



PG-LOCOMOTOR

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
APLICADAS AO APARELHO LOCOMOTOR



FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

OSAMU DE SANDES KIMURA

Avaliação de biomarcadores relacionados ao processo de liberação de redes extracelulares de neutrófilos no líquido sinovial de pacientes com infecção articular periprotética

Ribeirão Preto
2023

Osamu de Sandes Kimura

Avaliação de biomarcadores relacionados ao processo de liberação de redes extracelulares de neutrófilos no líquido sinovial de pacientes com infecção articular periprotética

Versão Original

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde Aplicadas ao Aparelho Locomotor da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Helton Luiz Aparecido Defino
Co-orientadora: Prof. Dr^a. Ana Carolina Leal

Ribeirão Preto - SP
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.

Kimura, Osamu de Sandes

Avaliação de biomarcadores relacionados ao processo de liberação de redes extracelulares de neutrófilos no líquido sinovial de pacientes com infecção articular periprotética. Ribeirão Preto, 2023.

107fls:il

Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde Aplicadas ao Aparelho Locomotor apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração:

Orientador: Defino, Helton Luiz Aparecido

1. Infecção periprotética. 2. Artroplastia total de quadril.
3. Neutrófilos. 4. NETS.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Osamu de Sandes Kimura

Título: Avaliação de biomarcadores relacionados ao processo de liberação de redes extracelulares de neutrófilos no líquido sinovial de pacientes com infecção articular periprotética.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde Aplicadas ao Aparelho Locomotor da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.
Instituição:
Julgamento:

Prof. Dr.
Instituição:
Julgamento:

Prof. Dr.
Instituição:
Julgamento:

AGRADECIMENTOS

A Deus por me proporcionar saúde e iluminar meu caminho.

Aos meus orientadores pelo incentivo e motivação para viabilizar e realizar essa tese.

À Professora Doutora Ana Carolina Leal, incansável idealizadora deste projeto pela sua dedicação e empenho em sua realização.

Ao Doutor Helton Luiz Aparecido Defino, que me recebeu e acolheu como aluno da pós-graduação USP-RP e viabilizou a parceria com o INTO.

À toda equipe do laboratório de pesquisa do INTO, pela participação e ajuda nos experimentos realizados.

Aos amigos de longa data do INTO os quais tenho como referência na cirurgia do quadril, Emílio Freitas, Marco Bernardo e Ana Carolina.

Ao Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia, em especial ao Centro de Atenção Especializada do Quadril, que moldou os princípios da cirurgia ortopédica em meu cerne e aos pacientes que se dispuseram a participar como parte indispensável desse estudo.

Às Enfermeiras do Centro de Atenção Especializado do Quadril, Paula Claussen, Eliana Antunes e Monike Faccio que fazem a diferença no cuidado aos pacientes do INTO.

Aos residentes de ortopedia e estagiários do quadril do INTO que são meu estímulo para sempre buscar atualização e incentivadores de meu papel ativo de educador.

Aos cursos de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético do INTO e Pós-Graduação em Ciências da Saúde Aplicadas ao Aparelho Locomotor da USP-RP, pela oportunidade de realizar esse doutorado.

Aos meus pais, Osamu Kimura (*in memoriam*) que foi meu espelho de cientista e homem, e Lúcia Kimura que me proporcionou educação e amor para seguir pelo árduo caminho da vida.

Aos meus irmãos, Hiroshi Kimura e Kenzo Kimura pelo amor e exemplo de fraternidade, sem vocês mais essa conquista não seria possível.

Aos meus queridos Ditchan e Batchan Kimura (*in memoriam*), Vovô Valdemar (*in memoriam*), Vovó Dadaça (*in memoriam*) e Vovó Maria Ignez pelo amor e carinho que moldaram meu caráter.

Aos primos e tios das famílias Kimura, Veras Sandes, Carvalho e Araujo pela união nos momentos difíceis e alegria nos momentos de festa.

Ao amor da minha vida, minha esposa Renata, por dividir as angústias e alegrias desse caminho, pela compreensão da ausência e por me mostrar que juntos somos mais fortes.

Às minhas amadas filhas Marina e Joana por independente da ausência em alguns momentos sempre me fortalecem com seu amor puro e incondicional.

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

“Educação não transforma o mundo.
Educação muda as pessoas.
Pessoas transformam o mundo.”

Paulo Freire

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| RESUMO..... | VII |
| ABSTRACT..... | X |
| LISTA DE FIGURAS..... | XI |
| LISTA DE QUADROS E TABELAS | XII |
| LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS | XIII |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 15 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA | 18 |
| 2.1 Osteoartrite do quadril e joelho..... | 18 |
| 2.2 Tratamento não-cirúrgico de osteoartrite do quadril e joelho..... | 20 |
| 2.3 Tratamento cirúrgico de osteoartrite do quadril e joelho | 21 |
| 2.4 Artroplastia total de quadril e joelho | 23 |
| 2.5 Falhas de artroplastia..... | 24 |
| 2.6 Infecção articular periprotética | 26 |
| 2.7 Diagnóstico da infecção articular periprotética..... | 28 |
| 2.7.1 Fisiopatologia da infecção articular periprotética..... | 30 |
| 2.7.2 Resposta imune no contexto da IAP | 34 |
| 2.8 Avaliação da liberação das NETs..... | 40 |
| 2.9 NETs como biomarcador de doenças..... | 41 |
| 3 OBJETIVOS..... | 44 |
| 3.1 Objetivo Geral | 44 |
| 3.2 Objetivos Específicos | 44 |
| 4 METODOLOGIA | 45 |
| 4.1 Desenho Experimental | 45 |
| 4.2 Aspectos éticos e participantes do estudo..... | 45 |
| 4.3 Coleta de dados | 46 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 4.4 | Coleta de materiais..... | 47 |
| 4.5 | Cultura microbiológica..... | 50 |
| 4.6 | Avaliação histopatológica | 51 |
| 4.7 | Análise no líquido sinovial | 52 |
| 4.7.1 | Citometria global e específica do líquido sinovial | 52 |
| 4.7.2 | Quantificação de DNA livre | 52 |
| 4.7.3 | Quantificação de mieloperoxidase e histona H3 citrulinada | 53 |
| 4.8 | Análise dos resultados | 53 |
| 5 | RESULTADOS | 55 |
| 5.1 | População de estudo..... | 55 |
| 5.2 | Exames laboratoriais..... | 56 |
| 5.3 | Investigação da liberação de NETs no líquido sinovial | 58 |
| 6 | DISCUSSÃO | 64 |
| 8 | CONCLUSÃO | 72 |
| 9 | REFERÊNCIAS | 73 |
| | ANEXO A. PARECER DE APROVAÇÃO DO CEP..... | 96 |
| | ANEXO B. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO | 97 |

RESUMO

Kimura, OS. Avaliação de biomarcadores relacionados ao processo de liberação de redes extracelulares de neutrófilos no líquido sinovial de pacientes com infecção articular periprotética. [Tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2023.

