

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

THAÍSE OLIVEIRA QUARESMA

**Avaliação da concentração sinovial do ligante do receptor ativador
do fator nuclear kappa B e da osteoprotegerina em pacientes com
artropatias crônicas**

Ribeirão Preto

2023

THAÍSE OLIVEIRA QUARESMA

**Avaliação da concentração sinovial do ligante do receptor ativador
do fator nuclear kappa B e da osteoprotegerina em pacientes com
artropatias crônicas**

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

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

2023

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.

FICHA CATALOGRÁFICA

Quaresma, Thaíse Oliveira

Avaliação da concentração sinovial do ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B e da osteoprotegerina em pacientes com artropatias crônicas. / Thaíse Oliveira Quaresma; Orientador, Renê Donizeti Ribeiro de Oliveira - 2023.

43 p.: il.; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Clínica Médica.

Orientador: Renê Donizeti Ribeiro de Oliveira.

1. Artrite, 2. Artrite reumatoide, 3. Espondiloartrite, 4. Osteoartrite, 5. OPG, 6. RANKL

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Thaíse Oliveira Quaresma

Título: Avaliação da concentração sinovial do ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B e da osteoprotegerina em pacientes com artropatias crônicas.

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: 26/05/2023

Banca examinadora

Prof. Dr. Renê Donizeti Ribeiro de Oliveira

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Assinatura _____

Prof. Dr. Eduardo Antonio Donadi

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Assinatura _____

Profa. Dra Luciana Martins de Carvalho

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Assinatura _____

Profa. Dra Gilda Aparecida Ferreira

Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais

Assinatura _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Soledade e Ivo, fonte de amor e confiança, pedra angular da minha vida.

Aos meus irmãos, Aílla e Ivo Júnior, com quem aprendo a compartilhar semelhanças e diferenças, um desafio transformador.

Aos meus avôs, Maria de Lourdes e José Teixeira, por serem exemplos de afeto e vínculo.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Renê, por todo apoio e incentivo. Agradeço pelo acolhimento, ainda quando era residente de clínica médica e tive o primeiro contato com o serviço de reumatologia. O seu entusiasmo em ensinar e cuidar do paciente foram grandes inspirações para escolher a especialidade. Agradeço por todo processo de aprendizado, confiança e ensinamentos, que me permitiram finalizar este ciclo. Seu apoio foi fundamental para minha formação profissional, acadêmica e ética.

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

A Livia Maria Cordeiro Simões Ambrósio pela assistência técnica e companhia no laboratório.

Aos meus queridos Amigos, sempre presentes, mesmo quando estávamos distantes.

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

RESUMO

QUARESMA, T. Avaliação da concentração sinovial do ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B e da osteoprotegerina em pacientes com artropatias crônicas. 2023. 43 p. Tese (Doutorado em Clínica Médica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Introdução: Nas artropatias crônicas, diversos são os mecanismos de destruição articular. Nos últimos anos, estudos relataram a implicação do ligante do receptor do fator nuclear kappa B (RANKL) e da osteoprotegerina (OPG) no processo de ativação e diferenciação de osteoclastos, células fundamentais para ocorrência de erosão óssea. A razão RANKL/OPG é aumentada no soro de pacientes com neoplasia e doença óssea lítica, assim como na artrite reumatoide (AR). **Objetivos:** Dosar e comparar a concentração de OPG e RANKL no líquido sinovial (LS) de pacientes com AR, espondiloartrites (EpA) e osteoartrite (OA). **Métodos:** Estudo observacional e transversal com 83 pacientes, sendo 33 com AR, 32 com EpA e 18 com OA, seguidos regularmente nos ambulatórios da Disciplina de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- USP. Todos tiveram indicação de artrocentese pelos médicos assistentes, momento em que o LS foi coletado, e foram avaliados quanto a variáveis demográficas e medicações em uso. A atividade de doença foi avaliada nos indivíduos com AR e EpA. A quantificação de OPG e RANKL no LS foi realizada através de ELISA e os resultados, testados para correlação com parâmetros clínicos, laboratoriais e presença de cistos ou erosões em radiografias. **Resultados:** Não encontramos diferença com significância estatística na dosagem de RANKL e OPG entre os grupos. Pacientes com AR apresentaram correlação positiva de celularidade no LS com RANKL ($r=0,59$; $p<0,05$) e razão RANKL/OPG ($r=0,55$; $p<0,05$). Pacientes com OA apresentaram correlação forte de proteína C-reativa (PCR) com RANKL/OPG ($r=0,82$; $p<0,05$). Não houve correlação entre as dosagens de OPG e RANKL com provas de atividade inflamatória ou índice de atividade de doença, nos pacientes com AR ou EpA. **Conclusão:** Nesse grupo de pacientes, foi observada correlação da razão RANKL/OPG com celularidade do LS em AR e PCR sérica em pacientes com OA. Os níveis de RANKL, OPG e razão RANKL/OPG não foram capazes de diferenciar os três grupos de indivíduos com artropatia crônica estudados.

Palavras-chave: artrite, artrite reumatoide, espondiloartrite, osteoartrite, OPG, RANKL

ABSTRACT

QUARESMA, T. **Evaluation of synovial concentration of nuclear factor kappa B activating receptor ligand and osteoprotegerin in patients with chronic arthropathies.** 2023. 43 pg. Dissertation (Doctorate in Internal Medicine) – Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Introduction: In chronic arthropathies, there are several mechanisms of joint destruction. In recent years, studies have reported the implication of receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) in the process of activation and differentiation of osteoclasts, a key cell in the development of bone erosion. The RANKL/OPG ratio is increased in the serum of patients with malignant diseases and lytic bone disease, as well as rheumatoid arthritis (RA). The objective of this study was to measure and compare the concentrations of OPG and RANKL in the synovial fluid (SF) of patients RA, spondyloarthritis (SpA) and osteoarthritis (OA).

Methods: This was an observational and cross-sectional study with 83 patients, 33 with RA, 32 with SpA and 18 with OA, followed up regularly in the outpatient clinics of the Rheumatology Department of the Clinics Hospital of the Ribeirão Preto Medical School-USP. All patients were assessed for indications for arthrocentesis by the attending physicians at the time of SF collection and were evaluated for demographic variables and medication use. Disease activity was assessed in individuals with RA and SpA. The quantification of SF OPG and RANKL levels was performed by ELISA, and the correlations of the results with clinical, laboratory and the presence of cysts or erosion on radiographs were assessed. **Results:** We found no statistically significant difference in the RANKL and OPG levels among the groups. Patients with RA showed a positive correlation between the SF cell count and RANKL level ($r = 0.59$; $p < 0.05$) and the RANKL/OPG ratio ($r = 0.55$; $p < 0.05$). Patients with OA showed a strong correlation between C-reactive protein (CRP) and the RANKL/OPG ratio ($r = 0.82$; $p < 0.05$). There was no correlation between the OPG and RANKL levels and markers of inflammatory activity or the disease activity index in patients with RA or SpA.

Conclusion: Within this patient cohort, the RANKL/OPG ratio was correlated with the SF cell count in patients with RA and with serum CRP in patients with OA. The levels of RANKL, OPG e RANKL/OPG ratio were not able of differentiate the three groups of individuals with chronic arthropathy studied.

