - the In Vitro Osteoclast Differentiation in Arthritis (IODA) study. *Bone.* 2011;48(3):588-96.

Durand M, Komarova SV, Bhargava A, Trebec-Reynolds DP, Li K, Fiorino C, Maria O, Nabavi N, Manolson MF, Harrison RE, Dixon SJ, Sims SM, Mizianty MJ, Kurgan L, Haroun S, Boire G, de Fatima Lucena-Fernandes M, de Brum-Fernandes AJ. Monocytes from patients with osteoarthritis display increased osteoclastogenesis and bone resorption: the In Vitro Osteoclast Differentiation in Arthritis study. *Arthritis Rheum.* 2013;65(1):148-58.

Durnez A, Paternotte S, Fechtenbaum J, Landewé RB, Dougados M, Roux C, Briot K. Increase in bone density in patients with spondyloarthritis during anti-tumor necrosis factor therapy: 6-year followup study. *J Rheumatol.* 2013;40(10):1712-8.

Fuller K, Owens JM, Jagger CJ, Wilson A, Moss R, Chambers TJ. Macrophage colony-stimulating factor stimulates survival and chemotactic behavior in isolated osteoclasts. *J Exp Med*. 1993;178(5):1733-44.

Goh L, Suresh P, Gafoor A, Hughes P, Hickling P. Disease activity in longstanding ankylosing spondylitis: a correlation of clinical and magnetic resonance imaging findings. *Clin Rheumatol*. 2008;27(4):449-55.

Goldring SR. Osteoimmunology and bone homeostasis: relevance to spondyloarthritis. *Curr Rheumatol Rep*. 2013;15(7):342.

Grazio S, Kusić Z, Cvijetić S, Grubišić F, Balenović A, Nemčić T, Matijević-Mikelić V, Punda M, Sieper J. Relationship of bone mineral density with disease activity and functional ability in patients with ankylosing spondylitis: a cross-sectional study. *Rheumatol Int*. 2012;32(9):2801-8.

He D, Zhu Q, Zhou Q, Qi Q, Sun H, Zachariah LM, Wang G, Reveille JD, Guan Y, Zhou X. Correlation of serum MMP3 and other biomarkers with clinical outcomes in patients with ankylosing spondylitis: a pilot study. *Clin Rheumatol*. 2017;36(8):1819-1826.

Im CH, Kang EH, Ki JY, Shin DW, Choi HJ, Chang EJ, Lee EY, Lee YJ, Lee EB, Kim HH, Song YW. Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand mediated osteoclastogenesis is elevated in ankylosing spondylitis. *Clin Exp Rheumatol*. 2009;27(4):620-5.

Jimi E, Aoki K, Saito H, D'Acquisto F, May MJ, Nakamura I, Sudo T, Kojima T, Okamoto F, Fukushima H, Okabe K, Ohya K, Ghosh S. Selective inhibition of NF-kappa B blocks osteoclastogenesis and prevents inflammatory bone destruction in vivo. *Nat Med*. 2004;10(6):617-24.

Kajiya M, Giro G, Taubman MA, Han X, Mayer MP, Kawai T. Role of periodontal pathogenic bacteria in RANKL-mediated bone destruction in periodontal disease. *J Oral Microbiol.* 2010;2.

Karakawa A, Fukawa Y, Okazaki M, Takahashi K, Sano T, Amano H, Yamamoto M, Yamada S. Diclofenac sodium inhibits NFkappaB transcription in osteoclasts. *J Dent Res.* 2009;88(11):1042-7.

Karsdal MA, Martin TJ, Bollerslev J, Christiansen C, Henriksen K. Are nonresorbing osteoclasts sources of bone anabolic activity?. *J Bone Miner Res.* 2007;22(4):487-94.

Kawashima M, Fujikawa Y, Itonaga I, Takita C, Tsumura H. The effect of selective cyclooxygenase-2 inhibitor on human osteoclast precursors to influence osteoclastogenesis in vitro. *Mod Rheumatol.* 2009;19(2):192-8.

Kellinsalmi M, Parikka V, Risteli J, Hentunen T, Leskelä HV, Lehtonen S, Selander K, Väänänen K, Lehenkari P. Inhibition of cyclooxygenase-2 down-regulates osteoclast and osteoblast differentiation and favours adipocyte formation in vitro. *Eur J Pharmacol.* 2007;572(2-3):102-10.

Kang KY, Ju JH, Park SH, Kim HY. The paradoxical effects of TNF inhibitors on bone mineral density and radiographic progression in patients with ankylosing spondylitis. *Rheumatology (Oxford).* 2013;52(4):718-26.

Kotake S, Yago T, Kawamoto M, Nanke Y. Effects of NSAIDs on differentiation and function of human and murine osteoclasts - Crucial 'Human Osteoclastology'. *Pharmaceuticals (Basel).* 2010;3(5):1394-1410.

Krischak GD, Augat P, Sorg T, Blakytyn R, Kinzl L, Claes L, Beck A. Effects of diclofenac on periosteal callus maturation in osteotomy healing in an animal model. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2007;127(1):3-9.

