

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA MÉDICA

FLÁVIO FALCÃO LIMA DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DE SURVIVINA E ARMADILHAS EXTRACELULARES DE  
NEUTRÓFILOS NO LÍQUIDO SINOVIAL COMO BIOMARCADORES NA ARTRITE  
REUMATOIDE**

Ribeirão Preto

2022

FLÁVIO FALCÃO LIMA DE SOUZA

**Avaliação de survivina e armadilhas extracelulares de neutrófilos no líquido sinovial como biomarcadores na artrite reumatoide**

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

Orientador: Prof. Dr. Renê Donizeti Ribeiro de Oliveira

Ribeirão Preto

2022

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

Souza, Flávio Falcão Lima de

Avaliação de survivina e armadilhas extracelulares de neutrófilos no líquido sinovial como biomarcadores na artrite reumatoide

51p.:il.; 30 cm

Tese de doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

Orientador: Oliveira, Renê Donizeti Ribeiro de.

1.Artrite Reumatoide. 2. Apoptose. 3. Survivina 4. NETs. 5. Biomarcadores

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Flávio Falcão Lima de Souza

Título: Avaliação da survivina e armadilhas extracelulares de neutrófilos no líquido sinovial como biomarcadores na artrite reumatoide.

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

Orientador: Prof. Dr. Renê Donizeti Ribeiro de Oliveira

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Banca examinadora

Prof(a). Dr(a) \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

À minha filha Clarice, por trazer alegria aos meus dias.

Aos meus pais, Flávio Lima de Souza e Cleonice Falcão Lemos de Almeida, por terem sempre priorizado a minha educação.

Ao meu irmão Eduardo, pelo exemplo de humanidade.

À minha família no interior de São Paulo: Galdino, Laura, Stela, Sabrina, Daniel e Marina, por me acolherem.

Aos meus grandes amigos: Rafael, Caio e Francisco por dividirem suas vidas comigo.

Ao meu orientador: Prof. Dr. Renê, pela paciência, disponibilidade e incentivo.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos colegas que me ajudaram nessa pesquisa: Caio Machado, Ayda Schneider e Lívia Ambrósio.

A Prof. Dra Tarcilia Aparecida da Silva, pelo apoio na execução desta pesquisa.

Aos meus professores e preceptores da Residência de Reumatologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto: Prof. Dr. Paulo Louzada, Prof. Dr Maria Carolina de Oliveira, Dr. Flávio Petean, Dr. Sérgio Luna, Dra Fabíola Reis, Dra Lucienir Maria, Dr. Rodrigo Oliveira, Dr. Rodrigo Lupino e Dra Daniela de Moraes, por compartilharem seus conhecimentos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## RESUMO

Souza, F.F.L. **Avaliação de survivina e armadilhas extracelulares de neutrófilos no líquido sinovial como biomarcadores na artrite reumatoide**. 2022. 52fls. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

**Introdução:** a resistência do *pannus* à apoptose é uma característica importante que resulta em invasão e erosão óssea na artrite reumatoide (AR). A survivina, uma proteína antiapoptótica produzida por fibroblastos sinoviais, é útil como biomarcador de diagnóstico e dano articular na AR. Os neutrófilos sinoviais apresentam apoptose tardia e são responsáveis por lesar diretamente o tecido articular, atuando através da liberação de grânulos enzimáticos, espécies reativas de oxigênio e armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs). NETs são reconhecidas como fonte de autoantígenos citrulinados na AR. **Objetivos:** quantificar survivina e NETs no líquido sinovial (LS) de pacientes com AR e osteoartrite (OA) e avaliar se há correlação das quantificações com o diagnóstico, gravidade e atividade da AR. **Métodos:** foi realizado um estudo observacional transversal, no qual foram incluídos 32 pacientes com AR e 16 com OA. Foram obtidos dados clínicos, laboratoriais e radiográficos, além de análises de rotina do LS e dosagem de survivina e NETs sinoviais. A atividade da AR foi avaliada usando DAS28. **Resultados:** A survivina foi encontrada elevada no LS do grupo AR em comparação com o grupo OA (mediana 356,9 vs 49,9 pg/mL,  $p=0,0006$ ). A mediana de NETs foi de 100,7 e 49,7 ng/mL ( $p=0,004$ ) para os grupos AR e OA, respectivamente. As curvas ROC mostraram os seguintes valores para medidas de survivina e NETs: AUC de 79% e 75%, respectivamente, com sensibilidade de 75% e especificidade de 78% para ambos. Não houve correlação entre os valores de survivina e NETs para ambos os grupos. **Discussão:** Foi encontrada uma associação entre os níveis de survivina e NETs no LS e o diagnóstico de AR, mas não com erosões ósseas ou atividade da doença. Não houve correlação entre survivina e NETs no LS, pelo que supomos que a resistência à apoptose, mediada pela survivina, e a netose podem não estar diretamente relacionadas na fisiopatologia da AR.

Palavras-chave: artrite reumatoide, apoptose, survivina, NETs, biomarcadores

## ABSTRACT

Souza, F.F.L. **Evaluation of survivin and extracellular neutrophil traps in synovial fluid as biomarkers in rheumatoid arthritis.** 2022. 52fls. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

**Introduction:** the pannus resistance to apoptosis is a key feature for invasion leading to bone erosion in rheumatoid arthritis (RA). Survivin, an antiapoptotic protein produced by RA fibroblast-like synoviocytes, is useful as biomarkers of diagnosis and joint damage in RA. Synovial neutrophils present delayed apoptosis and are responsible for directly injuring joint tissue, acting through the release of enzymatic granules, reactive oxygen species and neutrophil extracellular traps (NETs). NETs are recognized as a source of citrullinated autoantigens in RA. **Aims:** to quantify survivin and NETs in SF of patients with RA and osteoarthritis (OA) and to assess whether there is a correlation of the quantifications with the diagnosis, severity and activity of RA. **Methods:** we performed a cross-sectional, observational study, in which 32 patients with RA and 16 with OA were included. Clinical, laboratory and radiographic data were obtained, in addition to routine analysis of SF and the dosage of SF survivin and NETs. RA activity was assessed using DAS28. **Results:** Survivin was found to be elevated in the synovial fluid of the AR group compared to the OA group (median 356.9 vs 49.9 pg/mL,  $p=0.0006$ ). The median NETs were 100.7 and 49.7 ng/mL ( $p=0.004$ ) for RA and OA groups, respectively. ROC curves showed the following values for measurements of survivin and NETs: AUC of 79% and 75% respectively, with sensitivity of 75% and specificity of 78% for both. There was no correlation between survivin and NETs values for both groups. **Discussion:** We found an association between levels of survivin and NETs in SF and the diagnosis of RA, but not with bone erosions or disease activity. There was no correlation between survivin and NETs in SF, for what we suppose that resistance to apoptosis, mediated by survivin, and netosis may not be directly related in the pathophysiology of RA.

Keywords: rheumatoid arthritis, apoptosis, survivin, NETs, biomarkers

## LISTA DE GRÁFICOS

|   |    |
|---|----|
| Gráfico 1. Comparação entre medianas e intervalo interquartil de interleucina 6 nos grupos AR e OA.....                   | 27 |
| Gráfico 2. Comparação entre medianas e intervalos interquartis dos níveis de survivina sinovial nos grupos AR e OA.....   | 28 |
| Gráfico 3. Comparação entre medianas e intervalos interquartis de produtos de NETs sinoviais entre os grupos AR e OA..... | 28 |
| Gráfico 4. Curva ROC para survivina no grupo AR.....  | 29 |
| Gráfico 5. Curva ROC para NETs no grupo AR.....   | 30 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1: Características demográficas, clínicas, laboratoriais do grupo AR e OA .... | 26 |
| Tabela 2: Correlações entre dados clínicos e laboratoriais.....                       | 32 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                       |    |
|---------------------------------------|----|
| Figura 1. Fluxograma de inclusão..... | 20 |
|---------------------------------------|----|

## LISTA DE ABREVIATURAS

|          |  |
|----------|--|
| AR       | Artrite Reumatoide                                 |
| Anti-CCP | Anticorpo anti peptideo citrulinado cíclico        |
| DMARD    | Droga Modificadora de Doenças Reumáticas           |
| sDMARD   | Droga Modificadora de Doenças Reumáticas Sintética |
| bDMARD   | Droga Modificadora de Doenças Reumáticas Biológica |
| FR       | Fator Reumatoide                                   |
| HLA      | <i>Human Leucocyte Antigen</i>                     |
| LS       | Líquido Sinovial                                   |
| MHC      | <i>Major Histocompatibility Complex</i>            |
| NETs     | <i>Neutrophil Extracellular Traps</i>              |
| OA       | Osteoartrite                                       |
| PCR      | Proteína C reativa                                 |
| TNF      | Fator de Necrose Tumoral                           |
| VHS      | Velocidade de Hemossedimentação                    |