Keywords: Arthritis, Rheumatoid Arthritis, Spondyloarthropathy, Osteoarthritis, OPG Protein, RANKL Protein

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características clínicas, laboratoriais e radiográficas dos pacientes do estudo	26
Tabela 2 - Comparação de RANKL, OPG e razão RANKL/OPG dos pacientes do estudo	27
Tabela 3 - Comparação de RANKL, OPG e razão RANKL/OPG de acordo com atividade de doença	28
Tabela 4 - Correlação de RANKL, OPG e RANKL/OPG com parâmetros laboratoriais e radiográficos	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Regulação da diferenciação de osteoclastos por células da linhagem de osteoblastos.....	15
Figura 2 - Eventos locais e sistêmicos na inflamação crônica	16
Figura 3 - Fluxograma de inclusão.....	21
Figura 4 - Correlação de PCR com OPG e RANKL nos pacientes com atropatia crônica	31

LISTA DE ABREVIATURAS

ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
Anti-CCP	Anticorpo anti-peptídeo citrulinado cíclico
APs	Artrite psoriásica
AR	Artrite Reumatoide
ARe	Artrite reativa
ASAS	<i>Assessment of SpondyloArthritis International Society</i>
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos
DAS 28	<i>Disease Activity Score counting 28 joints</i>
DMARD	Droga Modificadora de Doenças Reumáticas
EA	Espondilite anquilosante
EULAR	<i>European League Against Rheumatism</i>
FR	Fator Reumatoide
HLA	<i>Human leu kocyte antigen</i>
IL	Interleucinas
LS	Líquido Sinovial
MMCDb	Medicação modificadora do curso da doença biológica
MMCDs	Medicação modificadora do curso da doença sintética
OA	Osteoartrite
OPG	Osteoprotegerina
PCR	Proteína C -reativa
RANK	Receptor ativador do fator nuclear kappa B
RANKL	Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B
TLR	<i>Toll-like receptors</i>
TNF	Fator de Necrose Tumoral
VHS	Velocidade de Hemossedimentação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 JUSTIFICATIVA	18
3 OBJETIVOS	19
3.1 Primário	19
3.2 Secundários	19
4 PACIENTES E MÉTODOS	20
4.1 Desenho do estudo	20
4.2 Participantes	20
4.3 Critérios de inclusão	21
4.4 Critérios de exclusão	22
4.5 Aspectos éticos	22
4.6 Avaliação Clínica	22
4.7 Avaliação radiográfica	23
4.8 Avaliação laboratorial	23
4.9 Procedimentos experimentais	24
4.10 Análise estatística	24
5 RESULTADOS	24
5.1 Dados clínicos e laboratoriais	24
5.2 RANKL, OPG e razão RANKL/OPG no líquido sinovial	26
5.3 Correlações com parâmetros laboratoriais e radiográficos	29
6 DISCUSSÃO	32
7 CONCLUSÃO	35
8 REFERÊNCIAS	36
ANEXOS	40
ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	40
ANEXO B - Artigo publicado	43

1 INTRODUÇÃO

As artropatias crônicas são um conjunto heterogêneo de doenças caracterizadas por ampla variedade de inflamação sinovial. Entre as principais artropatias crônicas estão as imuno-mediadas, como a artrite reumatoide (AR) e o grupo das espondiloartrites (EpA), e a osteoartrite primária (OA), o melhor exemplo de artropatia primariamente degenerativa [1]. Todas podem levar à disfunção articular, com diferentes graus de morbidade [2]. Essas doenças compartilham eventos na patogênese da lesão articular, como destruição da cartilagem, formação de cistos subcondrais e erosão óssea [3-5]. Na AR, a erosão está diretamente relacionada com a progressão da disfunção articular [6-7]. Na EpA, além da erosão, o processo inflamatório leva a neoformação óssea [2]. Na OA, os cistos subcondrais são comuns na doença de longo prazo e erosões articulares não são tão frequentes, apesar de observadas em um pequeno subconjunto de pacientes [8].

A AR é uma das doenças reumáticas mais comuns e principal causa de poliartrite crônica, acomete de 0,5 a 1,0% da população adulta do mundo, com maior incidência entre as mulheres [3]. É caracterizada por sinovite proliferativa, instala-se de maneira insidiosa e progressiva, afeta principalmente articulações de mãos, punhos e pés, provocando dor, edema e incapacidade, podendo levar à destruição da cartilagem e do osso [3]. Citocinas encontradas no tecido sinovial, como fator de necrose tumoral (TNF), interleucinas (IL), -1β e -6 e o fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF) promovem a diferenciação e ativação de osteoclastos, aumentando a osteoclastogênese e a reabsorção óssea. Este processo resulta na erosão óssea, marcador de gravidade da doença [6].

O termo espondiloartrites (EpA) é utilizado para descrever um grupo de doenças inflamatórias que apresentam características clínicas comuns, embora nem sempre concomitantes, como comprometimento inflamatório axial (espondilite e sacroiliíte), artrite periférica, dactilite, entesite, distrofia ungueal e manifestações extra-articulares (uveíte, doença inflamatória intestinal e psoríase) [4]. Atualmente, fazem parte deste grupo a espondilite anquilosante (EA), a artrite reativa (ARe), a artrite psoriásica (APs), a artrite enteropática e as espondiloartrites indiferenciadas. São classificadas em EpA axiais e periféricas, a depender do comprometimento articular predominante. As EpA, quando combinadas, têm prevalência comparável à da AR, acometendo cerca de 0,5 a 1,4% da população geral [4].

Enquanto a sinovite é a principal característica na AR, na EpA é a entesite. A entese é uma estrutura de fibrocartilagem, definida como o ponto de inserção de um tendão ou ligamento à superfície óssea. A entesite pode ser desencadeada por estresse mecânico e/ou infeccioso em pacientes geneticamente suscetíveis, como aqueles portadores de alelos HLA-B27 de suscetibilidade e com determinados polimorfismos do receptor da IL-23 [4].

A OA é a doença articular mais comum em todo o mundo, afetando cerca de 10% dos homens e 18% das mulheres com mais de 60 anos de idade [5]. Acomete uma ou várias articulações sinoviais, incluindo pequenas articulações de mãos e grandes articulações de joelho e quadril. Caracteriza-se por dor e rigidez matinal transitória nos casos leves e iniciais, até instabilidade articular e incapacidade física nos casos avançados. A definição de OA foi por muito tempo centrada nas mudanças na cartilagem articular, no entanto, este conceito evoluiu e hoje a OA é considerada uma doença de toda articulação, apresentando também alterações no osso subcondral, ligamentos, cápsula e membrana sinovial [5]. Cada vez mais, os estudos buscam identificar diferentes fenótipos da doença, que podem permitir entendimento e terapia personalizados [5].

Embora com quadros clínicos distintos, essas doenças compartilham eventos na patogênese da lesão articular, em um processo que envolve alterações na remodelação óssea, destruição do tecido ósseo e progressão da disfunção articular [6-7]. Durante a última década, a ligação entre inflamação crônica e perda óssea tem sido objeto de considerável pesquisa científica, o que levou à identificação de moléculas-chave que preenchem a lacuna entre a função imunológica e a renovação óssea, e mudou nossa compreensão de como a remodelação óssea é orquestrada [9,10].

1.1 Remodelação óssea fisiológica

Os ossos têm papel de sustentação do organismo e são reservatórios de cálcio. São um tecido dinâmico, continuamente reabsorvido e formado, em um processo controlado pela interação entre osteoblastos, osteoclastos e osteócitos [9]. Aproximadamente 10% da massa óssea é substituída anualmente em humanos [10].

Os osteoblastos produzem proteínas da matriz óssea, como colágeno tipo I, osteocalcina, sialoproteína e osteopontina, de maneira dependente do estágio de diferenciação. Osteoblastos têm meia vida de 2 a 3 meses, sofrem apoptose e

permanecem na superfície óssea como células de revestimento quiescentes, incorporam-se às proteínas da matriz óssea ou se diferenciam em osteócitos. São derivados de células mesenquimais e acredita-se que se diferenciem das mesmas células progenitoras de condrócitos, adipócitos, miócitos e fibroblastos. A diferenciação de células progenitoras para células específicas do tecido é regulada por fatores de transcrição específicos do tecido [10].

Osteoclastos são células gigantes multinucleadas, que promovem a reabsorção óssea. As células progenitoras dos osteoclastos são monócitos e células da linhagem de macrófagos [10]. A diferenciação de progenitores de osteoclastos em osteoclastos é rigidamente regulada por osteoblastos e osteócitos, que expressam o ligante do fator ativador do receptor NF-KB (RANKL) e M-CSF, necessárias para estimular a diferenciação de células progenitoras em osteoclastos. Enquanto a expressão de M-CSF por osteoblastos é constitutiva, a de RANKL é induzida por fatores de reabsorção óssea, como 1,25-diidroxi-vitamina D3 [1,25(OH)₂D₃], hormônio da paratireoide e citocinas pró-inflamatórias. Os progenitores dos osteoclastos expressam M-CSF e o ativador do receptor NF-B (RANK), facilitando a estimulação de ambos os ligantes para a diferenciação em osteoclastos. Além disso, osteoblastos e osteócitos secretam osteoprotegerina (OPG), um receptor chamariz de RANKL, que inibe a interação RANKL-RANK para suprimir a reabsorção óssea (Figura 1) [10].