Lories RJ, Luyten FP, de Vlam K. Progress in spondyloarthritis. Mechanisms of new bone formation in spondyloarthritis. *Arthritis Res Ther.* 2009;11(2):221.

Lories RJ, Schett G. Pathophysiology of new bone formation and ankylosis in spondyloarthritis. *Rheum Dis Clin North Am.* 2012;38(3):555-67.

Machado P, Landewé R, Lie E, Kvien TK, Braun J, Baker D, van der Heijde D; Assessment of Spondylo Arthritis international Society. Ankylosing spondylitis disease activity score (ASDAS): defining cut-off values for disease activity states and improvement scores. *Ann Rheum Dis.* 2011;70(1):47-53.

Manolson MF, Yu H, Chen W, Yao Y, Li K, Lees RL, Heersche JN. The  $\alpha 3$  isoform of the 100-kDa V-ATPase subunit is highly but differentially expressed in large ( $\geq 10$  nuclei) and small ( $\leq 10$  nuclei) osteoclasts. *J Biol Chem.* 2003;278(49):49271-8.

McCulluch CE, Searle SR. *Generalized, linear and mixed models.* New York: Wiley; 2011.

Molnar C, Scherer A, Baraliakos X, de Hooge M, Micheroli R, Exer P, Kissling RO, Tamborrini G, Wildi LM, Nissen MJ, Zufferey P, Bernhard J, Weber U, Landewé RBM, van der Heijde D, Ciurea A; Rheumatologists of the Swiss Clinical Quality Management Program. TNF blockers inhibit spinal radiographic progression in ankylosing spondylitis by reducing disease activity: results from the Swiss Clinical Quality Management cohort. *Ann Rheum Dis.* 2018;77(1):63-69.

Perpétuo IP, Raposeiro R, Caetano-Lopes J, Vieira-Sousa E, Campanilho-Marques R, Ponte C, Canhão H, Ainola M, Fonseca JE. Effect of tumor necrosis factor inhibitor therapy on osteoclasts precursors in Ankylosing Spondylitis. *PLoS One*. 2015;10(12):e0144655.

Perpétuo IP, Caetano-Lopes J, Vieira-Sousa E, Campanilho-Marques R, Ponte C, Khmelinskii N, Canhão H, Ainola M, Fonseca JE. Corrigendum: ankylosing spondylitis patients have impaired osteoclast gene expression in circulating osteoclast precursors. *Front Med (Lausanne)*. 2017;4:38.

Poddubnyy D, Rudwaleit M, Haibel H, Listing J, Märker-Hermann E, Zeidler H, Braun J, Sieper J. Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on radiographic spinal progression in patients with axial spondyloarthritis: results from the German Spondyloarthritis Inception Cohort. *Ann Rheum Dis*. 2012;71(10):1616-22.

Rauner M, Sipos W, Pietschmann P. Osteoimmunology. *Int Arch Allergy Immunol*. 2007;143(1):31-48.

Rossol M, Kraus S, Pierer M, Baerwald C, Wagner U. The CD14(bright) CD16+ monocyte subset is expanded in rheumatoid arthritis and promotes expansion of the Th17 cell population. *Arthritis Rheum*. 2012;64(3):671-7.

Salari P, Abdollahi M. Controversial effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on bone: a review. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2009;8(3):169-75.

Sarikaya S, Basaran A, Tekin Y, Ozdolap S, Ortancil O. Is osteoporosis generalized or localized to central skeleton in ankylosing spondylitis? *J Clin Rheumatol*. 2007;13(1):20-4.



Schett G, Rudwaleit M. Can we stop progression of ankylosing spondylitis? *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2010;24(3):363-71.

Seguro LP, Casella CB, Caparbo VF, Oliveira RM, Bonfa A, Bonfa E, Pereira RM. Lower P1NP serum levels: a predictive marker of bone loss after 1 year follow-up in premenopausal systemic lupus erythematosus patients. *Osteoporos Int.* 2015;26(2):459-67.

Sieper J, Rudwaleit M, Baraliakos X, Brandt J, Braun J, Burgos-Vargas R, Dougados M, Hermann KG, Landewé R, Maksymowych W, van der Heijde D. The Assessment of SpondyloArthritis international Society (ASAS) handbook: a guide to assess spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2009;68(Suppl 2):ii1-44.

Singh HJ, Nimarpreet K, Ashima, Das S, Kumar A, Prakash S. Study of bone mineral density in patients with ankylosing spondylitis. *J Clin Diagn Res.* 2013;7(12):2832-5.

Spelling P, Bonfá E, Caparbo VF, Pereira RM. Osteoprotegerin/RANKL system imbalance in active polyarticular-onset juvenile idiopathic arthritis: a bone damage biomarker?. *Scand J Rheumatol.* 2008;37(6):439-44.

Sprangers S, de Vries TJ, Everts V. Monocyte heterogeneity: consequences for monocyte-derived immune cells. *J Immunol Res.* 2016a;2016:1475435.

Sprangers S, Schoenmaker T, Cao Y, Everts V, de Vries TJ. Different blood-borne human osteoclast precursors respond in distinct ways to IL-17A. *J Cell Physiol.* 2016b;231(6):1249-60.