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| 1.INTRODUÇÃO.....  | 15 |
| 2.JUSTIFICATIVA.....   | 17 |
| 3.OBJETIVOS.....   | 18 |
| 3.1 Primários.....   | 18 |
| 3.2 Secundários.....   | 18 |
| 4. PACIENTES E MÉTODOS.....  | 19 |
| 4.1 Desenho do estudo .....  | 19 |
| 4.2 Determinação do tamanho amostral.....                            | 19 |
| 4.3 Participantes.....   | 19 |
| 4.4 Critérios de inclusão.....                                       | 20 |
| 4.5 Critérios de exclusão.....                                       | 21 |
| 4.6 Aspectos éticos.....   | 21 |
| 4.7 Avaliação clínica.....   | 21 |
| 4.8 Avaliação radiográfica.....                                      | 22 |
| 4.9 Avaliação laboratorial.....                                      | 22 |
| 4.10 Procedimentos experimentais.....                                | 22 |
| 4.11 Análise estatística.....  | 23 |
| 5. RESULTADOS.....   | 25 |
| 5.1 Dados clínicos e laboratoriais.....                              | 25 |
| 5.2 IL-6, survivina e NETs no líquido sinovial.....                  | 26 |
| 5.3 Erosões ósseas survivina e NETs.....                             | 30 |
| 5.4 Atividade de doença, survivina e NETs.....                       | 30 |
| 5.5 Correlação entre DAS28, dados laboratoriais e experimentais..... | 30 |

|                                    |    |
|------------------------------------|----|
| 6. DISCUSSÃO.....                  | 33 |
| 7. CONCLUSÕES.....                 | 38 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 39 |

## ANEXOS

|   |    |
|---|----|
| Anexo A – Parecer consubstanciado do CEP.....             | 43 |
| Anexo B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido..... | 47 |
| Anexo C – Comprovante de Submissão do artigo.....         | 52 |

## 1. INTRODUÇÃO

Artrite reumatoide (AR) é uma doença crônica, inflamatória e autoimune, que afeta primariamente as articulações e que sem tratamento pode levar a danos articulares irreversíveis e incapacidade física. A prevalência média da AR é estimada em cerca de 0,5 a 1% da população geral. Fatores genéticos são responsáveis por 60% do risco de desenvolver AR. Variantes nos genes HLA (*Human Leucocyte Antigen*) conhecidas como epítipo compartilhado estão particularmente associadas ao risco de desenvolvimento da doença, além de fatores ambientais, como tabagismo.<sup>1</sup>

A invasão da sinóvia por células do sistema imune é a marca registrada da fisiopatologia da AR. Componentes inatos e adaptativos do sistema imune contribuem para a cronicidade da sinovite, levando à organização de um tecido infiltrativo e erosivo ao osso chamado *pannus*.<sup>2</sup> A resistência do *pannus* à apoptose é uma característica fundamental para seu comportamento invasivo e destrutivo. A resistência à apoptose na AR também ocorre nas células do líquido sinovial (LS).<sup>3</sup>

Vários estudos demonstraram haver desequilíbrio entre fatores pro-apoptóticos e anti-apoptóticos tanto na sinóvia reumatoide quanto nas células imunes do sangue e dos tecidos.<sup>4</sup> Entre esses fatores se destaca a elevação da proteína anti-apoptótica survivina. A survivina, o menor membro de um grupo de proteínas inibidoras da apoptose, é uma proteína de cadeia única, com 16,5 kDa, codificada pelo gene *BIRC5*; exerce sua função através da ligação com as caspases 3 e 9, levando ao bloqueio das vias extrínseca e intrínseca da apoptose.<sup>5</sup> Recentemente, foi demonstrado que altos níveis de survivina estão relacionados à falha ao tratamento com metotrexato na AR inicial.<sup>6</sup> Sua dosagem sérica pode prever a evolução de pacientes com artrite indiferenciada para AR e a elevação de seus níveis séricos se correlaciona com doença mais agressiva.<sup>7,8,9</sup>

Essa molécula é produzida por sinoviócitos semelhantes a fibroblastos<sup>10</sup> e promove a expressão de IL-6,<sup>11</sup> que por sua vez, ativa constantemente os neutrófilos,

contribuindo para o aumento de sua vida útil.<sup>12</sup> Neutrófilos são as células mais abundantes no LS de pacientes com AR e presentes no tecido sinovial principalmente durante fases de reativação da doença.<sup>13</sup> Neutrófilos de indivíduos saudáveis apresentam apoptose tardia quando incubados com LS de pacientes com AR.<sup>14,15</sup>

Além disso, dentre as células que participam na patogênese da AR os neutrófilos possuem o maior potencial citotóxico, responsáveis por lesar diretamente o tecido articular, agindo através da liberação de grânulos enzimáticos, espécies reativas de oxigênio e armadilhas extracelulares.<sup>16</sup> As armadilhas extracelulares de neutrófilos (do inglês, *Neutrophil Extracellular Traps* - NETs) são estruturas compostas por cromatina descondensada, histonas e proteínas granulares, como mieloperoxidase e elastase, liberadas em um processo denominado netose, mecanismo primeiramente relacionado à morte de patógenos, mas agora reconhecido como importante para danos teciduais na AR.<sup>12</sup> A descondensação da cromatina, etapa essencial para a netose, é regulada pela citrulinização, promovida pela arginina peptidil deiminase (PAD),<sup>17</sup> uma enzima envolvida no surgimento de anticorpos anti-peptídeos citrulinados (anti-CCP), um marcador sorológico de autoimunidade na AR. Em razão desta exposição do conteúdo intracelular, os neutrófilos podem ser uma fonte de autoantígenos citrulinados quando sofrem netose.<sup>18</sup> A interação entre o sistema imune adaptativo e os neutrófilos pode resultar em maior atividade inflamatória e persistência destas células tanto no LS quanto no *pannus*.<sup>19</sup> Existem algumas informações sobre o papel das NETs como biomarcadores para diagnóstico de AR,<sup>20</sup> mas sua utilidade para prognóstico ou resposta ao tratamento ainda é motivo de discussão. Se existe uma relação entre os níveis de survivina e de remanescentes de NETs no LS da AR é o que indagamos ao realizar este estudo. Para isso, avaliamos a presença de survivina e NETs no LS de pacientes com AR em comparação com o LS de pacientes com osteoartrite (OA). Perguntamos se os níveis sinoviais de survivina e/ou de NETs podem servir como biomarcadores para o diagnóstico diferencial da AR; se existe correlação entre ambos ou destes com marcadores de atividade e gravidade da doença, e com parâmetros inflamatórios.

## **2. JUSTIFICATIVA**

Resistência à apoptose e ocorrência de netose no microambiente sinovial contribuem para perpetuação da inflamação na AR. Avaliação comparativa desses dois aspectos de biologia celular pode fornecer elucidacões acerca da fisiopatologia da doença, bem como sugerir biomarcadores para diagnóstico.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Primário**

Quantificar e comparar os níveis de survivina e remanescentes de NETs no LS de pacientes com AR e OA.

#### **3.2 Secundários**

Avaliar se há associação entre as quantificações de survivina e NETs com o diagnóstico, a gravidade e a atividade da AR.

Avaliar se há correlação entre os níveis de survivina e remanescentes de NETs no LS de pacientes com AR e OA.

Avaliar se há correlação entre os níveis de survivina e remanescentes de NETs no LS e parâmetros de inflamação sistêmica.

## 4. PACIENTES E MÉTODOS

### 4.1 Desenho do estudo:

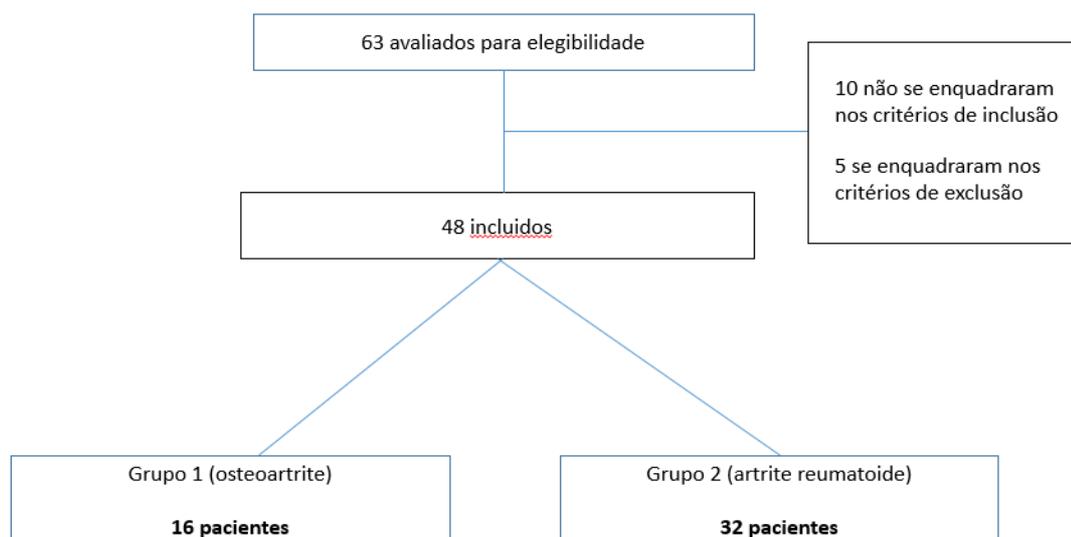
Realizamos um estudo observacional e transversal no qual foram avaliados para elegibilidade pacientes com OA e pacientes com AR com indicação de artrocentese.