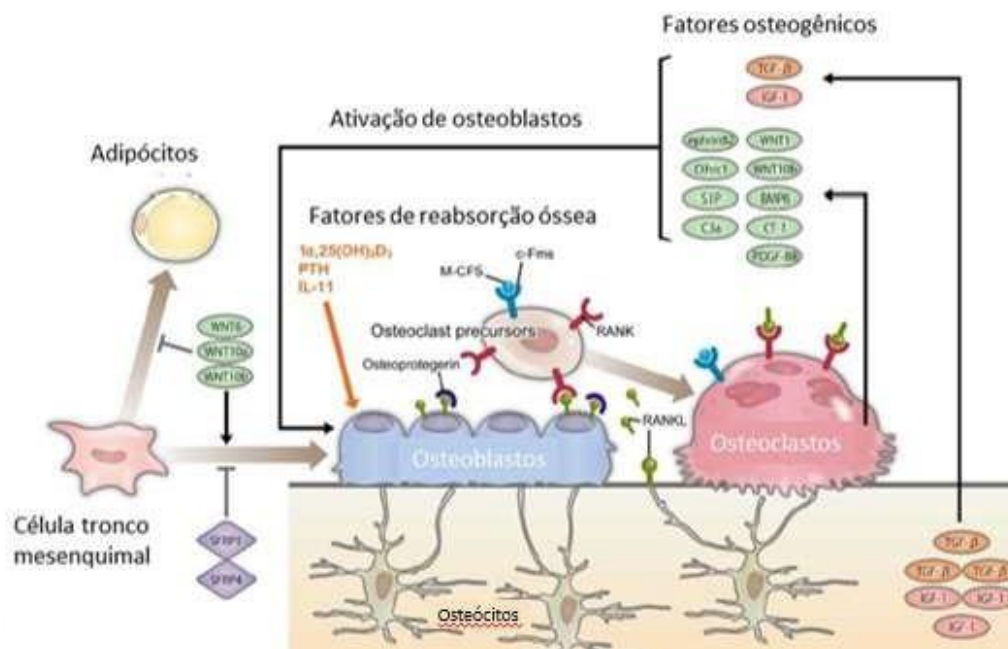


Figura 1 (Adaptado de Maeda et al 2022) Regulação da diferenciação de osteoclastos por células da linhagem de osteoblastos. Fatores de reabsorção óssea, como $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, PTH e IL-11, atuam nos osteoblastos para induzir a expressão de RANKL. Precursoros de osteoclastos expressam RANK e receptor M-CSF. Precursoros de osteoclastos reconhecem RANKL expresso por osteoblastos e osteócitos e se diferenciam em osteoclastos na presença de M-CSF. Osteoclastos maduros também expressam RANK, e RANKL induz a atividade de reabsorção óssea de osteoclastos maduros. Os osteoclastos promovem a formação óssea através da liberação de fatores de crescimento embutidos na matriz óssea, como IGF-1 e TGF- β , durante a reabsorção óssea. Além disso, os osteoclastos produzem fatores osteogênicos, como ephrinB2, Cthrc1, S1P, C3a, Wnt1, Wnt10b, BMP6, CT-1 e PDGF, que aumentam a osteoblastogênese. $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$: $1\alpha,25$ -diidroxi-vitamina D3, PTH: hormônio da paratireoide, IL: interleucina, RANKL: ligante ativador do receptor NF- κ B, RANK: ativador do receptor NF- κ B, M-CSF: fator estimulador de colônia de macrófagos, IGF-1: fator de crescimento semelhante à insulina I, TGF- β : fator de crescimento transformador beta, Cthrc1: repetição de tripla hélice de colágeno contendo 1, S1P: esfingosina-1-fosfato, BMP: proteína morfogenética óssea, CT-1: cardiotropina-1, PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas.

1.2 Remodelação óssea na inflamação crônica

Dentre os eventos celulares relacionados à destruição osteocondral nas doenças inflamatórias crônicas, destaca-se a ativação dos osteoclastos. Marcadores sinoviais e de superfície celular de osteoclastos, em ambos os casos com efeito proerosivo, são encontrados na sinóvia e nos locais de erosão óssea nas artropatias crônicas [9-10]. O RANKL e a OPG são essenciais no recrutamento e ação destas células [11]. O RANKL é uma molécula solúvel, expressa por osteoblastos/ células estromais, fibroblastos e células T ativadas e se liga diretamente ao RANK em pré osteoclastos e osteoclastos, permitindo a transdução de sinal para diferenciação de progenitores de osteoclastos, bem como ativação de osteoclastos maduros [11]. A

OPG é produzida e liberada por osteoblastos ativados e inibe a maturação e ativação dos osteoclastos (Figura 2) [2].

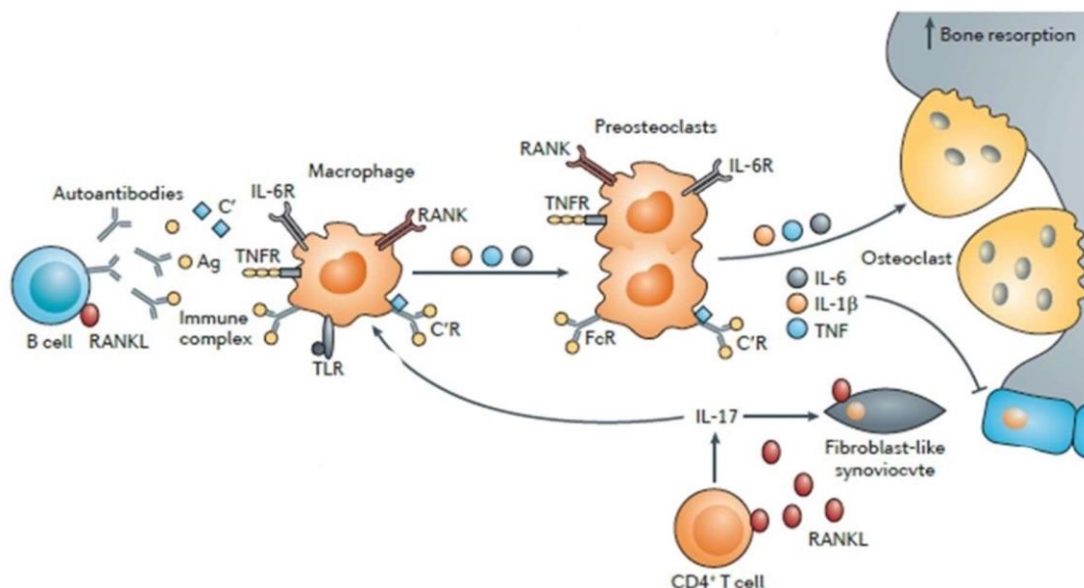


Figura 2 (Adaptado de Redlich and Smolen, 2012) Eventos locais e sistêmicos na inflamação crônica. A presença de citocinas, como IL6, IL1b e TNF, induzem Células B, células T e macrófagos ativar osteoclastos via expressão do RANKL e ativação de RANK e via secreção de citocinas osteoclastogênicas (por todos os três tipos de células). Na artrite reumatóide, a ativação local dos fibroblastos também desempenha um papel e, em todas as doenças inflamatórias crônicas, as células endoteliais e a hipervascularização podem ter efeitos adicionais. Na artrite erosiva, os osteoblastos estão de fato presentes, mas geralmente não são capazes de reparar suficientemente a destruição óssea dos osteoclastos. Ag, antígeno; C', complemento; C'R, receptor do complemento; FcR, receptor Fc; TLR, receptor do tipo Toll; TNF, fator de necrose tumoral.

A ação do RANKL pode ser bloqueada pela OPG, reduzindo a ação de osteoclastos. Dessa forma, a relação entre os níveis de RANKL e OPG é uma medida indireta da osteoclastogênese no sítio avaliado [11]. A razão RANKL/OPG encontra-se elevada no soro de pacientes com doenças malignas e lise óssea tumoral [12,13]. Razão RANKL/OPG elevada também foi observada no líquido sinovial (LS) e no soro de pacientes com AR e EpA, mas a relevância clínica desta observação ainda não está clara [14-16]. Sabe-se também que a expressão de RANKL no tecido sinovial de pacientes com AR é mais elevada na doença ativa comparada à da doença menos ativa e às EpA e OA [17,18]. Em pacientes com OA, a razão RANKL/OPG sérica pode estar relacionada com formas mais graves de doença [19].