A infecção articular periprotética (IAP) é uma das mais graves e temidas complicações relacionadas às artroplastias totais de quadril (ATQ) e joelho (ATJ). O diagnóstico precoce e preciso influencia diretamente na conduta terapêutica mais adequada o que pode alterar o seu desfecho. O papel dos neutrófilos no combate a infecção vem sendo cada vez mais conhecido e um dos mecanismos de ação destas células são as NETs (*Neutrophil Extracellular Traps*), que são estruturas extracelulares formadas por ácido desoxirribonucleico (DNA), histonas e proteínas bactericidas capazes de capturar os patógenos e promover sua eliminação. Na IAP, não há estudos que tenham investigado a ocorrência deste processo no microambiente articular periprotético infectado. Entretanto, evidências apontam para a ocorrência de tal processo, uma vez que o líquido sinovial (LS) de pacientes com IAP apresenta aumento de neutrófilos, DNA livre e enzimas relacionadas aos grânulos dos neutrófilos. Dessa forma, este estudo se propõe a avaliar o processo de NETose no microambiente da IAP, através da quantificação de biomarcadores relacionados a esse processo no líquido sinovial. Para isso, foi realizado um estudo prospectivo com 32 pacientes submetidos à cirurgia de revisão da ATJ e ATQ. Dezesesseis pacientes foram diagnosticados com IAP e 16 pacientes compuseram o grupo controle, asséptico. Observamos níveis mais elevados de DNA livre ($105,5 \pm 58,3$ vs $1,9 \pm 1,2$, $p > 0,0001$), mieloperoxidase (1575 ± 826 vs $50,16 \pm 100$, $p < 0,0001$) e histona H3 citrulinada ($13,88 \pm 24,4$ vs 1.688 ± 1.214 , $p < 0,0001$) no LS dos pacientes com IAP. As correlações entre os níveis do DNA livre e a mieloperoxidase e entre DNA livre e histona H3 citrulinada se mostraram altas. A análise da performance diagnóstica dos marcadores da NETose para detecção de IAP através da curva *receiver operating characteristic* (ROC) foi calculada e mostrou para o DNA livre, a área sob a curva ROC de 1 [0,89 – 1], com ponto de corte maior que 5,9 e índice de Youden de 1; para a mieloperoxidase, a área sob a curva ROC de 0,984 [0,86 – 1] com ponto de corte de 393,6 e índice de Youden de 0,93; e para a histona H3 citrulinada, a área sob a curva ROC de 0,94 [0,8 – 0,99], com ponto de corte de 27,9 e índice de Youden de 0,75, mostrando elevada sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de IAP. A partir dos resultados apresentados, evidenciamos a ocorrência do processo de NETose no microambiente articular periprotético infectado, que resulta no aumento dos biomarcadores DNA livre, mieloperoxidase e histona H3 citrulinada no LS de pacientes com IAP, além de apresentar a histona citrulinada como um novo potencial biomarcador que pode ajudar no diagnóstico da IAP crônica de quadril e joelho.

Palavras-chave: infecção articular periprotética. artroplastia total de quadril. neutrófilos. NETS.

ABSTRACT

Kimura, OS. Evaluation of biomarkers related to the release process of neutrophil extracellular traps in the synovial fluid of patients with periprosthetic joint infection. [Thesis]. Ribeirão Preto: University of São Paulo, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto; 2023.

Periprosthetic joint infection (PJI) is one of the most serious and feared complications related to total hip (THA) and knee (TKA) replacements. Early and accurate diagnosis directly influences the most appropriate treatment, which can change its outcome. The role of neutrophils in fighting infection has been increasingly known and one of the switches in the action of these cells are NETs (Neutrophil Extracellular Traps), which are extracellular structures formed by deoxyribonucleic acid (DNA), histones and bactericidal proteins capable of capturing pathogens and promoting their elimination. In PJI, there are no studies that have investigated the occurrence of this process in the infected periprosthetic joint microenvironment. However, evidence points to the occurrence of such process, since the synovial fluid (SF) of patients with PJI shows an increase in neutrophils, cell-free DNA and enzymes related to neutrophil granules. Thus, this study proposes to evaluate the NETosis process in the PJI microenvironment, through the quantification of biomarkers related to this process in the synovial fluid. For this, a prospective study was carried out with 32 patients treated for revision TKA and THA. Sixteen patients with PJI and 16 patients with aseptic loosening. We observed higher levels of cell-free DNA (105.5 ± 58.3 vs 1.9 ± 1.2 , $p > 0.0001$), myeloperoxidase (1575 ± 826 vs 50.16 ± 100 , $p < 0.0001$) and citrullinated histone H3 (13.88 ± 24.4 vs 1.688 ± 1.214 , $p < 0.0001$) in the synovial fluid of patients with PJI. Correlations between cell-free DNA levels, myeloperoxidase and citrullinated histone H3 were high. The analysis of the diagnostic performance of NETosis markers for detection of PJI through the receiver operating characteristic (ROC) curve was calculated and showed, for cell-free DNA, the area under the ROC curve of 1 [0.89 – 1], with a point of cutoff greater than 5.9 and Youden index of 1; for myeloperoxidase, the area under the ROC curve of 0.984 [0.86 – 1] with a cutoff of 393.6 and Youden index of 0.93; and for citrullinated histone H3, the area under the ROC curve of 0.94 [0.8 – 0.99], with a cutoff of 27.9 and Youden index of 0.75, showing high sensitivity and specificity for the diagnosis of PJI. From the results presented, we evidenced the occurrence of the NETosis process in the infected periprosthetic joint microenvironment, which results in the increase of biomarkers cell-free DNA, myeloperoxidase and citrullinated histone H3 in the synovial fluid of patients with PJI, in addition to presenting citrullinated histone as a new potential biomarker that can help in the diagnosis of chronic hip and knee PJI.