### 4.2 Determinação do tamanho amostral:

Para determinação do tamanho amostral foi utilizada a calculadora fornecida pelo Centro de Métodos Quantitativos (CEMEQ) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). Foi considerada uma prevalência de AR de 1% da população total<sup>1</sup>, um erro absoluto tolerável (d) de 0,05 e um intervalo de confiança de 95%. O que resultou em um N mínimo de 16 pacientes em cada grupo.

### 4.3 Participantes:

Os pacientes incluídos foram provenientes do ambulatório de infiltração intra-articular do Hospital das Clínicas da FMRP-USP. Sessenta e três pacientes foram avaliados quanto à elegibilidade e 48 pacientes foram incluídos, conforme mostrado na **Figura 1**.



**Figura 1:** Fluxograma de inclusão

#### 4.4 Critérios de inclusão:

Para os dois grupos:

- Ter indicação médica de artrocentese, diagnóstica ou terapêutica. A equipe de pesquisa não teve nenhuma participação na indicação do procedimento nem na realização do mesmo, podendo o mesmo ter sido realizado em qualquer articulação puncionável.

- Pacientes maiores de 18 anos, que tenham lido, compreendido e assinado o Termo de consentimento livre e esclarecido.

Para o grupo AR:

- Todos os pacientes preencheram os critérios de classificação de AR do *American College of Rheumatology (ACR)* e *European League Against Rheumatism (EULAR)* de 2010.<sup>21,22</sup>

Para o grupo controle (OA):

Pacientes tiveram diagnóstico de OA realizado pela equipe médica assistente. Para a articulação do joelho foi utilizado o critério clínico e radiográfico ACR 1986.<sup>23</sup>

#### 4.3 Critérios de exclusão:

Pacientes portadores de outras doenças reumáticas autoimunes.

Pacientes com diagnóstico clínico ou microbiológico de artrite séptica.

Pacientes com artropatia por cristais na articulação estudada (presença de cristais na análise do LS).

Pacientes com infecção sistêmica, aguda ou crônica.

Pacientes com neoplasia em tratamento ou com término de tratamento há menos de 5 anos.

#### 4.4 Aspectos éticos:

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (registro número: 30237320.1.00005440) – **Anexo A**.

Todos os pacientes convidados a participar do estudo leram e assinaram o Termo de consentimento livre e esclarecido (**Anexo B**), e tiveram suas dúvidas esclarecidas no momento da inclusão e durante o estudo, bem como puderam se retirar do estudo a qualquer momento.

#### 4.5 Avaliação Clínica:

Pacientes foram avaliados quanto a variáveis demográficas, presença de comorbidades e medicações em uso, conforme revisão de prontuário.

Pacientes com AR foram avaliados quanto ao escore de atividade de doença DAS28 (*Disease activity score 28 joints*),<sup>24,25</sup> sendo classificados da seguinte forma:

Remissão: DAS28 < 2,6

Baixa atividade:  $2,6 \leq \text{DAS28} < 3,2$

Moderada atividade:  $3,2 \leq \text{DAS28} < 5,1$

Alta atividade: DAS28  $\geq 5,1$

#### 4.5 Avaliação radiográfica

Avaliamos radiografias de mãos de pacientes com AR, realizadas nos últimos 12 meses, no intuito de classificá-los como portadores de doença erosiva ou não. Erosão foi considerada uma clara ruptura na camada cortical das articulações metacarpofalangeanas, interfalangeanas proximais, radiocarpal, ulno-carpal ou intracarpal.

#### 4.6 Avaliação laboratorial

Foi realizada avaliação de inflamação sistêmica através da proteína C reativa sérica (PCR) por turbidimetria e velocidade de hemossedimentação (VHS) pela técnica de Westergren, foi realizada para todos participantes no mesmo dia da coleta do LS.

O fator reumatoide (FR) foi detectado por nefelometria, com resultados positivos se concentrações > 10 UI/mL. A detecção de anti-CCP (IgG) foi realizada usando kits comerciais de ELISA de acordo com as instruções do fabricante (Quanta Lite anti-CCP 2; Inova, San Diego, CA, EUA) e foi considerado positivo em concentrações > 20 UI/mL e positivo em altos títulos se em concentrações > 60UI/mL.

#### 4.10 Procedimentos experimentais

Após consentimento, a artrocentese (de um dos joelhos, para todos os pacientes) foi realizada sob técnica asséptica pela equipe assistente e o LS foi

coletado em tubos contendo EDTA para posterior centrifugação e análise padrão dentro de duas horas, que consistiu em coloração com Giemsa para leucometria e contagem diferencial sob microscopia óptica. As amostras de LS livres de células restantes foram armazenadas a -80°C até que os experimentos fossem realizados.

Quantificamos IL-6 nas amostras de LS através de ensaio multiplex, usando o Milliplex® MAP Kit de painel magnético de esferas de citocinas/quimocinas humanas (Merck, Darmstadt, Alemanha), no Luminex® 200™ FLEXMAP 3D™ (Austin, TX, EUA), seguindo as recomendações do fabricante.

A survivina foi medida em LS pelo método ELISA, usando o kit comercial Human Survivin Quantikine® (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA), seguindo recomendações do fabricante.

A quantificação de produtos de NETs em LS foi realizada medindo DNA celular livre conjugado com mieloperoxidase por espectrofotometria. Em resumo, um reagente de dupla hélice de DNA fluorescente (Quant-it Picogreen dsDNA® Invitrogen ThermoFisher) foi adicionado às amostras. Após o período de reação, as amostras foram colocadas em placas previamente sensibilizadas com anticorpo anti-mieloperoxidase (kit comercial Anticorpo de Mieloperoxidase PA5 – 16672 Thermo Fisher Scientific). A fluorescência foi lida em 525 nm (com excitação em 488 nm) no espectrofotômetro SpectraMax M3 – Molecular Devices.

#### 4.11 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o GraphPad Prism® 7 (GraphPad Software Inc., EUA). A estatística descritiva foi apresentada em números absolutos e percentuais ou mediana e intervalo interquartil. As comparações de parâmetros clínicos, laboratoriais e experimentais entre os grupos foram realizadas pelo teste de Mann-Whitney para variáveis contínuas e teste exato de Fisher para variáveis categóricas. Curvas ROC foram usadas para avaliar survivina e NETs sinoviais como biomarcadores para o diagnóstico de AR. A correlação de Spearman foi realizada para

medir a correlação entre variáveis experimentais, clínicas e laboratoriais gerais. Para todos os testes,  $p < 0,05$  foi considerado para significância estatística.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Dados clínicos e laboratoriais

Quarenta e oito pacientes foram incluídos, 32 no grupo AR e 16 no grupo OA. A **Tabela 1** resume os dados clínicos e laboratoriais dos participantes. As mulheres foram 25 (78,1%) no grupo AR e 12 (75,0%) no grupo OA. A mediana de idade foi de 54,0 anos no grupo AR e 64,5 anos no grupo OA. A mediana da duração da doença para pacientes com AR foi de 70,3 meses.

No grupo AR, erosões nas radiografias de mãos, FR e anti-CCP positivos foram, respectivamente, 59,4%, 59,4% e 84,4%. Em relação aos marcadores de inflamação sistêmica, comparando os grupos AR e AO, encontramos diferenças para a mediana de VHS (31 vs 16 mm/h;  $p=0,006$ ) e PCR (1,8 vs 0,6 mg/dL;  $p=0,02$ ). A contagem total de leucócitos no LS foi diferente (17.830 vs 1.774/mm<sup>3</sup>;  $p<0,0001$ ), mas a porcentagem de neutrófilos foi semelhante em ambos os grupos (76,2 vs 64,6%).

No grupo AR, 9 (28,12%) pacientes eram virgens de tratamento, uma vez que a aspiração articular ocorreu na mesma avaliação em que o diagnóstico foi confirmado. Onze (34,4%) pacientes estavam em monoterapia com um medicamento antirreumático modificador da doença sintético (MMCDs), 5 (15,62%) estavam usando um MMCDs e um MMCD biológico (MMCDb) bloqueador de TNF, e 7 (21,87%) estavam usando um MMCDs e um MMCDb não-bloqueador de TNF (**Tabela 1**).