Surdacki A, Sulicka J, Korkosz M, Mikolajczyk T, Telesinska-Jasiówka D, Klimek E, Kierzkowska I, Guzik T, Grodzicki TK. Blood monocyte heterogeneity and markers of endothelial activation in ankylosing spondylitis. *J Rheumatol.* 2014;41(3):481-9.

Theill LE, Boyle WJ, Penninger JM. RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:795-823.

van der Heijde D, Salonen D, Weissman BN, Landewé R, Maksymowych WP, Kupper H, Ballal S, Gibson E, Wong R; Canadian (M03-606) study group; ATLAS study group. Assessment of radiographic progression in the spines of patients with ankylosing spondylitis treated with adalimumab for up to 2 years. *Arthritis Res Ther.* 2009;11(4):R127.

van der Linden S, Valkenburg HA, Cats A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria. *Arthritis Rheum.* 1984; 27:361-8.

Wanders A, Heijde Dv, Landewé R, Béhier JM, Calin A, Olivieri I, Zeidler H, Dougados M. Nonsteroidal antiinflammatory drugs reduce radiographic progression in patients with ankylosing spondylitis: a randomized clinical trial. *Arthritis Rheum.* 2005;52(6):1756-65.

Webers C, Essers I, Ramiro S, Stolwijk C, Landewé R, van der Heijde D, van den Bosch F, Dougados M, van Tubergen A Gender-attributable differences in outcome of ankylosing spondylitis: long-term results from the Outcome in Ankylosing Spondylitis International Study. *Rheumatology (Oxford).* 2016;55(3):419-28.

Wheater G, Elshahaly M, Tuck SP, Datta HK, van Laar JM. The clinical utility of bone marker measurements in osteoporosis. *J Transl Med.* 2013;29;11:201.

Wong KL, Yeap WH, Tai JJ, Ong SM, Dang TM, Wong SC. The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol Res.* 2012; 53(1-3):41-57.

Zhao L, Huang L, Zhang X. Osteoimmunology: memorandum for rheumatologists. *Sci China Life Sci.* 2016;59(12):1241-58.

## **APÊNDICES**

Apêndice A - Prêmio recebido durante o 22º ERA 2016



**Apêndice B - Prêmio recebido durante o 7º BRADOO**



## Apêndice C - Pôster apresentado durante o 2017 ACR/ARHP Annual Meeting

### ACR Invitation Acceptance Notification



acr@confex.com <acr@confex.com>

28/08/2017 07:44



Para: caparbo@hotmail.com

Dear Valéria F. Caparbo,

Thank you for agreeing to participate in the 2017 ACR/ARHP **Annual Meeting**, in San Diego, CA, November 03 - 08, 2017. We are delighted and grateful that you have agreed to serve as Poster presenter for the abstract titled "Monocytes from Male Patients with Ankylosing Spondylitis Display Decreased Osteoclastogenesis and Decreased RANKL/OPG Ratio".

We have you scheduled for the following:

- **Session Type:** Poster
- **Session Name:** Spondyloarthropathies Psoriatic Arthritis – Pathogenesis, Etiology Poster II
- **Date and Session Time:** Monday, November 6, 2017: 9:00 AM-11:00 AM

If you have specific questions regarding your abstract, you may contact Lauren Davis, **Annual Meeting** Abstracts, at [abstracts@rheumatology.org](mailto:abstracts@rheumatology.org) or 404-633-3777. We look forward to seeing you at this year's **Annual Meeting** in San Diego.

Sincerely,  
Richard Loeser, MD  
Chair, ACR **Annual Meeting** Planning Committee

Christine Stamatou, DNP, ANP-C  
Chair, ARHP **Annual Meeting** Program Sub-Committee

**Apêndice D - Aceite da Revista *Osteoporosis International***

----- Forwarded Message -----

**From:** OSIN- Editorial Office <[em@editorialmanager.com](mailto:em@editorialmanager.com)>

**To:** Rosa M R Pereira <[rosamariarp@yahoo.com](mailto:rosamariarp@yahoo.com)>

**Sent:** Friday, June 29, 2018, 5:18:59 PM GMT-3

**Subject:** Your Submission OSIN-D-17-01125R1

Dear Prof. Pereira,

We are pleased to inform you that your manuscript, "Monocytes from male patients with Ankylosing Spondylitis display decreased osteoclastogenesis and decreased RANKL/OPG ratio", has been accepted for publication in *Osteoporosis International*.

You will receive an e-mail in due course regarding the production process.

Please remember to quote the manuscript number, OSIN-D-17-01125R1, whenever inquiring about your manuscript.

I have made a few small edits to improve the readability of the sentences you just added.

We would like to take this opportunity to let you know that, as an author of a paper soon to appear in *Osteoporosis International*, we may ask you to review papers submitted in your area of expertise. We consider this as an important part of your role as an author. We also invite you to consider *Osteoporosis International* as the first repository for future papers.

With best regards,

Robert A Adler, MD  
Associate Editor