Keywords: periprosthetic joint infection. total hip arthroplasty. neutrophils. NETS.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Biofilme bacteriano | 33 |
| Figura 2. Estrutura das redes extracelulares de neutrófilos | 35 |
| Figura 3. Etapas do processo de formação das NETs | 36 |
| Figura 4. Mecanismos de liberação das redes extracelulares de neutrófilos | 38 |
| Figura 5. Descondensação da cromatina mediada por PAD4 | 39 |
| Figura 6. Procedimento cirúrgico e coleta de materiais biológicos na ATJ de revisão..... | 48 |
| Figura 7. Procedimento cirúrgico e coleta de materiais biológicos na ATQ de revisão..... | 49 |
| Figura 8. Análise microbiológica e contagem celular do líquido sinovial..... | 51 |
| Figura 9. Quantificação de DNA livre | 58 |
| Figura 10. Quantificação da enzima mieloperoxidase | 59 |
| Figura 11. Quantificação da Histona H3 Citrulinada | 60 |
| Figura 12. Correlação entre os níveis dos biomarcadores das redes extracelulares de neutrófilos..... | 61 |
| Figura 13. Curvas ROC dos biomarcadores relacionados ao processo de NETose no diagnóstico da IAP..... | 62 |
| Figura 14. Microambiente da articulação periprotética infectada..... | 65 |

LISTA DE QUADROS E TABELAS

| | |
|--|----|
| Quadro 1. Algoritmo para diagnóstico da infecção articular periprotética do Consenso Internacional de Infecções Musculoesquelética de 2018 | 29 |
| Quadro 2. Algoritmo para diagnóstico de infecção articular periprotética da Sociedade Europeia de Infecções Ósseas e Articulares | 30 |
| Quadro 3. Classificação de Morawietz para avaliação da membrana periprotética | 52 |
| Tabela 1. Características da população de estudo | 55 |
| Tabela 2. Perfil microbiológico dos pacientes do grupo infecção..... | 56 |
| Tabela 3. Avaliação dos níveis de marcadores sorológicos e do líquido sinovial..... | 57 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|---------|---|
| ATQ | artroplastia total de quadril |
| ATJ | artroplastia total de joelho |
| IAP | infecção articular periprotética |
| NETs | redes extracelulares de neutrófilos, do inglês <i>neutrophil extracellular traps</i> |
| DNA | ácido desoxirribonucleico |
| OA | osteoartrite |
| EUA | Estados Unidos da América |
| dGEMRIC | do inglês, <i>delayed gadolinium-enhanced magnetic resonance image of cartilage</i> |
| AINES | anti-inflamatórios não-esteroidais |
| AAOS | Academia Americana de Cirurgiões Ortopédicos, do inglês <i>American Academy of Orthopedic Surgeons</i> |
| NIS | do Inglês, <i>Nationwide Inpatients Sample</i> |
| IDSA | Sociedade Americana de Doenças Infecciosas, do inglês <i>Infectious Diseases Society of America</i> |
| MRSA | <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina |
| MSIS | Sociedade de Infecção Musculoesquelética, do inglês <i>Musculoskeletal Infection Society</i> |
| ICM | do inglês, <i>International Consensus Meeting on Musculoskeletal Infection</i> |
| PCR | proteína C reativa |
| VHS | velocidade de hemossedimentação |
| PMN | polimorfonucleares |
| LS | líquido sinovial |
| EBJIS | Sociedade Europeia de Infecções Ósseas e Articulares, do inglês <i>European Bone and Joint Infection Society</i> |
| ESCMID | Sociedade Europeia de Microbiologia Clínica e Doenças Infecciosas, do inglês <i>European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases</i> |
| SGIAI | Grupo de Estudos para infecções associadas a implantes, do inglês <i>Study Group for Implant-Associated Infections</i> |

| | |
|-------|---|
| CFU | unidades formadoras de colônia |
| ROS | do inglês <i>Reactive Oxygen Species</i> |
| MPO | mieloperoxidase |
| NADPH | do inglês, <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i> |
| PAD4 | peptidil arginina deaminase 4 |
| H3cit | histonas citrulinadas |
| INTO | Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad |
| EDTA | ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i> |
| μl | microlitro |
| ELISA | do inglês, <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> |
| AUC | área sob a curva, do inglês <i>area under the curve</i> |
| ROC | do inglês <i>receiver operator characteristic</i> |
| IMC | índice de massa corporal |
| VBNC | viável, mas não culturável, do inglês <i>viable but non-culturable</i> |

1 INTRODUÇÃO

As artroplastias totais de quadril (ATQ) e joelho (ATJ) são consideradas procedimentos cirúrgicos com elevado índice de sucesso na melhora funcional e satisfação do paciente (Learmonth et al., 2007). As projeções para o futuro mostram demanda crescente por essa cirurgia e pelas cirurgias de revisão de artroplastia (Schwartz et al., 2020).

Dentre as causas de revisão de artroplastia, a infecção articular periprotética (IAP) é uma das mais graves. Estima-se que 1% a 3% dos pacientes que se submetem a ATQ primária desenvolverão IAP (Jamsen et al., 2010; Kurtz et al., 2018; Phillips et al., 2006). Nas cirurgias de revisão de ATQ essa incidência é ainda maior, de 3,2% a 14,8% (Badarudeen et al., 2017), com projeção de aumento nos próximos anos (Kapadia et al., 2016). Nas ATJ primárias a infecção ocorre em 1% e 4% dos pacientes e entre 4% e 10% das artroplastias de revisão do joelho (Bozic et al., 2010; Delanois et al., 2017; Gwam et al., 2017; Izakovicova et al., 2019; Tubb et al., 2020). A presença de IAP requer a adoção de medidas terapêuticas específicas, em alguns casos havendo necessidade de retirada dos componentes protéticos e sua substituição por outro. Dessa forma, o diagnóstico precoce e preciso dessa complicação influencia diretamente na escolha da conduta terapêutica mais adequada (Huerfano et al., 2017).

O diagnóstico de IAP pode ser desafiador nos casos em que o paciente não apresenta fístula ativa no local de cirurgia prévia ou sinais clínicos evidentes. As manifestações clínicas, quando presentes, são bastante variáveis, estando relacionadas à virulência do patógeno, mecanismo de infecção e resposta imune do paciente (Bauer et al., 2006; Colvin et al., 2015; Parvizi et al., 2011; Parvizi et al., 2018). Além disso, a presença de biofilmes bacterianos, um achado comum neste tipo

de infecção, também está associada à maior dificuldade no diagnóstico e tratamento (Gbejuade et al., 2015).

Ainda não existe um método diagnóstico padrão ouro que tenha especificidade e sensibilidade suficientes para ser utilizado isoladamente. O médico utiliza a combinação de parâmetros clínicos, exames complementares de imagem e laboratoriais para definição do diagnóstico (Bauer et al., 2006).

Artigos recentemente publicados avaliaram o potencial diagnóstico de moléculas produzidas por neutrófilos no contexto da IAP (Colvin et al., 2015; De Vecchi et al., 2018; Deirmengian et al., 2014; Koh et al., 2017b; Sigmund et al., 2017; Tischler et al., 2014; Wyatt et al., 2016; Zheng et al., 2021) com resultados promissores. Os neutrófilos dispõem de um grande arsenal de combate a microrganismos, envolvendo a produção de espécies reativas de oxigênio e de peptídeos antimicrobianos. Em 2004, Brinkman e colaboradores descreveram um novo mecanismo desencadeado por estas células no combate a patógenos, as redes extracelulares de neutrófilos, também chamadas de NETs (do inglês, *Neutrophil Extracellular Traps*) (Brinkmann et al., 2004).