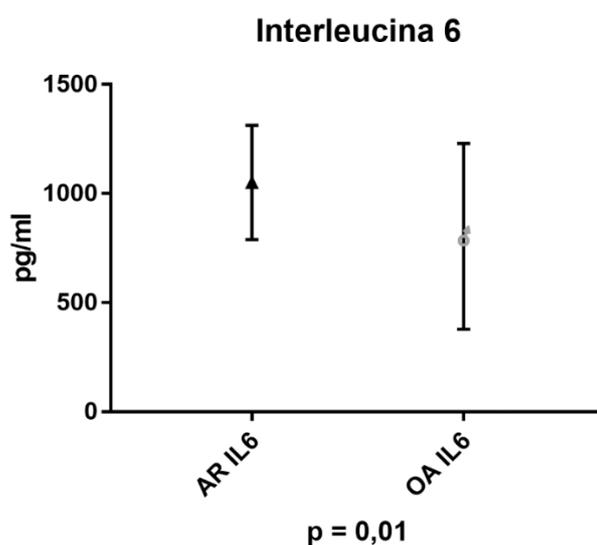
**Tabela 1:** Características demográficas, clínicas, laboratoriais do grupo AR e OA.

|  | AR (n = 32)                      | OA (n = 16)                     | P                 |
|--|----------------------------------|---------------------------------|-------------------|
| <b>Demografia</b>                                    |                                  |                                 |                   |
| Sexo feminino [n (%)]                                | 25 (78,12)                       | 12 (75)                         |                   |
| Idade (anos) [mediana; IIQ]                          | 54 [(45 – 64,7) 13,22]           | 64.5 [(58 – 70) 8,47]           | <b>0,0089</b>     |
| <b>Características clínicas</b>                      |                                  |                                 |                   |
| Erosões [n (%)]                                      | 19 (59,37)                       |                                 |                   |
| Tempo de doença (meses) [mediana; IIQ]               | 70,3 (24 – 108)                  |                                 |                   |
| FR positivo [n (%)]                                  | 19 (59,37)                       |                                 |                   |
| Anti-CCP positivo [n (%)]                            | 27 (84,37)                       |                                 |                   |
| DAS28 [média ± desvio padrão]                        | 4,2 ± 0,98                       |                                 |                   |
| <b>Características Laboratoriais</b>                 |                                  |                                 |                   |
| PCR (mg/dL) [mediana; IIQ]                           | 2,60 mg/dL [(0,69 – 3,74) 2,23]  | 2,07 mg/dl [(0,36 – 2,32) 3,33] | 0,07              |
| VHS (mm/1ª hora) [mediana; IIQ]                      | 31 mm/h [(14 – 38,75) 23,79]     | 16 mm/h [(3,5 – 24) 17,27]      | <b>0,006</b>      |
| <b>Análise do líquido sinovial</b>                   |                                  |                                 |                   |
| Leucócitos totais (/mm <sup>3</sup> ) [mediana; IIQ] | 17.830 [(7.900 – 27.800) 16.339] | 1.774 [(350 – 1.500) 2.400]     | <b>&lt;0,0001</b> |
| Neutrófilos (/mm <sup>3</sup> ) [mediana; IIQ]       | 13.595 [(3.665 – 25.632) 14.644] | 1.146 [(83 – 4.823) 2.781]      | <b>0,004</b>      |
| <b>Medicações em uso</b>                             |                                  |                                 |                   |
| Nenhuma [n (%)]                                      | 9 (28,12)                        |                                 |                   |
| Metotrexate [n (%)]                                  | 3 (9,37)                         |                                 |                   |
| Leflunomida [n (%)]                                  | 8 (25)                           |                                 |                   |
| Anti-TNF [n (%)]                                     | 5 (15,62)                        |                                 |                   |
| Outros [n (%)]                                       | 7 (21,87)                        |                                 |                   |

Legenda: IIQ – intervalo interquartil; FR – fator reumatoide; Anti-CCP – Anticorpo anti peptídeos citrulinados cíclicos; DAS28 – *disease activity index counting 28 joints*; PCR – proteína C-reativa; VHS – velocidade de hemossedimentação; TNF – fator de necrose tumoral

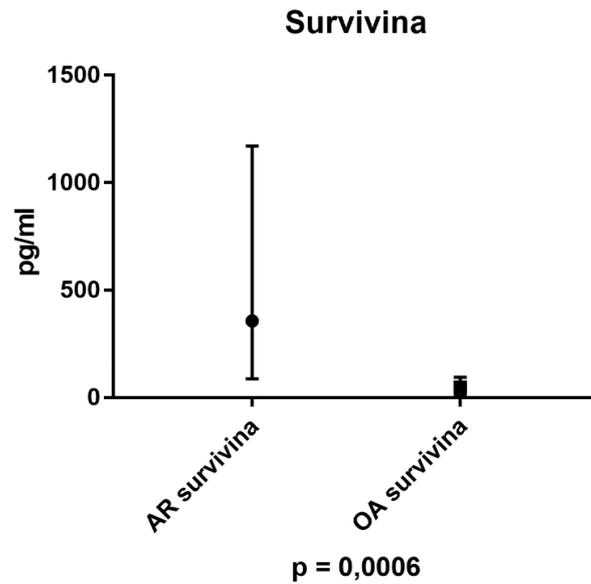
## 5.2 IL-6, survivina e NETs no LS

Encontramos diferenças significativas entre os grupos para as concentrações sinoviais de IL-6, survivina e NETs. O valor mediano de IL-6 no grupo AR foi de 1075,0 [intervalo interquartil (IIQ), 941,0 – 1204,4] pg/mL e no grupo OA foi de 803,8 (393,0 – 1116,0) pg/mL ( $p=0,01$ ) conforme a **Figura 2**.

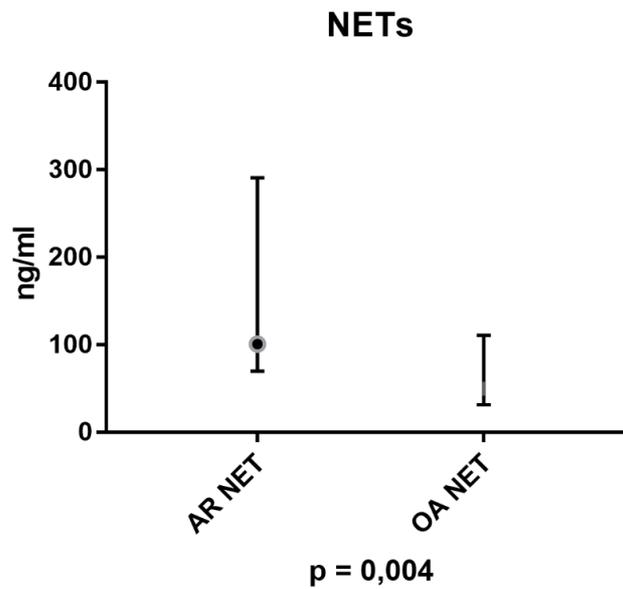


**Figura 2.** Comparação entre medianas e intervalo interquartil de IL 6 nos grupos AR e OA.

A dosagem mediana de survivina foi de 356,9 (87,7 – 1170,0) pg/mL no grupo AR e 49,9 (15,6 – 95,7) pg/mL no grupo OA ( $p=0,0006$ ). A mediana de NETs foi de 100,7 (69,9 – 291,0) ng/mL e 49,7 (31,5 – 110,8) ng/mL ( $p=0,004$ ) para os grupos AR e OA, respectivamente. Estes dados são mostrados nas **Figuras 3 e 4**.



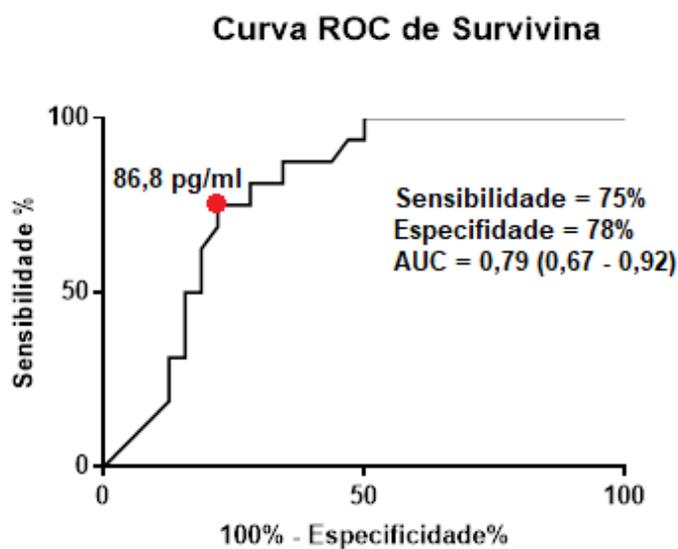
**Figura 3:** Comparação entre medianas e intervalos interquartis dos níveis de survivina sinovial nos grupos AR e OA.



**Figura 4:** Comparação entre medianas e intervalos interquartis de produtos de NETs sinoviais entre os grupos AR e OA.

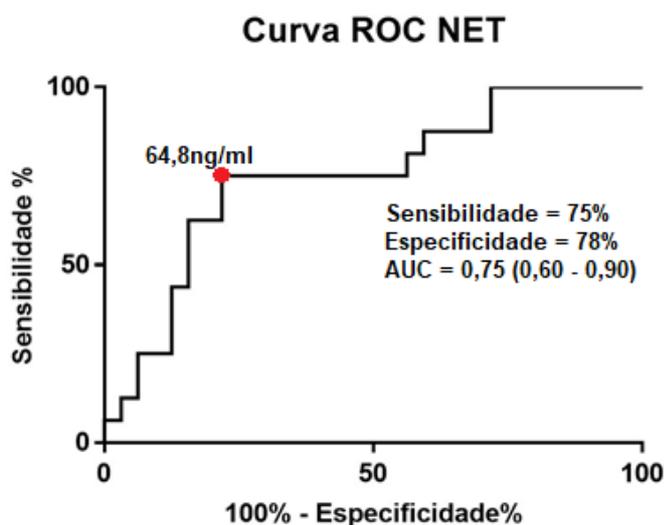
Curvas ROC foram realizadas para as dosagens de survivina e NETs. O melhor ponto de operação da survivina sinovial 86,8 pg/mL, com sensibilidade e

especificidade de 75% e 78%, respectivamente, para o diagnóstico de AR; enquanto melhor ponto para NETs no LS foi 64,8 ng/mL, com sensibilidade e especificidade de 75% e 78%, respectivamente, para o diagnóstico de AR. Ambas as curvas são mostradas nos **Figuras 5 e 6**. Também calculamos o razão de verossimilhança para ambos, resultando em valores de 2,14 para survivina e 2,34 para NETs.