Há poucos dados comparativos com relação à quantificação dessas proteínas no LS de indivíduos com artropatias crônicas. Comparamos a concentração sinovial de RANKL e OPG, além da razão RANKL/OPG em pacientes com AR, EpA e OA.

Além disso, avaliamos se os níveis sinoviais destas proteínas se correlacionam com provas de atividade inflamatória, índices de atividade de doença (na AR e EpA) e a presença de cistos subcondrais (na OA) e erosões ósseas.

2 JUSTIFICATIVA

Ao diagnóstico, nos períodos de elevada atividade de doença ou mesmo no curso crônico com baixa atividade, é comum o paciente reumático apresentar-se com derrame articular e indicação de artrocentese (diagnóstica ou terapêutica). Não há estudos com avaliação comparativa da dosagem da concentração de RANKL, OPG e razão RANKL/OPG no LS de pacientes com AR, EpA e OA. Essas proteínas e a razão entre elas tem potencial para tornar-se biomarcador de atividade de doença e gravidade do dano articular.

3 OBJETIVOS

3.1 Primário

Dosar e comparar a concentração de RANKL, OPG e a razão RANKL/OPG no LS de pacientes com AR, EpA e OA.

3.2 Secundários

Avaliar se existe correlação entre a concentração sinovial de RANKL, OPG e razão RANKL/OPG e a velocidade de hemossedimentação (VHS), a proteína C-reativa (PCR) sérica e a contagem diferencial de leucócitos no LS.

Para o grupo AR, avaliar se há correlação entre a concentração sinovial de RANKL, OPG e razão RANKL/OPG e o índice de atividade de doença DAS 28 (*Disease Activity Score counting 28 joints*) e a presença de erosão na radiografia de mãos.

Para o grupo EpA, avaliar se há correlação entre a concentração sinovial de RANKL, OPG, razão RANKL/OPG e o índice de atividade de doença DAS28, ou com ASDAS-PCR, se acometimento axial predominante.

Para o grupo de OA, avaliar se há correlação entre a concentração sinovial de RANKL, OPG e razão RANKL/OPG e a presença de cistos subcondrais ou erosões na radiografia de mãos e joelhos.

Avaliar se a concentração sinovial de RANKL, OPG e razão RANKL/OPG podem ser distintas do quadro clínico das doenças investigadas nos três grupos.

4 PACIENTES E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

Realizamos um estudo observacional e transversal, por amostragem de conveniência, no qual foram avaliados para elegibilidade pacientes com AR, EpA e OA com indicação de artrocentese, no período de abril de 2017 a janeiro de 2021.

4.2 Participantes

Os pacientes incluídos foram provenientes do ambulatório de infiltração intra-articular do Hospital das Clínicas da FMRP-USP. Cento e noventa e um pacientes foram avaliados quanto à elegibilidade. Para todos, o LS foi obtido de um dos joelhos. Dezenove pacientes tinham diagnóstico presuntivo de artropatia inflamatória crônica sem preencher algum dos critérios de classificação, motivo que levou a sua não inclusão. Oitenta e nove pacientes foram excluídos pelos seguintes motivos: artrite séptica (43 casos), artrite microcristalina (27 casos), outras doenças reumáticas (12 casos), artrite relacionada a trauma (6 casos) e neoplasia (1 caso). Desta forma, foram analisados 83 pacientes: 33 com AR, 32 com EpA e 18 com OA (**Figura 3**). O grupo EpA foi composto por pacientes com artrite psoriásica (APs, n=13), espondilite anquilosante (EA, n=7), artrite enteropática (AEp, n=7) e artrite reativa (ARe, n=5).

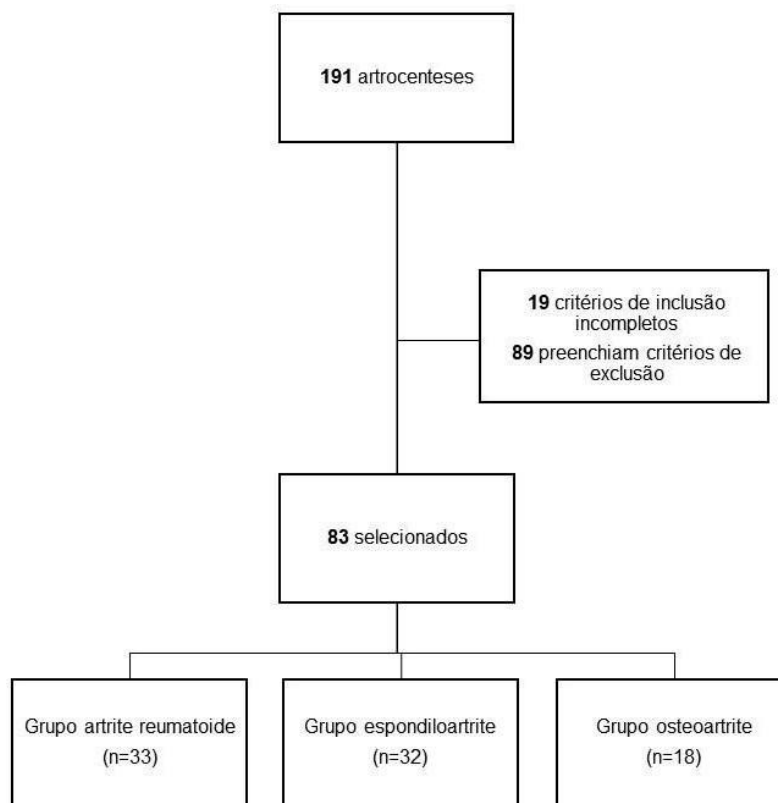


Figura 3 - Fluxograma de inclusão

4.3 Critérios de inclusão

Para os três 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 (TCLE).

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 [20].

Para o grupo EpA: todos os pacientes preencheram os critérios de classificação diagnóstica estabelecidos pelo grupo ASAS (*Assessment of SpondyloArthritis International Society*) [21].

Para o grupo OA: todos os pacientes tiveram diagnóstico de OA realizado pela equipe médica assistente. Para a articulação do joelho foi utilizado o critério clínico e radiográfico ACR 1986 [22].

4.4 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.

4.5 Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (registro número: 59784122.8.0000.5440).

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

4.6 Avaliação Clínica

Todos os pacientes foram avaliados quanto a variáveis demográficas (sexo e idade), presença de comorbidades, tempo de início dos sintomas e medicações em uso, conforme entrevista e revisão de prontuário.

Pacientes com AR e EpA periférica foram avaliados quanto ao escore de atividade de doença DAS28 (*Disease activity score 28 joints*) [23], 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: $\text{DAS28} \geq 5,1$

Pacientes com EpA axial foram avaliados quanto ao escore de atividade ASDAS-PCR [24], sendo classificados da seguinte forma:

Doença inativa: ASDAS-PCR < 1.3

Baixa atividade: $1.3 \leq \text{ASDAS-PCR} < 2.1$

Elevada atividade: $2.1 \leq \text{ASAS-PCR} < 3.5$

Muito elevada atividade: $\text{ASDAS-PCR} \geq 3.5$

Para avaliar se os níveis sinoviais de OPG e RANKL foram influenciados pela atividade da doença, cada um dos grupos AR e EpA foram ainda divididos em dois subgrupos, levando em consideração valores de $\text{DAS28} \geq 3,2$ ou $\text{ASDAS-PCR} \geq 2,1$.

Em relação ao grupo OA, não foi realizada avaliação de atividade por não haver escore específico. Cada paciente foi classificado de acordo com Kellgren-Lawrence para avaliar o estágio da OA no joelho puncionado [25].

4.7 Avaliação radiográfica

Foram analisadas radiografias de mãos e/ou joelhos de todos pacientes, realizadas nos últimos 12 meses, no intuito de classificá-los como portadores de doença erosiva ou não e a presença de cistos subcondrais.

4.8 Avaliação laboratorial

A inflamação sistêmica foi analisada através da PCR sérica por turbidimetria e VHS pela técnica de Westergren, realizadas para todos participantes no mesmo dia da coleta do LS.

Para pacientes com AR, 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.

4.9 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. Uma alíquota de 1 mL de LS foi armazenada a -80°C até o dia de realização das dosagens de RANKL e OPG.

Níveis de RANKL e OPG nas amostras foram determinados por ELISA de acordo com os protocolos dos fabricantes (Duo Set Human Osteoprotegerin, Duo Set Human TRANCE/RANKL, R&D Systems, Minnesota, USA).