As NETs são estruturas extracelulares formadas por ácido desoxirribonucleico (DNA), histonas e proteínas bactericidas, capazes de “prender patógenos”, capturando-os e promovendo sua eliminação (Brinkmann et al., 2004; Brinkmann and Zychlinsky, 2012; Miyata and Fan, 2012).

Diversos estudos descreveram o papel das NETs no contexto de doenças parasitárias, autoimunes e neoplasias (Andrews et al., 2014; Bhattacharya et al., 2018; Brinkmann et al., 2004; Brinkmann and Zychlinsky, 2012; Castanheira and Kubes, 2019; Chen et al., 2021; de Buhr and von Kockritz-Blickwede, 2020; Denning et al., 2019; Lee et al., 2017; Logters et al., 2009; Masucci et al., 2020; Masuda et al., 2016;

Mutua and Gershwin, 2021; Papayannopoulos, 2018; Rada, 2019; Schechter et al., 2017; Sorensen and Borregaard, 2016; Speziale and Pietrocola, 2021; Yipp and Kubes, 2013; Zawrotniak and Rapala-Kozik, 2013). Na IAP, ainda não há estudos que tenham investigado a ocorrência deste processo no microambiente articular periprotético infectado. Entretanto, evidências apontam para confirmação da ocorrência de tal processo, uma vez que o líquido sinovial de pacientes com IAP apresenta aumento de neutrófilos e já foi reportado aumento de DNA livre e enzimas relacionadas aos grânulos dos neutrófilos (Cobra et al., 2022).

Nossa hipótese é que, em pacientes com IAP, há a ocorrência de liberação de NETs no líquido sinovial, o que resulta no aumento de biomarcadores relacionados ao processo de NETose. A identificação da ocorrência deste processo permitirá maior compreensão das particularidades da resposta imune nesse contexto específico, auxiliando na identificação de novos marcadores que permitam o diagnóstico e o acompanhamento da evolução desta doença.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Osteoartrite do quadril e joelho

A osteoartrite (OA) é definida como doença resultante de eventos mecânicos e biológicos que desestabilizam o ciclo normal de síntese e degradação dos condrócitos, matriz extracelular e osso subcondral. Pode ser iniciada por múltiplos fatores: genéticos, adquiridos, metabólicos ou traumáticos. A doença envolve todos os tecidos das articulações diartrodiais e manifesta-se por alterações morfológicas, bioquímicas, moleculares, biomecânicas, celulares e na matriz extracelular que levam ao amolecimento, fibrilação, ulceração e perda da cartilagem, terminando com esclerose e erosão do osso subcondral, formação de osteófitos e cistos subcondrais. Quando clinicamente evidente, a doença é caracterizada por artralgia, edema, limitação de movimento, crepitação, efusão ocasional e vários graus de inflamação sem efeitos sistêmicos (Wenham and Conaghan, 2013).

A OA é a doença articular mais comum, acometendo mais de 240 milhões de pessoas no mundo, cerca de 32 milhões apenas nos Estados Unidos da América (EUA). É a causa mais frequente de limitação de atividades em adultos (Katz et al., 2021). A prevalência da OA de quadril, também chamada coxartrose, na população varia de 0,9% a 27%, de acordo com a região estudada (Dagenais et al., 2009; Lespasio et al., 2018). Essa variação pode ser explicada pelos diferentes critérios clínicos e radiográficos utilizados. O custo estimado por perda de produção e empregos nos EUA em trabalhadores de 40 a 65 anos supera os \$7 bilhões (Ricci et al., 2005).

O diagnóstico radiográfico é tardio e o sinal mais precoce é o estreitamento do espaço articular (Jacobsen, 2006; Jacobsen et al., 2004; Reijman et al., 2004). O

exame complementar de imagem com maior sensibilidade para diagnosticar as alterações da OA é a ressonância nuclear magnética chamada dGEMRIC (do inglês, *delayed gadolinium-enhanced magnetic resonance image of cartilage*) (Bittersohl et al., 2011; Fernquest et al., 2021; Zilkens et al., 2012).

Existem alguns fatores de risco para o desenvolvimento da doença, entre os mais comuns estão: idade, genética, obesidade, ocupação, sexo e trauma. Há maior prevalência com o aumento da idade em ambos os sexos, porém homens apresentam maior prevalência antes dos 50 anos e mulheres após essa idade (Dagenais et al., 2009; Lespasio et al., 2018). A obesidade como o fator de risco apresenta variação regional, porém a maioria dos estudos confirma essa associação (Godziuk et al., 2018; Reyes et al., 2016), o mecanismo parece ser a sobrecarga mecânica e a síndrome metabólica que pode acompanhar a obesidade e também propicia alterações metabólicas que influenciam negativamente o desenvolvimento da OA (Harris and Coggon, 2015).

Trabalho manual pesado mostrou associação positiva de causalidade. A maior prevalência foi observada em mulheres que trabalhavam em limpeza (*odds ratio* 6,2), mulheres da indústria de roupas (*odds ratio* 5,0), homens da construção civil (*odds ratio* 2,9) e trabalhadores da agricultura (*odds ratio* 2,8) (Harris and Coggon, 2015; Rossignol, 2004; Rossignol et al., 2005). Nessa população, os sintomas se apresentam precocemente, 40% antes dos 50 anos (Harris and Coggon, 2015).

O sexo feminino apresenta maior prevalência de OA de quadril e joelho, risco este particularmente aumentado após a menopausa (Dagenais et al., 2009; O'Connor, 2006; Pereira et al., 2011; Prieto-Alhambra et al., 2014).

História de trauma na articulação e consequente lesão condral também são importantes fatores de risco, bem como alterações anatômicas como: seqüela de

impacto femoroacetabular (Ganz et al., 2003; Haneda et al., 2020; Lynch et al., 2019; Zilkens et al., 2012), displasia do desenvolvimento do quadril (Ellsworth et al., 2021; Gala et al., 2016; Haneda et al., 2020; Jacobsen, 2006; Lievens et al., 2004), doença de Legg-Calvé-Perthes (Anthony et al., 2021; Kim, 2012; Leroux et al., 2018; Masrouha et al., 2018) e epifisiólise da cabeça femoral (Mathew and Larson, 2019).

2.2 Tratamento não-cirúrgico de osteoartrite do quadril e joelho

O tratamento inicial baseia-se no alívio da dor, utilizando analgésicos e anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES). A associação de acetaminofeno ou paracetamol e AINES mostrou-se mais eficaz do que o placebo no alívio da dor. A dose do acetaminofeno não deve exceder 4 g por dia, devido ao potencial hepatotóxico. Os AINES devem ser monitorados devido aos efeitos gastrointestinais e cardiovasculares (Towheed et al., 2006).