Legenda: AUC - Área sob a curva

**Figura 5:** Curva ROC para survivina no grupo AR.



Legenda: AUC - Área sob a curva

**Figura 6:** Curva ROC para NETs no grupo AR.

Valores elevados de anti-CCP ocorreram em 23 (72%) pacientes com AR. Dividimos os pacientes do grupo AR em subgrupos com valores altos e baixos/negativos de anti-CCP, ou seja, 23 vs 9 pacientes. A sobrevivência mediana foi de 516 (80 – 1644) e 108 (54 – 198) pg/mL, respectivamente, para pacientes com anti-CCP alto e anti-CCP baixo/negativo ( $p=0,08$ ). Os valores médios para NETs foram 111 (88 – 392) e 68 (41 – 154) ng/mL ( $p=0,08$ ), respectivamente, para anti-CCP alto e baixo/negativo.

### 5.3 Erosões ósseas, sobrevivência e NETs

A presença de erosões ósseas nas radiografias convencionais das mãos foi escolhida como medida de gravidade da doença, sendo encontradas em 19 dos 32 pacientes com AR. Para a avaliação de associação entre a presença de erosões ósseas e as dosagens de sobrevivência ou NETs, o melhor ponto de operação de cada curva ROC (isto é, sobrevivência=86,8 pg/mL e NETs=64,8 ng/mL) foi considerado para

classificar os pacientes como tendo níveis elevados de survivina e NETs. Entre os pacientes com AR com survivina elevada, 78,3% tinham doença erosiva, enquanto erosões ósseas ocorreram em 44,4% daqueles com baixos níveis de survivina ( $p=0,10$ ). Erosões ósseas foram encontradas em 79,2% dos pacientes com NETs elevadas e em 37,5% dos pacientes com níveis baixos de NETs ( $p=0,07$ ).

#### 5.4 Atividade de doença, survivina e NETs

Em 30 pacientes do grupo AR, a doença foi classificada como de moderada (25, 78,1%) ou alta (5, 15,6%) atividade pelo DAS28, com média de 4,2 ( $\pm 0,98$ ). Como tivemos mais de 90% dos pacientes com doença ativa, não foi possível avaliar se survivina e NETs sinoviais podem servir como biomarcadores de atividade da doença.

#### 5.5 Correlações entre DAS28 e variáveis laboratoriais e experimentais

Procedemos a uma análise de correlação entre as variáveis clínicas, laboratoriais e experimentais. Os resultados são apresentados na **Tabela 2**. Encontramos uma correlação positiva entre anti-CCP sérico e survivina sinovial ( $\rho=0,45$ ,  $p=0,01$ ) e entre PCR sérica e NETs sinoviais ( $\rho=0,38$ ;  $p=0,03$ ) no grupo AR; e uma correlação positiva entre a contagem total de células no LS e NETs no grupo OA ( $\rho=0,54$ ;  $p=0,04$ ).

Após o resultado de uma correlação positiva entre PCR sérica e NETs sinovial para o grupo AR, decidimos avaliar se havia correlação entre PCR sérica e IL-6 ( $\rho=0,33$ ;  $p=0,06$ ).

**Tabela 2:** Correlações entre parâmetros clínicos e laboratoriais

|                   |     | AR (n=32)   |             | OA (n=16) |       |             |
|-------------------|-----|-------------|-------------|-----------|-------|-------------|
|                   |     | Survivina   | NETs        | Survivina | NETs  |             |
| PCR               | rho | 0.15        | <b>0.38</b> | rho       | -0.05 | 0.34        |
|                   | p   | 0.40        | <b>0.03</b> | p         | 0.86  | 0.23        |
| VHS               | rho | 0.10        | 0.22        | rho       | -0.45 | 0.36        |
|                   | p   | 0.58        | 0.22        | p         | 0.12  | 0.23        |
| Leucócitos no LS  | rho | 0.12        | 0.25        | rho       | 0.35  | <b>0.54</b> |
|                   | p   | 0.52        | 0.23        | p         | 0.20  | <b>0.04</b> |
| Neutrófilos no LS | rho | 0.01        | 0.12        | rho       | 0.38  | 0.71        |
|                   | p   | 0.98        | 0.53        | p         | 0.22  | 0.06        |
| IL-6              | rho | 0.18        | 0.13        | rho       | -0.25 | 0.02        |
|                   | p   | 0.33        | 0.34        | p         | 0.35  | 0.94        |
| Survivina         | rho | -           | 0.03        | rho       | -     | 0.19        |
|                   | p   | -           | 0.87        | p         | -     | 0.49        |
| NETs              | rho | 0.03        | -           | rho       | 0.19  | -           |
|                   | p   | 0.87        | -           | p         | 0.49  | -           |
| DAS28             | rho | 0.09        | 0.25        |           |       |             |
|                   | p   | 0.64        | 0.16        |           |       |             |
| Anti-CCP          | rho | <b>0.45</b> | 0.16        |           |       |             |
|                   | p   | <b>0.01</b> | 0.40        |           |       |             |

Legenda: AR – artrite reumatoide; OA – osteoartrite; PCR – proteína C-reativa; VHS – velocidade de hemossedimentação; IL-6 – interleucina 6; NETs - *neutrophil extracellular traps*; DAS28 – *disease activity index counting 28 joints*; Anti-CCP – Anticorpo anti peptídeos citrulinados cíclicos.

## 6 DISCUSSÃO

Como esperado, nossa coorte foi constituída principalmente por mulheres. A diferença de idade entre os grupos pode ser atribuída ao fato de os pacientes acometidos por OA geralmente iniciarem os sintomas da doença em uma idade mais avançada quando comparados aos pacientes com AR. O envolvimento sistêmico da AR explica as diferenças encontradas para VHS e PCR sérica. Quase 94% do grupo de AR foi representado por indivíduos com atividade da doença moderada ou alta, o que significa que várias articulações, não apenas o joelho aspirado, devem ter sido afetadas. Além disso, o influxo de leucócitos para o joelho e os níveis de IL-6 sinoviais foram encontrados significativamente maior no grupo AR. Em conjunto, esses achados sugerem que investigamos duas condições clínicas com diferenças relevantes na magnitude do processo inflamatório que afeta as articulações. Survivina e NETs também foram encontrados em maiores concentrações no LS de pacientes com AR.

A resistência à apoptose é um importante mecanismo na perpetuação das células imunes autorreativas na sinóvia reumatoide.<sup>4</sup> A vida útil dessas células no microambiente sinovial está relacionada a um desequilíbrio entre fatores pró e antiapoptóticos, com um resultado líquido favorecendo a resistência à apoptose. Foi proposto que um aumento da expressão de survivina em pacientes com AR pode resultar em aumento da proliferação e permanência de células inflamatórias no ambiente sinovial, além de estar relacionado a uma doença mais grave e erosiva.<sup>26,27</sup> A influência da survivina nos neutrófilos resulta em ativação e um aumento do limiar de apoptose.<sup>28</sup> Neutrófilos ativados por citocinas alteram sua expressão gênica para

permitir maior sobrevivência dentro de um microambiente inflamatório marcado por hipóxia, como ocorre na sinóvia reumatoide.<sup>29</sup>

As interações celulares na etiopatogenia da AR são complexas. Além do poder lesivo direto dos neutrófilos através da liberação de grânulos enzimáticos e espécies reativas de oxigênio, estas células também influenciam e regulam a resposta inflamatória através da secreção de citocinas, como TNF e IL-6, que influenciarão a maturação, proliferação e sobrevivência de linfócitos e macrófagos, e RANK-L que exerce efeito sobre osteoclastos, bem como através da apresentação de antígenos via MHC de classe II para linfócitos T.<sup>16</sup> Sob influência de citocinas anti-apoptóticas, produzidas em parte por fibroblastos sinoviais, como TNF, IL-8 e fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos a sobrevivência dos neutrófilos na sinóvia reumatoide é aumentada para vários dias.<sup>30</sup>

Encontramos níveis mais elevados de survivina no LS de AR em comparação com pacientes com OA, em concordância com dados anteriores.<sup>10</sup> Também encontramos associação entre os níveis de survivina no LS e o diagnóstico de AR, com sensibilidade e especificidade semelhantes a outros marcadores tradicionais da doença, como o FR sérico. Esses dados são comparáveis aos de outros estudos e reforçam a possibilidade de a survivina tornar-se um biomarcador diagnóstico para AR. Ao avaliar o soro de 1.233 pacientes com AR e 1.566 controles saudáveis, o estudo MyEIRA encontrou valor de sensibilidade para survivina de 95% e um valor preditivo positivo para o diagnóstico de AR de 88%.<sup>31</sup> Em outro estudo, avaliando pacientes com artralgia indiferenciada, a combinação de sintomas clínicos, auto-anticorpos e marcadores inflamatórios com survivina sérica resultou em uma especificidade de 91% e um valor preditivo positivo de 55% para a progressão para AR.<sup>32</sup> Nosso estudo mostrou, pela primeira vez, uma correlação positiva moderada entre a survivina sinovial e anti-CCP sérico, reforçando uma associação bem conhecida de ambas as medidas em amostras de soro.