4.10 Análise estatística

Números absolutos e percentuais foram comparados com o teste exato de Fisher. Variáveis contínuas são apresentadas como média (ou mediana) e desvio-padrão (ou intervalo interquartil). Para comparação dos níveis séricos de RANKL e OPG e da relação RANKL/OPG, foi utilizada ANOVA (ou teste de Mann-Whitney). O coeficiente de correlação de Spearman foi utilizado para avaliar o grau de correlação entre valores de RANKL, OPG e parâmetros clínicos e laboratoriais. Para todos os testes, $p < 0,05$ foi considerado para significância estatística.

5 RESULTADOS

5.1 Dados clínicos e laboratoriais

Oitenta e três pacientes foram incluídos no estudo, 33 no grupo AR, 32 no grupo EpA e 18 no grupo OA. As mulheres foram 28 (85%) no grupo AR, 8 (25%) no grupo EpA e 16 (88%) no grupo OA. A mediana de idade foi 57 (53-65) anos no grupo AR, 46,5 (34,7 – 54) anos no grupo EpA e 68 (58,5-73,2) anos no grupo OA. As características clínicas e laboratoriais estão apresentadas na **Tabela 1**. Dos 65

pacientes com artropatia crônica imuno-mediada, AR e EpA, 20 (30,7%) tinham menos de 2 anos de diagnóstico, 6 eram virgens de tratamento, 16 estavam em monoterapia com medicação modificadora do curso da doença sintética (MMCDs) e 33 (51%) com MMCD biológico (MMCDb), associado ou não a MMCDs. Dentre os MMCDs, o metotrexato foi o mais utilizado, seguido por leflunomida e sulfassalazina. Dentre os MMCDb, os anti-TNF foram os mais frequentes. Nenhum paciente estava em uso de prednisona com dose maior que 5 mg/dia.

No grupo AR, tabagismo ativo teve frequência de 40%, enquanto FR e Anti-CCP positivos ocorreram em 70% e 78%, respectivamente. Erosão na radiografia de mãos ou joelho ocorreu em 61% dos participantes. A mediana de tempo de diagnóstico foi 4 (2-11) anos, sendo que 76% apresentavam mais de 2 anos de doença. VHS e/ou PCR elevados foram encontrados em 73% dos pacientes; a mediana de VHS foi 23 (7-37) mm/h, e a de PCR foi 0,95 (0,4-3,1) mg/dL. Quinze pacientes (45,4%) apresentavam doença ativa, com DAS28 \geq 3,2.

O grupo EpA foi composto por artrite psoriásica (APs, n=13), espondilite anquilosante (EA, n=7), artrite enteropática (AEp, n=7) e artrite reativa (Are, n=5). O tempo médio de duração da doença foi 4 (0,87 - 7,7) anos, sendo que 63% tinham mais de 2 anos de doença. Nove pacientes (28%) apresentaram erosão na radiografia de mãos ou joelho. DAS28 \geq 3,2 ou ASDAS-PCR \geq 2,1 foram encontrados em 14 (44%) pacientes. As provas de atividade inflamatória (VHS e/ou PCR) estavam elevadas em 75% dos pacientes.

O grupo OA apresentou tempo médio de doença de 5 (2 - 7,75) anos, 88% com diagnóstico há mais de 2 anos e todos em fase avançada de acometimento articular na avaliação radiográfica de joelhos (classificação de Kellgren-Lawrence \geq III [23]). Cistos subcondrais ou erosões ósseas nas radiografias de mãos ou joelhos foram observados em 8 (44%) dos pacientes. Este grupo apresentou valores de provas de atividade inflamatória semelhantes aos do grupo de artropatia crônica imuno-mediada, sendo que 38% possuíam VHS >20 mm/h e 55% PCR >1 mg/dL.

Em relação às provas de atividade inflamatória, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. A celularidade no LS foi baixa em 95% dos pacientes do grupo OA, com mediana de 800 (250 - 1225) células/mm³ e todos tiveram cultura do líquido sinovial negativa. A contagem de leucócitos do LS foi mais elevada nos pacientes com AR e EpA quando comparada à do grupo OA, mas não houve diferença com significância estatística.

Tabela 1 - Características clínicas e laboratoriais dos pacientes do estudo.

	Artrite reumatoide (n=33)	Espondiloartrite (n=32)	Osteoartrite (n=18)	Valor p
Demográficas				
Mulheres [n(%)]	28 (85)	8 (25)	18 (100)	N/A
Idade [anos; mediana (IIQ)]	57.0 (20-82)	46.5 (18-74)	68 (49-82/73,2)	N/A
Tempo de doença <2 anos [n (%)]	8 (24)	12 (37)	4 (22)	N/A
Comorbidades				
Tabagismo [n (%)]	13 (40)	5 (15)	5 (28)	N/A
Doença cardiovascular [n (%)]	21 (64)	13 (40)	12 (66)	N/A
<i>Diabetes mellitus</i> [n (%)]	2 (6)	3 (9)	3 (16)	N/A
Dislipidemia [n (%)]	4 (12)	3 (9)	2 (11)	N/A
Obesidade [n (%)]	4 (12)	2 (6)	5 (27)	N/A
Fibromialgia [n (%)]	5 (15)	1 (3)	2 (11)	N/A
Laboratoriais e radiológicas				
PCR [mg/dL; mediana (IIQ)]	0,95 (0,4-3,1)	1.2 (0,6-6,3)	1,9 (0,5-3,4)	ns
PCR >1,0 [mg/dL; n (%)]	16 (48)	17 (53)	10 (55)	ns
VHS [mm/h; mediana (IIQ)]	23 (7-37)	19 (8-40,7)	20 (6-26)	ns
VHS >20 [mm/h; n (%)]	18 (54,5)	15 (46,8)	7 (38,8)	ns
Celularidade [/mm ³ ; mediana (IIQ)]	7675 (862-16950)	8400 (2475-16825)	800 (250-1225)	<0,01
Neutrófilos [/mm ³ /UL; mediana (IIQ)]	77 (62-85)	72 (52-88)	70 (43-76)	ns
Medicações				
Metotrexato [n (%)]	8 (25)	2 (6)	-	ns
Leflunomida [n (%)]	8 (25)	1 (3)	-	ns
Sulfassalazina [n (%)]	1 (3)	5 (28)	-	ns
Anti-TNF [n (%)]	10 (30)	16 (50)	-	ns
Não anti-TNF [n (%)]	6 (18)	1 (3)	-	ns

IIQ: intervalo interquartil; PCR: proteína C-reativa; VHS: velocidade de hemossedimentação

5.2 RANKL, OPG e razão RANKL/OPG no líquido sinovial

Os níveis de RANKL, OPG e razão RANKL/OPG no LS dos 3 grupos estão apresentados na **Tabela 2**. Não houve diferença estatística entre os grupos. Procedemos então à análise de acordo com atividade de doença, definida pelo DAS28 ou ASDAS-PCR, conforme apresentado na **tabela 3**. Também não houve diferença com significância estatística entre RANKL, OPG e razão RANKL/OPG quando os

grupos AR e EpA foram subdivididos em dois, de acordo com os valores de corte de DAS28 ou ASDAS-PCR para doença com moderada atividade, ou seja $DAS28 \geq 3,2$ ou $ASDAS-PCR \geq 2,1$.

Tabela 2. Comparação de RANKL, OPG e RANKL/OPG

	AR (n=33)	EpA (n=32)	OA (n=18)	p
RANKL (pg/mL; mediana \pm IIQ)	57 (39-87)	61 (39-85)	48 (45-89)	0,61
OPG (pg/mL; mediana \pm IIQ)	14164 (6545-25496)	11222 (3372-32854)	14890 (9412-24656)	0,60
RANKL/ OPG (x103)	4,5 (2,5-6,8)	6,3 (1,7-15,8)	3,8 (2,0-8,3)	0,56

Dados expressos em [mediana (intervalo interquartil)]

Tabela 3 - Comparação de RANKL, OPG e razão RANKL/OPG de acordo com atividade de doença.