Os condroprotetores, sulfato de glucosamina e condroitina, se propõem a desacelerar a degradação da cartilagem articular estimulando a síntese de glicosaminoglicanas pelos condrócitos e inibindo as enzimas que degradam a cartilagem (Clegg et al., 2006). Alguns estudos mostraram efeito leve em curto prazo para pacientes com OA de quadril e joelho severa e moderada, principalmente no ganho de função (Bruyere and Reginster, 2007; Zhu et al., 2018). Porém, estudos clínicos controlados não mostraram efeito positivo quando comparado ao placebo (Aweid et al., 2018; Liu et al., 2018; Runhaar et al., 2017; Zhu et al., 2018).

Na OA de quadril, perda ponderal e o fortalecimento da musculatura periarticular são usualmente as primeiras recomendações. Não há um exercício específico que mostre ser superior a outro, a escolha deverá ser baseada na facilidade de acesso e execução pela paciente. Exercícios de balanço, incluindo os que

aumentam a habilidade de controle e estabilização da posição do corpo foram os mais frequentemente prescritos (Gay et al., 2016; Kolasinski et al., 2020; Rausch Osthoff et al., 2018; van Doormaal et al., 2020). A viscosuplementação com ácido hialurônico apresenta algumas evidências controversas, porém, principalmente estudos europeus mostram efeito positivo nos sintomas quando realizada com auxílio de fluoroscopia ou ultrassonografia (Bannuru et al., 2019; Chao and Loshak, 2019; Lieberman et al., 2015).

A Academia Americana de Cirurgiões Ortopédicos (AAOS, do inglês *American Academy of Orthopedic Surgeons*) publicou recentemente recomendações para o tratamento da OA do joelho (Brophy and Fillingham, 2022). A perda de peso, realização de exercícios físicos aeróbicos de baixo impacto e utilização de AINES tópicos foram medidas recomendadas com forte significância. O uso de AINES e as osteotomias para alinhamento do valgo ou varo também foram mencionados como eficientes no tratamento da OA nas fases iniciais. Por outro lado, a viscosuplementação com ácido hialurônico e o corticoide intra-articular não obtiveram consenso pelos membros da AAOS.

Os pacientes que apresentam OA severa que não obtiveram sucesso com o tratamento conservador são candidatos ao tratamento cirúrgico, sendo o padrão ouro as ATQs e ATJs.

2.3 Tratamento cirúrgico de osteoartrite do quadril e joelho

As cirurgias preservadoras são as opções não artroplásticas para o tratamento da OA do quadril e joelho, principalmente em casos leves. Seu princípio é a correção de deformidades ou lesões que possam predispor a ocorrências de lesões condrais, que são precursoras da AO. Visam, portanto, a correção de desordens mecânicas a

fim de melhorar a biomecânica da articulação. O fator prognóstico mais importante para o sucesso desses procedimentos é a qualidade da cartilagem da articulação (Domb et al., 2014; Horisberger et al., 2010; O'Connor et al., 2018), refletida pela classificação de Kellgren e Lawrence (Kellgren and Lawrence, 1957), Tönnis (Tönnis, 1976) ou Outerbridge (Outerbridge and Dunlop, 1975). Dentre as principais temos as osteotomias femorais, tibiais ou acetabulares e as artroscopias de quadril ou joelho.

As osteotomias femorais proximais são classificadas como: varizante ou valgizante, em referência a geometria final do fragmento proximal do fêmur. Correções de rotação, comprimento e coronais podem ser adicionadas (Turgeon et al., 2005). Apresentam sobrevida de 70% a 80% em 10 anos (Maistrelli et al., 1990; Morscher, 1979; Turgeon et al., 2005).

As osteotomias acetabulares são classificadas como redirecionamento e salvamento. As de redirecionamento reorientam o acetábulo aumentando a congruência da articulação, que mantém a articulação às custas de cartilagem hialina, indicadas para articulações congruentes. As de salvamento aumentam a congruência da articulação através de contato com fibrocartilagem, indicadas para articulações incongruentes (Turgeon et al., 2005).

A artroscopia de quadril é um método diagnóstico e terapêutico. As principais estruturas que podem ser acessadas e reparadas são a cartilagem hialina, labrum, cápsula articular e colo femoral. Também podem ser acessadas as estruturas periarticulares como tendões dos glúteos mínimo, médio e máximo, passando a se chamar endoscopia do quadril, pois são estruturas extra-articulares (Kelly et al., 2003).

A artroplastia unicompartmental do joelho é utilizada no tratamento da OA do joelho com resultados bons e excelentes em relação à melhora funcional e redução da dor. Porém, este procedimento tem indicação restrita por substituir somente um

compartimento do joelho, não impedindo a evolução da OA pela progressão do desgaste do restante da articulação. Além disso, este procedimento resulta em maior número de cirurgias de revisão em comparação à ATJ (Liddle et al., 2015).

2.4 Artroplastia total de quadril e joelho

As ATQ e ATJ são consideradas procedimentos cirúrgicos com elevado índice de sucesso na melhora funcional e satisfação do paciente (Learmonth et al., 2007). Tais procedimentos estão entre as cirurgias eletivas mais comumente realizadas nos EUA (Schwartz et al., 2020), apresentando bons resultados em relação ao alívio dos sintomas causados pela OA.

As projeções para o futuro mostram demanda crescente por essa cirurgia e pelas artroplastias de revisão. No Reino Unido e nos EUA, cerca de 800.000 artroplastias são realizadas anualmente, com estimativa de aumento acima de 4 milhões até 2030 (Kapadia et al., 2016). Este aumento está relacionado a fatores como: seleção dos pacientes, aumento de procedimentos realizados em jovens, maior longevidade da população e crescente sobrevida das cirurgias de revisão (Bozic et al., 2009). Estima-se que, nos EUA, de 2005 a 2030, haverá crescimento de 174% na demanda por ATQ primária, chegando a 572.000, e crescimento de 137% nas ATQs de revisão. Já as ATJs apresentam previsão de aumento de 673% nesse mesmo período, totalizando mais de quatro milhões de artroplastias primárias nos Estados Unidos em 2030 (Kurtz et al., 2007). Apesar do elevado custo para o sistema de saúde, em torno de 15.000 dólares nos EUA e 12.000 euros na Europa (Cram et al., 2012; van der Woude et al., 2016), quando realizadas em hospitais de referência de grande volume mostram um bom custo benefício (Lavernia et al., 2015; Losina et al., 2009).

As artroplastias são consideradas cirurgias de grande porte e a maioria dos pacientes apresenta idade superior a 50 anos, sendo comum a presença de alguma comorbidade clínica, o que aumenta o risco de complicações cirúrgicas (Kurtz et al., 2007; Nemes et al., 2014; Schwartz et al., 2020). Apesar disso, essas complicações ocorrem em uma pequena parcela das cirurgias, entre as causas mais comuns de cirurgia de revisão de ATQ estão: fratura periprotética, instabilidade, soltura asséptica e infecção (Nemes et al., 2014; Schwartz et al., 2020). As indicações mais comuns para cirurgia de revisão de ATJ são: afrouxamento asséptico (29,8%), infecção (14,8%) e dor (9,5%) (Khan et al., 2016).