Não encontramos uma associação estatisticamente significativa entre erosões ósseas e níveis de survivina sinovial. Esta associação foi bem estabelecida por outros

estudos.<sup>6,26</sup> A produção sinovial de survivina é atribuída a fibroblastos, importantes células efectoras na sinóvia reumatoide, adquirindo um fenótipo invasivo e participando da destruição articular, especialmente através da produção de metaloproteinases responsáveis pela degradação da cartilagem hialina. A expressão de survivina por fibroblastos sinoviais pode ser ativada pela via PI3-quinase/akt.<sup>32</sup> Mutações no gene supressor tumoral p53 no tecido sinovial estão relacionadas a um fenótipo mais agressivo de fibroblastos sinoviais na articulação reumatoide.<sup>33,34</sup> O aumento na expressão de p53 resulta em uma atividade de survivina mais baixa e uma taxa mais baixa de replicação de fibroblastos sinoviais e maior apoptose dessas células.<sup>35</sup>

Em acordo com nossos resultados, a maioria dos dados disponíveis sugere que os níveis de survivina sinovial não estão correlacionados com a atividade da AR medida pelo DAS28.<sup>10,36</sup> Isto pode se dever ao fato de o DAS28 refletir a atividade da doença em nível sistêmico, contabilizando todas as articulações envolvidas e marcadores de inflamação sistêmicos, como VHS e PCR sérica.

Uma avaliação da influência do LS de pacientes com AR na apoptose de neutrófilos e netose foi realizada pela primeira vez por Wright e colaboradores.<sup>3</sup> Os autores não avaliaram neutrófilos do LS na AR, mas neutrófilos sanguíneos de doadores saudáveis submetidos a incubação com LS de pacientes com AR. Eles descobriram que o LS de pacientes com AR foi capaz de diminuir a apoptose e aumentar a netose *in vitro*.

Os níveis de remanescentes de NETs são aumentados no soro e no LS de pacientes com AR.<sup>30,37</sup> A citrulinização de histonas é um passo importante na produção de NETs, e a resposta a antígenos citrulinados (por exemplo, geração de anticorpos anti-CCP) é responsável, em parte, pela quebra de tolerância imunológica observada em pacientes com AR, sendo as NETs uma fonte potencial de autoantígenos.<sup>38</sup> A quantificação de NETs no LS foi significativamente maior em pacientes com AR em comparação com pacientes com OA, permitindo-nos encontrar uma associação significativa entre os níveis de NETs e o diagnóstico de AR, com boa composição de sensibilidade e especificidade. Ao avaliar o soro de pacientes com AR

e controles saudáveis, outros estudos encontraram uma sensibilidade de 91% a 92% e uma especificidade de 56% a 92% para o diagnóstico de AR.<sup>20,37</sup> Da mesma forma que a survivina, as NETs sinoviais não foram associadas a erosões ósseas em pacientes com AR, embora para ambas as variáveis experimentais uma tendência para significância estatística pôde ser notada. Além disso, não encontramos correlação entre os valores séricos de anti-CCP e NETs no LS.

NETs contendo elastase podem também gerar degradação da cartilagem articular e induzir a liberação de peptidilarginina deaminase-2 (PAD2) por fibroblastos sinoviais. Posteriormente estes fragmentos de cartilagem citrulinizados são internalizados por fibroblastos sinoviais e apresentados para células T CD4 específicas.<sup>39,40</sup> Fibroblastos sinoviais expressam receptores *toll-like* e podem atuar também como células apresentadoras de antígenos. A internalização de NETs via receptor *toll-like* 9 por fibroblastos sinoviais resulta em uma maior expressão de MHC de classe II por essas células levando a um perfil pro-inflamatório. A presença de proteínas citrulinizadas em NETs também estimula a expressão de PAD4 e RANK-L em fibroblastos sinoviais.<sup>41</sup>

A contagem total e diferencial de leucócitos não se correlacionou com survivina ou NETs no LS do grupo AR. Não encontramos investigação semelhante para comparar esses achados. Por outro lado, obtivemos uma correlação positiva moderada entre a contagem total de leucócitos e NETs no LS para o Grupo OA. Embora seja um resultado inédito, devido ao pequeno número de pacientes com OA e o fato de não ser nosso objetivo inicial, não o discutiremos em profundidade.

Neutrófilos saudáveis sofrem netose *in vitro* sob estimulação com IL-6.<sup>42</sup> A PCR é produzida no fígado em resposta a citocinas inflamatórias, principalmente IL-6. Encontramos uma correlação moderada entre PCR sérica e NETs sinoviais. A fim de ainda investigar esse fenômeno, encontramos uma correlação positiva moderada entre a PCR sérica e IL-6 sinovial, embora esta avaliação não tenha sido um dos objetivos deste estudo. Devemos ter cautela ao avaliar esses dados porque as

correlações entre PCR e NETs nunca foram testadas no soro ou em LS de pacientes com AR e pode ser objeto de um estudo futuro.

Tendo em vista as razões de verossimilhança obtidas, a dosagem de survivina e NETs no LS resultou, para ambos, em uma probabilidade modesta para o diagnóstico de AR. Uma vez que a diferenciação clínica entre AR e OA quase nunca é um desafio para o reumatologista, devemos destacar o potencial de ambos os componentes para a elucidação dos mecanismos da doença e menos para uma aplicação direta na prática clínica diária.

Finalmente, não houve correlação entre survivina e NETs no LS. Isso pode ser devido ao fato de que esses dois fenômenos são, de fato, independentemente relacionados na fisiopatologia da AR. Além disso, a resistência à apoptose na AR ocorre por diversos mecanismos e não é certo que o efeito da survivina na atividade das caspases seja relevante em todos os pacientes ou em todos os estágios da doença (por exemplo, AR inicial vs estabelecida).

Este estudo teve algumas limitações: a ampla faixa de tempo da doença e a grande variabilidade de terapias para o grupo AR; survivina e NETs não foram medidos concomitantemente em amostras de sangue periférico; e não avaliamos a taxa de apoptose de neutrófilos no LS.

## **7 CONCLUSÃO**

Nesta coorte, survivina e NETs sinoviais foram biomarcadores independentes para o diagnóstico de AR, mas não para sua gravidade ou atividade. Não houve correlação entre survivina e NETs no LS, pelo que supomos que a resistência à apoptose, mediada pela survivina, e a netose estão independentemente relacionadas a fisiopatologia da AR. Correlações entre survivina no LS e anti-CCP sérico, e entre NETs no LS e PCR sérica adicionam informações à fisiopatologia da AR e sugerem novas oportunidades de investigação

## 8 REFERÊNCIAS:

1. Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2016;388:2023-38
2. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Eng. J Med*. 2011; 365, 2205-19.
3. Wright HL, Lyon M, Chapman EA, Moots RJ, Edwards SW. Rheumatoid Arthritis Synovial Fluid Neutrophils Drive Inflammation Through Production of Chemokines, Reactive Oxygen Species, and Neutrophil Extracellular Traps. *Front Immunol*. 2021;11:584116.
4. Malemud CJ. Defective T-Cell Apoptosis and T-Regulatory Cell Dysfunction in Rheumatoid Arthritis. *Cells*. 2018;7:223.
5. Gravina et al, Survivin in autoimmune diseases, *Autoimmunity Reviews*. 2017 16(8) 845–855.
6. Svensson et al, Increased expression of proto-oncogene survivin predicts Joint destruction and persistent disease activity in early rheumatoid arthritis. *Ann Med*. 2010; 42(1), 45-54.
7. Levitsky et al. Serum survivin predicts responses to treatment in active rheumatoid arthritis: a post hoc analysis from the SWEFOT trial. *BMC Med*. 2015; 13, 247.
8. Ayubi et al. Serum interleukin-6 and survivin levels predict clinical response to etanercept treatment in patients with established rheumatoid arthritis: Methodological issues. *Mod Rheumatol*. 2018; 2, 380.
9. Shi et al. Serum interleukin-6 and survivin levels predict clinical response to etanercept treatment in patients with established rheumatoid arthritis, *Mod Rheumatol*. 2018; 28, 126-132.