	AR (n=33)		EpA (n=32)		OA (n=18)	Valor p*
	DAS28 \geq 3.2 (n=15)	DAS28<3.2 (n=18)	DAS28 \geq 3.2 ou ASDAS \geq 2.1 (n=14)	DAS28<3.2 ou ASDAS <2.1 (n=18)	Todos pacientes (n=18)	
RANKL (pg/mL; média \pm DP)	85 \pm 61	54 \pm 31	66 \pm 43	53 \pm 24	65 \pm 36	0,45
OPG (pg/mL; média \pm DP)	18840 \pm 11460	14800 \pm 10960	11310 \pm 12160	21250 \pm 14270	18160 \pm 11040	0,16
RANKL/OPG (x10 ³)	38,6 \pm 11,1	11,6 \pm 10,4	16,7 \pm 20,8	4,7 \pm 5,3	5,6 \pm 5,5	0,62

*Anova; DP: desvio padrão

5.3 Correlações com parâmetros laboratoriais e radiográficos

As correlações com os parâmetros laboratoriais e radiográficos foram testadas e são mostradas na **Tabela 4**. Nos pacientes com AR, houve correlação positiva de celularidade no LS com RANKL ($r=0,59$, $p<0,05$) e razão RANKL/OPG ($r=0,55$, $p<0,05$). Não houve correlação de RANKL e OPG com PCR, erosão e DAS28 ou ASDAS-PCR.

Nos pacientes com OA, houve forte correlação positiva da PCR com a razão RANKL/OPG ($r= 0,82$, $p <0,05$) e não houve correlação com os demais parâmetros avaliados. No grupo EpA, não foram observadas correlações com significância estatística.

Tabela 4 - Correlação de RANKL, OPG e RANKL/OPG com parâmetros laboratoriais e radiográficos.

		RANKL pg/mL	OPG pg/mL	RANKL/ OPG
Artrite reumatoide				
PCR	r	0,15	-0,20	0,13
	p	0,51	0,26	0,54
Celularidade	r	0,59	-0,08	0,55
	p	0,004	0,68	0,008
Erosões ósseas	r	-0,22	0,12	-0,40
	p	0,37	0,52	0,09
DAS 28	r	0,30	0,28	0,21
	p	0,12	0,14	0,28
Espondiloartrite				
PCR	r	0,01	-0,13	0,18
	p	0,98	0,52	0,58
Celularidade	r	-0,11	0,22	-0,09
	p	0,72	0,28	0,77
Erosões ósseas	r	0,30	-0,19	0,20
	p	0,7	0,38	0,56
DAS28 OU ASDAS-PCR	r	-0,35	0,08	0,02
	p	0,054	0,79	0,89
Osteoartrite				
PCR	r	0,41	-0,41	0,82
	p	0,28	0,17	0,006
Celularidade	r	-0,29	-0,12	-0,09
	p	0,48	0,71	0,83
Cistos subcondrais ou erosões ósseas	r	0,36	-0,33	0,51
	p	0,25	0,20	0,09
Total				
PCR	r	0,40	-0,26	0,27
	p	0,008	0,025	0,08
Cistos subcondrais ou erosões ósseas	r	0,05	-0,09	N/A
	p	0,74	0,74	N/A

*Correlação de Spearman; PCR: proteína C-reativa

Ao analisar as amostras em conjunto, considerando todos pacientes do estudo, observamos que a PCR apresentou fraca correlação negativa com OPG ($r = -0,26$ $p = 0,02$) e moderada correlação positiva com RANKL ($r = 0,40$, $p = 0,008$) (**Figura 4**).

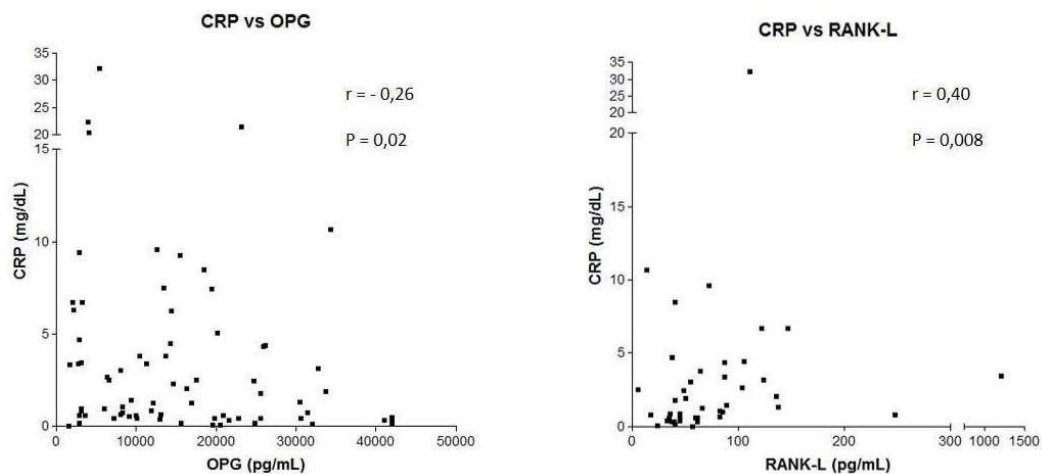


Figura 4 - Correlação de PCR com OPG e RANKL nos pacientes com artropatia crônica.

6 DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo quantificar os níveis de RANKL e OPG no LS de pacientes com AR, EpA e OA, avaliando sua correlação com parâmetros clínicos e laboratoriais de cada doença. Não houve diferença nos níveis sinoviais de RANKL, OPG e razão RANKL/OPG entre os grupos.

Nos pacientes com AR, o RANKL e a razão RANKL/OPG sinoviais foram significativamente correlacionados com a celularidade do LS. Não houve significância estatística com outros parâmetros de atividade ou gravidade de doença, como provas de atividade inflamatória, DAS28 e erosões nas radiografias de mãos. Diferente do observado em nosso estudo, Ellabban *et al.* detectaram níveis séricos e sinoviais de RANKL mais elevados em pacientes com AR comparados aos níveis de pacientes com OA, havendo correlação significativa dos níveis sinoviais com parâmetros de gravidade e atividade da doença [26]. Skoumal *et al.* encontraram correlação negativa para OPG e RANKL no LS na AR, mostrando níveis reduzidos de OPG e elevados de RANKL [16]. Além disso, observaram correlação entre a razão RANKL/OPG e alterações radiográficas. Haynes *et al.*, em análise semiquantitativa e quantitativa da proteína OPG no tecido sinovial, detectada por imunocoloração, demonstraram que a expressão de OPG está marcadamente diminuída em pacientes com AR ativa em comparação aos pacientes com AR inativa, OA ou indivíduos saudáveis [18]. De forma semelhante, Kong *et al.* demonstraram níveis de OPG no LS mais reduzidos na AR em comparação com OA [27]. A OPG sinovial mais baixa pode refletir um efeito menos protetor no osso, levando a destruição óssea mais precoce e mais pronunciada, como a que ocorre na AR. A quantidade de RANKL em tecido sinovial é mais elevada em indivíduos com AR ativa comparados a indivíduos com AR controlada e a indivíduos com EpA e OA [18]. A razão RANKL/OPG é significativamente maior no tecido sinovial reumatoide comparado à de outras artropatias inflamatórias crônicas, em especial artrite reativa [28].

Encontramos correlação positiva entre a contagem celular do LS com RANKL e a razão RANKL/OPG na AR. De fato, o infiltrado articular de células inflamatórias é maior na AR em atividade, comparada aos casos de doença menos ativa ou às demais artropatias crônicas [10]. A presença de células no LS, como neutrófilos, células B e T, induzem a expressão de RANKL, que estimula ativação, proliferação e interação com células dendríticas, contribuindo para remodelação óssea [29,30].

Na análise dos 3 grupos em conjunto, encontramos correlação negativa da PCR com OPG e correlação positiva com RANKL, sugerindo o papel importante deste marcador na fisiopatologia da inflamação sinovial. O denosumabe, anticorpo monoclonal que se liga especificamente ao RANKL, inativando-o, foi avaliado em pacientes com AR [31-33]. Hu et al, em metanálise com um total de 1758 pacientes, mostraram que o denosumabe aumentou significativamente percentuais de DMO e reduziu escore de danos radiográficos [34].

Nossos resultados mostram forte correlação positiva da razão RANKL/OPG com PCR nos pacientes com OA. Níveis elevados de RANKL sinovial foram encontrados em indivíduos com OA, sendo mais altos naqueles com OA nodal erosiva comparados a pacientes com OA não erosiva, havendo correlação com nódulos de Heberden e Bouchard, pontuação de Kellgren-Lawrence e com as alterações erosivas encontradas na radiografia de mãos [26]. Pilichou et al também demonstraram correlação da razão RANKL/OPG com gravidade de doença na OA primária, porém em dosagem sérica, não no LS [19].