2.5 Falhas de artroplastia

Apesar do alto índice de sucesso e baixas taxas de complicações, ainda pode haver necessidade de cirurgias de revisão. A análise de 13.212 ATQs com acompanhamento de 15 a 40 anos, mostrou sobrevida média de 85,7% em 15 anos, 78,8% em 20 anos e 77,6% em 25 anos. Já a análise de registros utilizando como base os Australiano e Finlandês, com 215.676 ATQs e acompanhamento de 15 a 25 anos, mostraram sobrevida de 89,4% em 15 anos, 70,2% em 20 anos e 57,9% em 25 anos (Evans et al., 2019).

Estudo americano realizado em 2014 avaliando revisão de ATQ e ATJ utilizando o banco de dados do NIS (do inglês, *Nationwide Inpatients Sample*), que monitora os custos hospitalares dos EUA, mostrou aumento entre 2006 e 2010 de 40.555 para 49.857 ATQs de revisão, crescimento de 23%; reduzindo de 15,5% dos custos com artroplastias para 14,6% em 2010. A maior parte dos pacientes era do sexo feminino e possuía entre 75 e 84 anos, correspondendo a 65% dos participantes. As indicações cirúrgicas mais frequentes foram instabilidade (22%) e soltura mecânica

ou asséptica (20%), entre as mulheres as mais frequentes foram fratura periprotética e instabilidade. Em 43% dos casos houve revisão dos dois componentes. Os pacientes submetidos a revisão de ATQ apresentam mais comorbidades e piores escores de saúde, internações mais prolongadas e maiores custos do que os submetidos a revisão de ATJ (Kurtz et al., 2014) .

Estudo realizado na Coréia do Sul analisando ATQs primárias e de revisão entre 2010 a 2018, totalizando 228.524 procedimentos, mostrou aumento de 47% nas ATQs primárias, porém não houve aumento das ATQs de revisão, permanecendo com incidência média de 5,5 procedimentos/100.000 habitantes. Houve uma redução dos custos com artroplastia de revisão de ATQ de 14% para 11% no período analisado (Park et al., 2021). Tendência que vem se mostrando semelhante em outros locais do mundo. Porém ainda demanda muito custo financeiro, de 1990 a 2002, 17,5% dos recursos do *Medicare*, o sistema de saúde dos EUA, destinados a ATQ foram utilizados em cirurgias de revisão, comparados a 8,2% dos recursos gastos com artroplastia de revisão de joelho (Kurtz et al., 2005).

A taxa de falha da ATJ em 10 anos é baixa e varia pouco entre diversos países, cerca de 5% no Reino Unido, 4% na Suécia, 5% na Nova Zelândia e 6,8% na Austrália (Khan et al., 2016; Thiele et al., 2015). A análise de 60.355 revisões de ATJ do registro norte-americano no período de 2005 a 2006 identificou que as causas mais comuns da falha de ATJ foram infecções (25%) e soltura asséptica (16%) (Bozic et al., 2010). Outro estudo robusto avaliou 11.134 ATJs realizadas entre 2000 e 2015 e obteve 6,1% de falha com necessidade de revisão, sendo a falha séptica o principal motivo (Koh et al., 2017a).

Além de apresentar elevado custo social e econômico a IAP resulta em índices de mortalidade mais altos que os observados em alguns tipos de câncer, variando entre 2 a 18% (Bozic et al., 2010; Rezapoor and Parvizi, 2015).

2.6 Infecção articular periprotética

A IAP é definida como uma infecção que envolve a prótese articular e os tecidos adjacentes, ocasionando a soltura ou a não integração dos componentes, e representa um grande desafio para os sistemas de saúde (Zardi and Franceschi, 2020). Além de causar incapacidade para o paciente, pode levar a necessidade de tratamento invasivo de longo prazo e com risco significativo de eventos adversos (McNally et al., 2021). A presença do implante é um fator que dificulta o tratamento dessa complicação, visto que esses materiais estão associados a formação de biofilmes (Costerton et al., 1999). Além do elevado custo financeiro, a IAP apresenta índices de mortalidade comparáveis e até maiores do que os observados em algumas neoplasias malignas, podendo chegar a 21% (Natsuhara et al., 2019).

A IAP ocorre em cerca de 1% a 2% das ATQs primárias e 4% das ATQs de revisão (Izakovicova et al., 2019). Nas ATJs primárias ocorre entre 1% e 4% e entre 4% e 10% das ATJs de revisão (Izakovicova et al., 2019; Tubb et al., 2020). Devido ao aumento da expectativa de vida da população e maior mobilidade dos idosos, o número de artroplastias continua a crescer (Kurtz et al., 2007). Esse aumento tende a ser acompanhado por um incremento no número absoluto de IAPs.

Diversas classificações foram descritas para IAP, porém a utilização em comum do critério temporal apresenta correlação com o estágio de maturação do biofilme, o que define a estratégia terapêutica mais efetiva (Davidson et al., 2019; Izakovicova et al., 2019; Zimmerli and Sendi, 2017; Zimmerli et al., 2004).

A Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (IDSA, do inglês *Infectious Diseases Society of America*) classifica a IAP como: precoce quando ocorre em menos de 3 meses após a cirurgia; intermediária quando ocorre de 3 a 24 meses após a cirurgia; e tardia quando ocorre com mais de 24 meses após a cirurgia (Osmon et al., 2013).

Zimmerli propôs uma classificação que guiava o tratamento a ser implementado baseado na temporalidade dos sintomas. Nos casos hematogênicos agudos, quando a artroplastia foi realizada há mais de 2 anos, porém os sintomas de IAP iniciaram em até 3 semanas; ou nos casos agudos (até 4 semanas do procedimento cirúrgico), o implante deveria ser retido e realizado um desbridamento cirúrgico com troca de alguns componentes modulares como cabeça femoral e inserto acetabular. Nos casos crônicos (4 semanas após o procedimento cirúrgico) o implante deveria ser removido, devido formação do biofilme no implante (Zimmerli, 2014).

Tsukayama também classificou as IAPs baseado na temporalidade dos sintomas, dividindo em 4 tipos: tipo I - pacientes submetidos à revisão de artroplastia sem sinais clínicos ou laboratoriais de infecção, em que há o crescimento de microrganismos em culturas microbiológicas de amostras de tecidos ou de líquido sinovial coletados no ato operatório; tipo II - infecção pós-operatória precoce, ocorrendo em até 4 semanas após o procedimento; tipo III - infecção aguda de uma articulação previamente funcionante, precedida por episódios de bacteremia, infecções em outros sítios ou após a realização de procedimentos invasivos em locais diferentes da articulação acometida; e tipo IV - infecção tardia crônica, ocorrendo de forma insidiosa de um mês a dois anos após a cirurgia (Segawa et al., 1999).