10. Ahn JK, Oh JM, Lee J, Bae EK, Ahn KS, Cha HS, Koh EM. Increased extracellular survivin in the synovial fluid of rheumatoid arthritis patients: fibroblast-like synoviocytes as a potential source of extracellular survivin. *Inflammation*. 2010;33:381-8.
11. Chen D, Liu D, Liu D, He M, Peng A, Xu J, Xu J, et al. Rheumatoid Arthritis Fibroblast-like Synoviocyte Suppression Mediated by PTEN Involves Survivin Gene Silencing. *Sci Rep*. 2017; 7:367.
12. Fresneda Alarcon M, McLaren Z, Wright HL. Neutrophils in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus: Same Foe Different M.O. *Front Immunol*. 2021;12:649693.
13. Freemont AJ, Denton J. Disease distribution of synovial fluid mast cells and cytophagocytic mononuclear cells in inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis*. 1985;44:312-5
14. Ottonello L, Frumento G, Arduino N, Bertolotto M, Mancini M, Sottofattori E, Dallegri F, Cutolo M. Delayed neutrophil apoptosis induced by synovial fluid in rheumatoid arthritis: role of cytokines, estrogens, and adenosine. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;966:226-31.
15. Raza K, Scheel-Toellner D, Lee CY, Pilling D, Curnow SJ, Falciani F, Trevino V, Kumar K, Assi LK, Lord JM, Gordon C, Buckley CD, Salmon M. Synovial fluid leukocyte apoptosis is inhibited in patients with very early rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2006;8:R120.
16. Wright HL, Moots RJ, Edwards SW. The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2014;10:593-601.
17. Thiam HR, Wong SL, Qiu R, Kittisopikul M, Vahabikashi A, Goldman AE et al. NETosis proceeds by cytoskeleton and endomembrane disassembly and PAD4-mediated chromatin decondensation and nuclear envelope rupture. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117:7326-37.
18. Chen W, Wang Q, Ke Y, Lin J. Neutrophil Function in an Inflammatory Milieu of Rheumatoid Arthritis. *J Immunol Res*. 2018:8549329.
19. Fox DA, Gizinski A, Morgan R, Lundy SK. Cell-cell interactions in rheumatoid arthritis synovium. *Rheum Dis Clin North Am*. 2010;36:311-23.

20. Sur Chowdhury C, Giaglis S, Walker UA, Buser A, Hahn S, Hasler P. Enhanced neutrophil extracellular trap generation in rheumatoid arthritis: analysis of underlying signal transduction pathways and potential diagnostic utility. *Arthritis Res Ther.* 2014;16:R122.
21. Aletaha et al. The 2010 American College of Rheumatology / European League Against Rheumatism Classification Criteria for Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum.* 62 (9), 2569-81. Setembro, 2010.
22. Mota et al. Diretrizes para o diagnóstico da artrite reumatoide. *Rev. Bras. Reumatol.* 2013; 53 (2), 141-157.
23. Altman et al. Development criteria for the classification and reporting of osteoarthritis: Classification of osteoarthritis of the knees. *Arthritis Rheum.* 1989 29 (80), 1039-49.
24. Smolen et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update. *Ann Rheum Dis.* 2017; 76(6), 960-977.
25. Hasegawa et al. Assessment of Disease Activity, Structural Damage, and Function in Rheumatoid Arthritis. *Methods Mol Biol.* 2018; 1868, 243-50.
26. Bokarewa M, Lindblad S, Bokarew D, Tarkowski A. Balance between survivin, a key member of the apoptosis inhibitor family, and its specific antibodies determines erosivity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2005;7:R349-58.
27. Isgren A, Forslind K, Erlandsson M, Axelsson C, Andersson S, Lund A, Bokarewa M. High survivin levels predict poor clinical response to infliximab treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum.* 2012;41:652-7.
28. Altnauer F, Martinelli S, Yousefi S, Thürig C, Schmid I, Conway EM, Simon HU, et al. Inflammation-associated cell cycle-independent block of apoptosis by survivin in terminally differentiated neutrophils. *J Exp Med.* 2004;199:1343-54.

29. Cross A, Barnes T, Bucknall RC, Edwards SW, Moots RJ. Neutrophil apoptosis in rheumatoid arthritis is regulated by local oxygen tensions within joints. *J Leukoc Biol.* 2006;80:521-8.
30. Parsonage G, Filer A, Bik M, Hardie D, Lax S, Howlett K, Church LD, Raza K, Wong SH, Trebilcock E, Scheel-Toellner D, Salmon M, Lord JM, Buckley CD. Prolonged, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-dependent, neutrophil survival following rheumatoid synovial fibroblast activation by IL-17 and TNF $\alpha$ . *Arthritis Res Ther.* 2008;10(2):R47.
31. Chun-Lai T, Murad S, Erlandsson MC, Hussein H, Sulaiman W, Dhaliwal JS, Bokarewa MI. Recognizing rheumatoid arthritis: oncoprotein survivin opens new possibilities: a population based case-control study. *Medicine (Baltimore).* 2015;94:e468.
32. Chen X, Duan N, Zhang C, Zhang W. Survivin and Tumorigenesis: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies. *J Cancer.* 2016;7:314-23.
33. Inazuka M, Tahira T, Horiuchi T, Harashima S, Sawabe T, Kondo M, Hayashi K, et al. Analysis of p53 tumour suppressor gene somatic mutations in rheumatoid arthritis synovium. *Rheumatology (Oxford).* 2000;39:262-6.
34. Firestein GS, Echeverri F, Yeo M, Zvaifler NJ, Green DR. Somatic mutations in the p53 tumor suppressor gene in rheumatoid arthritis synovium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:10895- 900.
35. Kontny E, Rudnicka W, Chorazy-Massalska M, Marcinkiewicz J, Maśliński W. Taurine chloramine inhibits proliferation of rheumatoid arthritis synoviocytes by triggering a p53- dependent pathway. *Inflamm Res.* 2006;55:446-55
36. Baraka, EAA, El Din, MS, El Shambky, A, Fouad NA, Abdelkader MA. Serum and synovial survivin in rheumatoid arthritis: Relation to disease activity and severity. *Egypt Rheumatol Rehabil.* 2019;46,221-8.
37. Wang W, Peng W, Ning X. Increased levels of neutrophil extracellular trap remnants in the serum of patients with rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis.* 2018;21:415-21.
38. Khandpur R, Carmona-Rivera C, Vivekanandan-Giri A, Gizinski A, Yalavarthi S, Knight JS, Kaplan MJ, et al. NETs are a source of citrullinated autoantigens and

- stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med.* 2013;5:178ra40
39. Carmona-Rivera C, Carlucci PM, Goel RR, James E, Brooks SR, Rims C, Hoffmann V, Fox DA, Buckner JH, Kaplan MJ. Neutrophil extracellular traps mediate articular cartilage damage and enhance cartilage component immunogenicity in rheumatoid arthritis. *JCI Insight.* 2020 Jul 9;5(13):e139388.
  40. Carmona-Rivera C, Carlucci PM, Moore E, Lingampalli N, Uchtenhagen H, James E, Liu Y, Bicker KL, Wahamaa H, Hoffmann V, Catrina AI, Thompson P, Buckner JH, Robinson WH, Fox DA, Kaplan MJ. Synovial fibroblast-neutrophil interactions promote pathogenic adaptive immunity in rheumatoid arthritis. *Sci Immunol.* 2017;2(10):eaag3358
  41. Fan LY, He DY, Wang Q, Zong M, Zhang H, Yang L, et al. Citrullinated vimentin stimulates proliferation, pro-inflammatory cytokine secretion, and PADI4 and RANKL expression of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Scand J Rh.* 2012;41(5):354-8.
  42. Joshi MB, Lad A, Bharath Prasad AS, Balakrishnan A, Ramachandra L, Satyamoorthy K. High glucose modulates IL-6 mediated immune homeostasis through impeding neutrophil extracellular trap formation. *FEBS Lett.* 2013;587:2241-6.

## **ANEXOS**

### **Anexo A – Parecer consubstanciado do CEP**

#### **DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE SURVIVINA NO LÍQUIDO SINOVIAL DE PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE E CORRELAÇÃO COM ARMADILHAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS.

**Pesquisador:** FLAVIO FALCAO LIMA DE SOUZA

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 30237320.1.0000.5440

**Instituição Proponente:** HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RPUSP

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### **DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 4.022.664

#### **Apresentação do Projeto:**

PROJETO DE DOUTORADO, PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CLÍNICA MÉDICA, FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO, UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO.

ALUNO: FLÁVIO FALCÃO LIMA DE SOUZA

ORIENTADOR: RENÉ DONIZETI RIBEIRO  
DE OLIVEIRA

#### **RESUMO**

Artrite reumatoide (AR) é uma doença crônica de natureza inflamatória caracterizada pelo acometimento simétrico das articulações periféricas. Um dos fatores que podem ser implicados na gênese da doença e na falha do tratamento instituído é a resistência à apoptose das células que compõem o infiltrado inflamatório sinovial, conhecido como pannus. O estudo de

marcadores de gravidade e falha terapêutica, como a proteína anti-apoptótica survivina, vem ganhando destaque. Realizaremos um estudo transversal observacional em pacientes com AR seguidos em um ambulatório de nível terciário. Serão selecionados 30 pacientes de ambos os sexos com indicação de punção articular para análise do líquido sinovial ou realização de tratamento intra-articular. Neste grupo avaliaremos no líquido sinovial os níveis de survivina e a formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs, do inglês Neutrophil Extracellular Traps). Para comparação, serão estudados os líquidos sinoviais de 30 indivíduos com osteoartrite (OA) que necessitarão de punção articular para análise de líquido sinovial ou tratamento intra-articular. Os objetivos do projeto são: avaliar se há diferenças entre os grupos de pacientes com AR e OA com relação aos parâmetros avaliados (survivina e NET); se há correlação entre atividade da doença e os valores de survivina e a ocorrência de NET no líquido sinovial dos pacientes do grupo AR.