Em relação à inflamação sistêmica, encontramos valores elevados e semelhantes de PCR e VHS séricos entre os grupos. O grupo OA apresentou maiores frequências de obesidade e diabetes mellitus. A obesidade em mulheres é uma condição bem conhecida relacionada à elevação da PCR sérica devido a uma inflamação sistêmica de baixo grau [35], resultando em valores acima de 1,0 mg/dL. A inflamação de baixo grau devida ao diabetes mellitus está associada a elevações séricas da PCR [36] e pode ter contribuído para nossos resultados. Em relação à VHS, valores do grupo OA semelhantes aos de AR e EpA podem ser associados à totalidade de mulheres desse grupo e à média de idade consideravelmente maior. Sexo feminino e idade são duas condições conhecidas por elevar a VHS [37]. Além disso, devemos mencionar que incluímos pacientes com escore Kellgren-Lawrence III ou IV e isso, a longo prazo, aumenta a chance de resultar em inflamação sinovial relevante [8].

Nos pacientes com EpA não encontramos correlações entre RANKL, OPG e os parâmetros clínicos e radiológicos avaliados. A expressão de OPG e RANKL foi semelhante à dos pacientes com AR, apesar das diferenças marcantes entre o padrão de acometimento ósseo, com extensa neoformação óssea na primeira e marcadas erosões ósseas focais nesta última [38]. Essa semelhança também foi observada por Vandooren et al ao analisar tecido sinovial de pacientes com APs, outras EpA e AR

[14]. Nossos dados são concordantes com este estudo e podem sugerir que as diferenças no padrão e extensão das erosões ósseas entre essas doenças não se relacionam com a expressão sinovial dessas proteínas. Estes resultados devem ser analisados com cautela devido à heterogeneidade da amostra em ambos os estudos.

Dados relativos à EA são conflitantes. Em 2019, Chen et al, em metanálise com 1592 pacientes e 1064 controles saudáveis, concluíram que os níveis séricos de OPG, RANKL e razão RANKL/OPG foram significativamente maiores que em controles saudáveis [39]. Um subgrupo de pacientes com marcadores de atividade inflamatória (VHS e PCR) elevados, menor tempo de duração de doença e índice de atividade de doença elevada apresentou níveis séricos mais altos de OPG e RANKL. Os autores concluíram que OPG, RANKL e razão RANKL/OPG podem ser usados como potenciais biomarcadores para atividade na EA [39].

Em nossa amostra, 59 dos 65 pacientes com doença reumática imunomediada estavam em uso regular de MMCD, o que pode ter interferido em nossos resultados. Em estudo com 50 pacientes com AR, Vassev et al avaliaram o efeito da terapia anti-TNF em combinação com metotrexato na remodelação óssea e osteoclastogênese. Após 15 meses de tratamento, observaram redução dos marcadores de reabsorção e razão RANKL/OPG e aumento dos marcadores de formação óssea, independentemente do tipo de anti-TNF utilizado [40]. A alta frequência de tratamentos com bDMARDs (51%) em nossa coorte pode explicar a semelhança nos níveis de SF de OPG e RANKL que encontramos.

Nosso estudo tem algumas limitações, como a não avaliação concomitante dos níveis séricos de RANKL e OPG. A heterogeneidade da amostra com relação ao tempo de doença e os diferentes tratamentos é outra limitação, uma vez que menos de um terço dos pacientes com artropatia imunomediada apresentava doença precoce e menos de 10% eram virgens de tratamento.

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, os níveis sinoviais de RANKL e OPG, bem como a relação RANKL/OPG, não foram capazes de diferenciar os três grupos de indivíduos com artropatia crônica estudados. Os níveis sinoviais da razão RANKL/OPG mostraram correlação com a celularidade do LS em pacientes com AR e com PCR sérica em pacientes com OA.

8 REFERÊNCIAS

1. Tateiwa D, Yoshikawa H, Kaito T. Cartilage and Bone Destruction in Arthritis: Pathogenesis and Treatment Strategy: A Literature Review. *Cells*. 2019;8:818.
2. Redlich K, Smolen JS. Inflammatory bone loss: pathogenesis and therapeutic intervention. *Nat Rev Drug Discov*. 2012 Mar 1;11(3):234-50.
3. Scherer HU, Häupl T, Burmester GR. The etiology of rheumatoid arthritis. *J Autoimmun*. 2020;110:102400.
4. Ritchlin C, Adamopoulos IE. Axial spondyloarthritis: new advances in diagnosis and management. *BMJ*. 2021;372:m4447.
5. Van den Bosch MHJ. Osteoarthritis year in review 2020: biology. *Osteoarthritis Cartilage*. 2021;29:143-150.
6. Schett G, Hayer S, Zwerina J, Redlich K, Smolen JS. Mechanisms of Disease: the link between RANKL and arthritic bone disease. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2005;1:47-54.
7. Hu Y, Wang Y, Chen T, Hao Z, Cai L, Li J. Exosome: Function and Application in Inflammatory Bone Diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2021;2021:6324912.
8. Martel-Pelletier J, Barr AJ, Cicuttini FM, Conaghan PG, Cooper C, Goldring MB, et al. Osteoarthritis. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2:16072.
9. Levescot A, Chang MH, Schnell J, Nelson-Maney N, Yan J, Martínez-Bonet M, et al. IL-1 β -driven osteoclastogenic Tregs accelerate bone erosion in arthritis. *J Clin Invest*. 2021;131:e141008.
10. Maeda K, Yoshida K, Nishizawa T, Otani K, Yamashita Y, Okabe H, et al. Inflammation and Bone Metabolism in Rheumatoid Arthritis: Molecular Mechanisms of Joint Destruction and Pharmacological Treatments. *Int J Mol Sci*. 2022;23:2871.
11. Sun Y, Li J, Xie X, Gu F, Sui Z, Zhang K, et al. Recent Advances in Osteoclast Biological Behavior. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:788680.
12. Mercatali L, Ricci M, Scarpi E, Serra P, Fabbri F, Ricci R, et al. RANK/RANK-L/OPG in patients with bone metastases treated with anticancer agents and zoledronic acid: a prospective study. *Int J Mol Sci*. 2013;14:10683-93.

13. Infante M, Fabi A, Cognetti F, Gorini S, Caprio M, Fabbri A. RANKL/RANK/OPG system beyond bone remodeling: involvement in breast cancer and clinical perspectives. *J Exp Clin Cancer Res.* 2019;38:12.
14. Vandooren B, Cantaert T, Noordenbos T, Tak PP, Baeten D. The abundant synovial expression of the RANK/RANKL/Osteoprotegerin system in peripheral spondylarthritis is partially disconnected from inflammation. *Arthritis Rheum.* 2008;58:718-29.
15. Geusens PP, Landewé RB, Garnero P, Chen D, Dunstan CR, Lems WF, et al. The ratio of circulating osteoprotegerin to RANKL in early rheumatoid arthritis predicts later joint destruction. *Arthritis Rheum.* 2006;54:1772-7.
16. Skoumal M, Kolarz G, Haberhauer G, Woloszczuk W, Hawa G, Klingler A. Osteoprotegerin and the receptor activator of NF-kappa B ligand in the serum and synovial fluid. A comparison of patients with longstanding rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Rheumatol Int.* 2005;26:63-9.
17. Haynes DR, Crotti TN, Loric M, Bain GI, Atkins GJ, Findlay DM. Osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) regulate osteoclast formation by cells in the human rheumatoid arthritic joint. *Rheumatology.* 2001;40:623-30.
18. Haynes DR, Barg E, Crotti TN, Holding C, Weedon H, Atkins GJ, et al. Osteoprotegerin expression in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis, spondyloarthropathies and osteoarthritis and normal controls. *Rheumatology.* 2003;42:123-34.
19. Pilichou A, Papassotiriou I, Michalakakou K, Fessatou S, Fandridis E, Papachristou G, et al. High levels of synovial fluid osteoprotegerin (OPG) and increased serum ratio of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) to OPG correlate with disease severity in patients with primary knee osteoarthritis. *Clin Biochem.* 2008;41:746-9.
20. Kay J, Upchurch KS. ACR/EULAR 2010 rheumatoid arthritis classification criteria. *Rheumatology (Oxford).* 2012;51 Suppl 6:vi5-9.
21. Akkoc N, Khan MA. ASAS classification criteria for axial spondyloarthritis: time to modify. *Clin Rheumatol.* 2016;35:1415-23.
22. Bannuru RR, Osani MC, Vaysbrot EE, Arden NK, Bennell K, Bierma-Zeinstra SMA, et al. OARSI guidelines for the non-surgical management of knee, hip, and polyarticular osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2019;27:1578-89.