As IAPs podem ser mono ou polimicrobianas, as últimas ocorrendo em torno de 6% a 37%. Embora patógenos comuns como *Staphylococcus aureus* sejam

frequentemente isolados nessas infecções, patógenos de maior virulência como *Enterococcus sp.*, bacilos gram-negativos, *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) e bactérias anaeróbicas são, mais comumente, associados às infecções polimicrobianas (Klement et al., 2019; Munoz-Mahamud et al., 2018; Tan et al., 2018; Tan et al., 2016; Villa et al., 2021).

2.7 Diagnóstico da infecção articular periprotética

Ao longo dos anos, diversas comunidades médico-científicas buscaram padronizar a definição de IAP, sendo propostos diversos critérios diagnósticos.

A Sociedade de Infecção Musculoesquelética (MSIS, do inglês, *Musculoskeletal Infection Society*) elaborou um algoritmo em 2011 com o intuito de fornecer uma definição universal que auxiliasse no diagnóstico. Tal instrumento vem sendo periodicamente revisado à luz dos novos testes clinicamente disponíveis e dos resultados de performance reportados em diferentes estudos. Na última revisão, realizada em 2018 no Consenso Internacional de Infecção (ICM, do inglês, *International Consensus Meeting on Musculoskeletal Infection*) (Parvizi et al., 2018) foram estabelecidos os seguintes critérios: critérios maiores incluem a presença de fístula ou crescimento bacteriano em duas ou mais culturas microbiológica de líquido sinovial ou tecido periprotético; e os critérios menores incluem avaliação da proteína C reativa (PCR), velocidade de hemossedimentação (VHS) e D-dímero no plasma; a análise de PCR, alfa defensina, esterase leucocitária e contagem de células brancas e polimorfonucleares no líquido sinovial, além da presença de purulência intra-operatória, avaliação histopatológica da membrana periprotética e resultado positivo em uma cultura microbiológica (**Quadro 1**). Os novos critérios demonstraram uma sensibilidade de 97,7% e uma especificidade de 99,5% (Parvizi et al., 2018).

Quadro 1. Algoritmo para diagnóstico da infecção articular periprotética do Consenso Internacional de Infecções Musculoesquelética de 2018.

| Critérios maiores (pelo menos um positivo) | Decisão |
|--|-----------|
| Duas culturas positivas para o mesmo micro organismo | Infectado |
| Fístula | |

| Diagnóstico pré operatório | Critérios menores | | Pontuação | Decisão |
|----------------------------|-------------------|--|-----------|-------------------------------|
| | Soro | PCR ou d-Dímero elevados | 2 | ≥ 6 Infectado |
| | | VHS elevado | 1 | |
| | Líquido sinovial | Contagem de leucócitos elevada ou esterase leucocitária positiva | 3 | 2-5 Possivelmente infectado * |
| | | Alfa defensina positivo | 3 | |
| | | % PMN elevado | 2 | |
| | | PCR elevado | 1 | |

| Diagnóstico intra operatório | Critérios pró operatórios inconclusivos ou ausência de LS | Pontuação | Decisão |
|------------------------------|---|-----------|-----------------------------|
| | Escore pré-operatório | - | ≥ 6 Infectado |
| | Histopatológico positivo | 3 | 4-5 Possivelmente infectado |
| | Presença de purulência | 3 | |
| | Uma cultura positiva | 2 | ≤ 3 Não infectado |

PCR: proteína C reativa. VHS: velocidade de hemossedimentação. PMN: polimorfonucleares. LS: líquido sinovial.

Porém, o ICM de 2018 não obteve apoio da Sociedade Europeia de Infecções Ósseas e Articulares (EBJIS, do inglês *European Bone and Joint Infection Society*), que em 2021 em conjunto com a MSIS, Sociedade Europeia de Microbiologia Clínica e Doenças Infecciosas (ESCMID, do inglês *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*) e Grupo de Estudos para Infecção associada a Implantes (SGIAI, do inglês *Study Group for Implant-Associated Infections*) publicaram seu documento final (McNally et al., 2021). Esse consenso também leva em consideração aspectos clínicos, laboratoriais sorológicos e avaliação do líquido sinovial, porém

possui mais sensibilidade na identificação de infecções causadas por germes de baixa virulência, frequentemente subdiagnosticados nos consensos anteriores (**Quadro 2**).

Quadro 2. Algoritmo para diagnóstico de infecção articular periprotética da Sociedade Europeia de Infecções Ósseas e Articulares.

| | Infecção improvável (todos os achados negativos) | Possivelmente infectado (dois achados positivos) | Infecção confirmada (qualquer achado positivo) |
|--|---|--|---|
| Exames clínicos e sorológicos | | | |
| Características clínicas | Presença de causas alternativas evidentes para falha do implante (ex: fratura, tumor, mal posicionamento) | <ul style="list-style-type: none"> Sinais radiográficos de soltura nos primeiros cinco anos após a colocação do implante Problemas prévios de cicatrização Histórico de febre ou bacteremia recentes Purulência ao redor do implante | Fístula |
| Proteína C reativa | | > 10 mg/l (1 mg/dl) | |
| Citometria do líquido sinovial | | | |
| Contagem de leucócitos (cells/ μ l) | \leq 1,500 | > 1,500 | >3,000 |
| PMN (%) | \leq 65% | > 65% | > 80% |
| Biomarcadores do líquido sinovial | | | |
| Alfa defensina | | | Resultado positivo no imuno ensaio ou teste lateral |
| Microbiologia | | | |
| Artrocentese | | Cultura positiva | |
| Intra-operatório (tecidos e fluidos) | Todas as culturas negativas | Uma cultura positiva | \geq 2 culturas positivas para o mesmo microorganismo |
| Sonicação (CFU/ml) | Sem crescimento | > 1 CFU/ml de qualquer microorganismo | > 50 CFU/ml de qualquer microorganismo |
| Histologia | | | |
| Grande aumento (magnificação de 400x) | Negativo | Presença de \geq cinco neutrófilos por campo de grande aumento | Presença de \geq cinco neutrófilos em \geq cinco campos de grande aumento |
| | | | Presença de microorganismos visíveis |
| Outros | | | |
| Imagem nuclear | Cintilografia óssea trifásica negativa | Cintilografia com leucócitos marcados positiva | |

PMN: polimorfonucleares. CFU: unidades formadoras de colônia.