O projeto esta bem formatado. A introducao é curta, direta e objetiva.

**Objetivo da Pesquisa:**

Estudar a relacao entre o nivel de survivina e a ocorrencia de NET no liquido sinovial de dois grupos de pacientes, AR e osteoartrite (OA), realizando comparacoes intra e intergrupos.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os proponentes acrescentaram o risco de perda de anonimato. As descrições se encontram adequadas nesta versão do projeto e TCLE.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Considerações relevantes foram inseridas. Os pesquisadores apresentaram justificativa para o cálculo amostral e seguiram o guideline STROBE para descrição dos desfechos e outros elementos importantes.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O TCLE foi readequado e encontra-se dentro das normas da CONEP.

**Recomendações:**

Não há.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Considero a nova versão adequada. Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, o projeto de pesquisa versão 02 de 05 de maio de 2020, assim como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido versão 2, 20 de abril de 2020, podem ser enquadrados na categoria APROVADO.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP,

relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

| Tipo Documento  | Arquivo                                       | Postagem               | Autor                          | Situação |
|---|---|------------------------|--------------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto                            | PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1462915.pdf | 05/05/2020<br>12:55:41 |                                | Aceito   |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador                 | BROCHURACEP05052020.docx                      | 05/05/2020<br>12:55:05 | FLAVIO FALCAO<br>LIMA DE SOUZA | Aceito   |
| Outros  | cartaaoccep.docx                              | 27/04/2020<br>14:28:07 | FLAVIO FALCAO<br>LIMA DE SOUZA | Aceito   |
| Folha de Rosto  | folhaderosto.pdf                              | 27/04/2020<br>14:19:45 | FLAVIO FALCAO<br>LIMA DE SOUZA | Aceito   |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | tcle27042020.docx                             | 27/04/2020<br>14:14:48 | FLAVIO FALCAO<br>LIMA DE SOUZA | Aceito   |
| Outros  | chefdepatartamentonovo.pdf                    | 06/04/2020<br>15:46:35 | FLAVIO FALCAO<br>LIMA DE SOUZA | Aceito   |
| Orçamento   | orCamento.docx                                | 03/03/2020<br>16:27:54 | FLAVIO FALCAO<br>LIMA DE SOUZA | Aceito   |

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RIBEIRAO PRETO, 12 de  
Maio de 2020

---

**Assinado por:**  
**MARCIA GUIMARÃES**  
**VILLANOVA**  
**(Cordenador(a))**

## **ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

### **HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

Campus Universitário Monte Alegre, fone: 36366-1000, Fax: 3633-1144

CEP: 14048-900, Ribeirão Preto, São Paulo

#### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

PROJETO DE PESQUISA: “AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE SURVIVINA NO LÍQUIDO SINOVIAL DE PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE E CORRELAÇÃO COM NETOSE.”

Você está sendo convidado a participar dessa pesquisa porque recentemente recebeu o diagnóstico de uma doença chamada ARTRITE REUMATOIDE. Ela é causada por uma alteração em seu próprio organismo (no sistema imunológico), que passou a causar inflamação em suas articulações, gerando dor, inchaço e calor. Se não for tratada adequadamente, a doença pode deixar sequelas. Para um melhor entendimento de como tratar a doença, várias pesquisas estão em desenvolvimento e algumas delas realizam exames para avaliar a presença de algumas substâncias no líquido das juntas. Entre essas substâncias estão a proteína survivina e a NETose (uma alteração de um dos tipos de glóbulos brancos do sangue, os neutrófilos).

Caso aceite participar do estudo, iremos utilizar uma pequena quantidade do líquido (2 mL) que será colhido de sua junta, conforme indicação da equipe médica que o atendeu.

Para a coleta deste líquido uma agulha será introduzida dentro de sua articulação, após limpeza da pele com antissépticos e podem ser injetadas dentro da sua junta medicamentos anti-inflamatórios e anestésicos. Este procedimento pode resultar em dor no local, infecções ou sangramentos e dura cerca de 10 minutos. Neste líquido avaliaremos as duas substâncias relacionadas acima.

Como utilizaremos o líquido que será coletado de sua junta por necessidade para o tratamento da sua doença, você não será submetido(a) a nenhum procedimento adicional. O único risco a que você será submetido ao participar da pesquisa é o de quebra do sigilo de informações contidas no seu prontuário, porém a equipe de pesquisa tomará todos os cuidados para que as informações contidas em seu prontuário não sejam acessadas por terceiros. Por outro lado, participar da pesquisa também não trará benefícios diretos para seu tratamento.

Gostaria de enfatizar que você está sendo CONVIDADO, e a participação na pesquisa é completamente VOLUNTÁRIA. Você pode se negar a participar dessa pesquisa e isso não lhe trará qualquer prejuízo para seu tratamento pela equipe de reumatologia. Ou seja, você continuará com seu seguimento médico contínuo e gratuito, independente da participação no estudo. Os dados coletados serão mantidos sob sigilo médico e serão utilizados apenas para fins de pesquisa.

O estudo será feito no ambulatório de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, toda quarta-feira, em horário de funcionamento do ambulatório (7:30 às 12:00 horas). Em caso de dúvida, o contato poderá ser feito com o Dr. Flávio Falcão Lima de Souza (médico assistente da disciplina de Reumatologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto e realizador do estudo), neste mesmo endereço ou pelo telefone (16) 996081326.

Um Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) é composto por um grupo de pessoas que são responsáveis por supervisionarem pesquisas em seres humanos que estão sendo feitas na instituição e tem a função de proteger e garantir os direitos, a segurança e o bem-estar de

todos os participantes de pesquisa que se voluntariam a participar da mesma. O CEP do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto está localizado no Subsolo do Hospital e funciona das 8:00 às 17:00. O telefone de contato é o (16) 3602-2228.

Caso você tenha sido devidamente orientado(a) quanto à proposta do estudo, como será a sua participação, bem como os riscos e benefícios, assine nas duas linhas abaixo:

“Eu,

\_\_\_\_\_, no dia  
\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_, concordo voluntariamente em participar deste estudo, sabendo que poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem qualquer penalidade ou prejuízo no meu atendimento no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. Declaro ainda que recebi uma via dia desse termo de consentimento devidamente assinada pelo pesquisador responsável.”

Assinatura do paciente ou responsável legal:

\_\_\_\_\_

Nome do paciente ou responsável legal:

\_\_\_\_\_

Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Assinatura da testemunha:

\_\_\_\_\_

Nome da testemunha:

\_\_\_\_\_

Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo:

---

Nome do responsável pelo estudo:

---

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Se houver alguma dúvida quanto à parte ética do projeto, entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa, localizado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto Campus Universitário s/n Monte Alegre – Ribeirão Preto, SP, telefone: (16) 3602-2228 ou pelo email: [cep@hcrp.fmrp.usp.br](mailto:cep@hcrp.fmrp.usp.br)

## ANEXO C – Comprovante de submissão do artigo

R Rheumatology <onbehalf@manuscriptcentral.com>   
Para: reneimuno@yahoo.com.br Ter, 03/05/2022 08

03-May-2022

All co-authors have received a copy of this e-mail

Dear Dr de Oliveira,

Thank you for submitting your manuscript "Synovial Fluid Survivin and NETs as Independent Biomarkers in Rheumatoid Arthritis" to Rheumatology. The paper will now be considered by the editorial team and forwarded for peer review if appropriate. The Editor will inform you of his decision as quickly as possible. This paper is being considered on the understanding it has not been submitted or published elsewhere. The editorial process normally takes four to six weeks, although delays do occur from time to time, particularly in finding appropriate referees who will agree to review the manuscript promptly.

Your paper has been assigned manuscript number RHE-22-0969. The full list of authors is: de Souza, Flávio ; Schneider, Ayda; Cavalcante Machado, Caio; de Almeida, Sérgio Couto Luna; Silva, Tarcília; Cunha, Fernando; Louzada-Junior, Paulo; de Oliveira, René Donizeti Ribeiro.

You may view the status of your manuscript at any time by logging on to your account at Rheumatology ScholarOne Manuscripts (<https://mc.manuscriptcentral.com/rheumatology>). Your manuscript will be assigned the status 'With Associate Editor' until the review process is complete and a decision has been made, whereupon the decision will be posted on your account.

OPTIONAL OPEN ACCESS: Please note that if your manuscript is accepted for publication in Rheumatology, you will have the option, at an additional charge, to make your paper freely available online immediately upon publication, under the Oxford Open initiative (see <http://www.oxfordjournals.org/oxfordopen/>). Applicable Oxford Open charges can be found in the Authors Instructions [http://www.oxfordjournals.org/brheum/for\\_authors/index.html](http://www.oxfordjournals.org/brheum/for_authors/index.html). Please note that authors are not asked to make this decision until after acceptance of their manuscript and hence it is not part of the editorial process.

If you need to contact the Editorial Office for any reason, please be prepared to quote the reference number for your manuscript.

We will not use your data for any other purpose apart from assigned tasks and for administration within ScholarOne Manuscripts and for reporting of the scholarly record, unless otherwise requested. Your data will remain in the system to ensure a clear audit trail, but may be deleted if requested.

Yours sincerely,

Rheumatology Editorial Office