-
23. England BR, Tjong BK, Bergman MJ, Curtis JR, Kazi S, Mikuls TR, et al. 2019 Update of the American College of Rheumatology Recommended Rheumatoid Arthritis Disease Activity Measures. *Arthritis Care Res.* 2019;71:1540-55.
 24. Machado P, Landewé R, Lie E, Kvien TK, Braun J, Baker D, et al. Assessment of SpondyloArthritis international Society. Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score (ASDAS): defining cut-off values for disease activity states and improvement scores. *Ann Rheum Dis.* 2011;70:47-53.
 25. Schiphof D, de Klerk BM, Kerkhof HJ, Hofman A, Koes BW, Boers M, et al. Impact of different descriptions of the Kellgren and Lawrence classification criteria on the diagnosis of knee osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2011;70:1422-7.
 26. Ellabban AS, Kamel SR, Ahmed SS, Osman AM. abd. A comparative study between rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Rheumatol Int.* 2012;32:1589-96.
 27. Kong YY, Feige U, Sarosi I, Bolon B, Tafuri A, Morony S, et al. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature.* 1999;402:304-9.
 28. Fonseca JE, Cortez-Dias N, Francisco A, Sobral M, Canhão H, Resende C, et al. Inflammatory cell infiltrate and RANKL/OPG expression in rheumatoid synovium: comparison with other inflammatory arthropathies and correlation with outcome. *Clin Exp Rheumatol.* 2005;23:185-92.
 29. Poubelle PE, Chakravarti A, Fernandes MJ, Doiron K, Marceau AA. Differential expression of RANK, RANK-L, and osteoprotegerin by synovial fluid neutrophils from patients with rheumatoid arthritis and by healthy human blood neutrophils. *Arthritis Res Ther.* 2007;9:R25.
 30. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature.* 1997;390:175-9.
 31. Mori Y, Izumiyama T, Kurishima H, Kamimura M, Baba K, Mori N, et al. Effect of denosumab switched from bisphosphonates in preventing joint destruction in postmenopausal rheumatoid arthritis patients with anti-cyclic citrullinated peptide antibodies. *J Orthop Surg Res.* 2021;16:107.
 32. Kinoshita H, Miyakoshi N, Kashiwagura T, Kasukawa Y, Sugimura Y, Shimada Y. Comparison of the efficacy of denosumab and bisphosphonates for treating secondary osteoporosis in patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol.*

2017;27:582-586.

33. Takeuchi T, Tanaka Y, Soen S, Yamanaka H, Yoneda T, Tanaka S, et al. Effects of the anti-RANKL antibody denosumab on joint structural damage in patients with rheumatoid arthritis treated with conventional synthetic disease-modifying antirheumatic drugs (DESIRABLE study): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Ann Rheum Dis*. 2019;78:899-907.
34. Hu Q, Zhong X, Tian H, Liao P. The Efficacy of Denosumab in Patients With Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review and Pooled Analysis of Randomized or Matched Data. *Front Immunol*. 2022;12:799575.
35. Visser M, Bouter LM, McQuillan GM, Wener MH, Harris TB. Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. *JAMA*. 1999;282:2131-5.
36. Calle MC, Fernandez ML. Inflammation and type 2 diabetes. *Diabetes Metab*. 2012;38:183-91.
37. Böttiger LE, Svedberg CA. Normal erythrocyte sedimentation rate and age. *Br Med J*. 1967;2(5544):85-7.
38. Goldring SR. Differential mechanisms of de-regulated bone formation in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis. *Rheumatology*. 2016;55 Suppl 2:ii56-ii60.
39. Chen M, Hu X, Wu M, Yang J, Han R, Ma Y, et al. Serum Levels of OPG, RANKL, and RANKL/OPG Ratio in Patients with Ankylosing Spondylitis: A Systematic Review and Meta-analysis. *Immunol Invest*. 2019;48:490-504.
40. Jura-Półtorak A, Szeremeta A, Olczyk K, Zoń-Giebel A, Komosińska-Vassev K. Bone Metabolism and RANKL/OPG Ratio in Rheumatoid Arthritis Women Treated with TNF- α Inhibitors. *J Clin Med*. 2021;10:2905.

ANEXO A – 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: “Análise de RANKL, OPG e RANKL/OPG no líquido sinovial de pacientes com artropatias inflamatórias crônicas.”

Você está sendo convidado a participar dessa pesquisa porque apresenta diagnóstico de artrite reumatoide, artrite psoriásica ou espondiloartrite. Elas são causadas por uma alteração em seu próprio organismo (no sistema imunológico), que provoca inflamação em suas juntas, gerando dor e inchaço. Se não for tratada adequadamente, a doença pode deixar deformidades nas juntas. 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 está o RANK, RANKL e OPG.

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. Este procedimento, que foi indicado como necessário pela equipe médica da reumatologia, pode resultar em dor no local e, muito raramente, infecções ou sangramentos e dura cerca de 10 minutos. Neste líquido avaliaremos a substância relatada 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 ter divulgadas 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 (07h30min às 12h00min). Em caso de dúvida, o contato poderá ser feito com o Dra. Thaíse Oliveira Quaresma (médica assistente da disciplina de Reumatologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto e realizador do estudo), neste mesmo endereço ou pelo telefone (16) 98224-4568.

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 08h00min às 17h00min. 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

ANEXO B – Artigo publicado

Quaresma et al. *Advances in Rheumatology* (2022) 62:12
<https://doi.org/10.1186/s42358-022-00294-3>

Advances in Rheumatology

RESEARCH

Open Access



Comparative study of the synovial levels of RANKL and OPG in rheumatoid arthritis, spondyloarthritis and osteoarthritis

Thaís Oliveira Quaresma¹, Sérgio Couto Luna de Almeida¹, Tarcília Aparecida da Silva², Paulo Louzada-Júnior¹ and René Donzetti Ribeiro de Oliveira^{1*}

Abstract

Introduction In chronic arthropathies, there are several mechanisms of joint destruction. In recent years, studies have reported the implication of receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) in the process of activation and differentiation of osteoclasts, a key cell in the development of bone erosion. The RANKL/OPG ratio is increased in the serum of patients with malignant diseases and lytic bone disease, as well as rheumatoid arthritis (RA). The objective of this study was to measure and compare the concentrations of OPG and RANKL in the synovial fluid (SF) of patients with rheumatoid arthritis, spondyloarthritis (SpA) and osteoarthritis (OA).

Methods This was an observational and cross-sectional study with 83 patients, 33 with RA, 32 with SpA and 18 with OA, followed up regularly in the outpatient clinics of the Rheumatology Department of the Clínicas Hospital of the Ribeirão Preto Medical School-USP. All patients were assessed for indications for arthrocentesis by the attending physicians at the time of SF collection and were evaluated for demographic variables and medication use. Disease activity was assessed in individuals with RA and SpA. The quantification of SF OPG and RANKL levels was performed by ELISA, and the correlations of the results with clinical, laboratory and radiological parameters were assessed.

Results We found no statistically significant difference in the RANKL and OPG levels among the groups. Patients with RA showed a positive correlation between the SF cell count and RANKL level ($r = 0.59$; $p < 0.05$) and the RANKL/OPG ratio ($r = 0.53$; $p < 0.05$). Patients with OA showed a strong correlation between C-reactive protein (CRP) and the RANKL/OPG ratio ($r = 0.82$; $p < 0.05$). There was no correlation between the OPG and RANKL levels and markers of inflammatory activity or the disease activity Index in patients with RA or SpA.

Conclusion Within this patient cohort, the RANKL/OPG ratio was correlated with the SF cell count in patients with RA and with serum CRP in patients with OA, which may suggest a relationship with active inflammation and more destructive joint disease.

Keywords Arthritides, Rheumatoid arthritis, Spondyloarthritis, Osteoarthritis, OPG, protein, RANKL protein

*Correspondence:
 René Donzetti Ribeiro de Oliveira
 rdo@vivaonline.com.br
 Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2022. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.