2.7.1 Fisiopatologia da infecção articular periprotética

A IAP é causada principalmente por bactérias e a contaminação pode ocorrer por três mecanismos diferentes: inoculação intraoperatória, disseminação contígua de um sítio adjacente infectado ou por via hematogênica. Cerca de dois terços dos casos são causados pela inoculação intraoperatória direta, a maioria ocorrendo até 1 ano após o procedimento cirúrgico (Zimmerli, 2014). A virulência microbiana tem papel

importante na manifestação clínica e no tempo de aparecimento dos sintomas, podendo ocorrer de forma precoce ou tardia. As formas precoces apresentam manifestações locais intensas como hiperemia, edema, dor, sinais inflamatórios sistêmicos e são, predominantemente, causadas por patógenos de alta virulência. Infecções tardias apresentam sintomas e sinais mais brandos e arrastados, sendo o diagnóstico menos óbvio; são predominantemente causadas por organismos de baixa virulência. Uma vez em contato com a superfície do implante, os microrganismos a colonizam. Um fator significativo neste processo é o baixo inoculo de microrganismos necessários para estabelecer infecção na presença do material protético, reduzida em mais de 100 mil vezes na presença de um corpo estranho. Esta diferença é explicada pela formação de biofilme no caso do corpo estranho (Tande and Patel, 2014). A presença do implante induz uma menor capacidade fagocítica por parte dos granulócitos encontrados no tecido periprotético, além de favorecer a adesão e proliferação bacteriana, resultando numa imunodeficiência local (Davidson et al., 2019; Izakovicova et al., 2019; Kapadia et al., 2016; Parvizi et al., 2015).

A disseminação contígua da infecção a partir de um local adjacente é outro mecanismo pelo qual a IAP pode ser iniciada. No período pós-operatório precoce, a infecção superficial do sítio cirúrgico pode progredir para envolver a prótese, devido a cicatrização superficial e de planos profundos incompletos. No entanto, a propagação contígua pode também ocorrer mais tarde se o plano do tecido normal for novamente lesado através de trauma ou cirurgia em um local adjacente. Exposição do implante através de um envelope de tecidos moles prejudicado também pode predispor pacientes a um início tardio de infecção contígua (Tande and Patel, 2014).

O último tipo de mecanismo é o hematogênico, no qual a prótese é infectada através de um foco primário a distância. Todas as próteses permanecem susceptíveis

a esse mecanismo de infecção durante todo período de implantação. A alta vascularização dos tecidos periprotéticos expõem a prótese a esse alto risco durante os primeiros anos após sua implantação. Os pacientes tipicamente se apresentam com sintomas agudos de infecção após um período longo de pós-operatório assintomático. Os principais sítios primários de infecção são: pele e tecidos moles, trato respiratório, gastrointestinal e urinário, podendo acontecer também após procedimentos dentários. Dispositivos intravasculares tem maior risco, podendo causar infecção mesmo com bactérias de baixa virulência, como *Staphylococcus epidermidis* (Izakovicova et al., 2019).

A capacidade de crescimento e persistência na superfície dos implantes e tecidos necróticos na forma de biofilme representa o mecanismo básico de sobrevivência no qual os microrganismos resistem a fatores ambientais. O biofilme fornece um arcabouço que, além de favorecer o crescimento das bactérias, serve como uma proteção contra a ação do sistema imune e de antibióticos. Os microrganismos aderem imediatamente a superfície do implante após o primeiro contato. Nas primeiras horas da adesão e proliferação celular há formação de micro colônias e crescimento inicial do biofilme, o qual demora 4 semanas para amadurecer e representa um complexo no qual microrganismos de uma ou várias espécies vivem encrustados em ambiente altamente hidratado. A depleção de substâncias metabólicas e acúmulo de produtos residuais faz com que entrem em um estado de crescimento lento ou estacionário. Bactérias planctônicas podem se desprender a qualquer momento, ativando o sistema imunológico do hospedeiro, causando inflamação, edema, dor e afrouxamento precoce do implante (**Figura 1**). Quase todas as bactérias na natureza residem em biofilme. A maior parte das infecções relacionadas a implantes com formação de biofilme são causadas por *Staphylococcus*

aureus, *Staphylococcus epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa* (Davidson et al., 2019; Izakovicova et al., 2019).

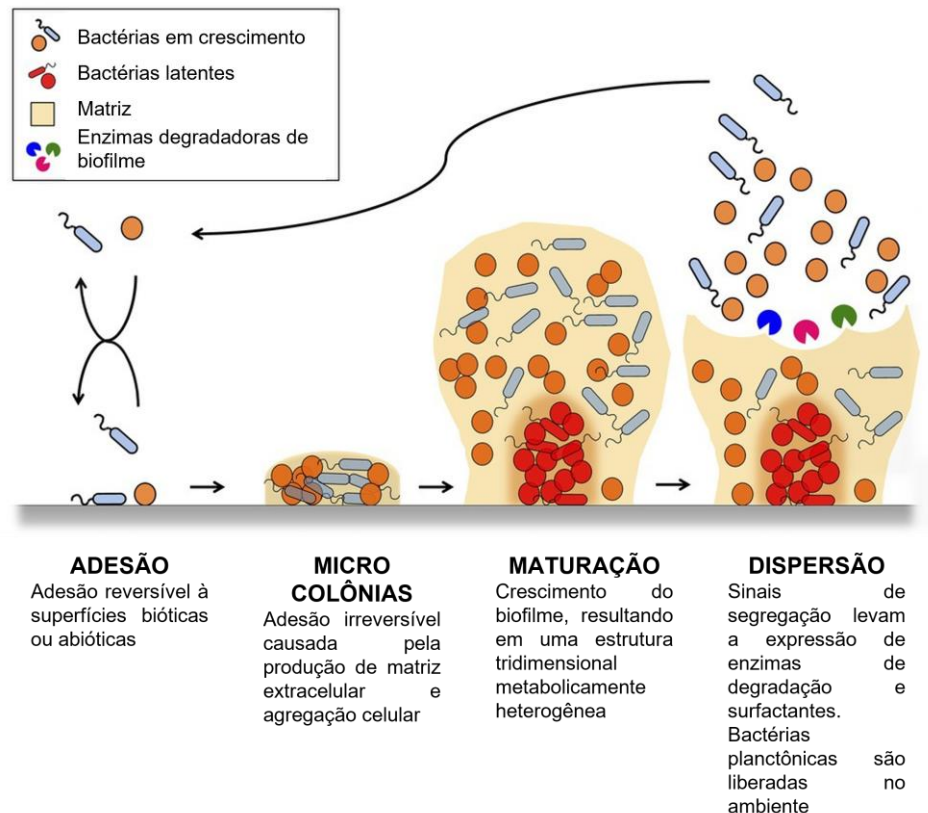


Figura 1. Biofilme bacteriano. Figura esquemática representando os componentes estruturais e os estágios de formação e maturação de biofilmes bacterianos. Adaptado <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.02041/full>

Devido as características homeostáticas do biofilme, as bactérias que habitam sua parte central estão submetidas a depleção de recursos, em resposta ao intenso consumo energético das bactérias localizadas na periferia do mesmo. O que faz com que as centrais reduzam seu metabolismo, entrando num estado de latência, formando pequenas colônias, permitindo a essas bactérias sobreviverem a altas concentrações de antibióticos (Davidson et al., 2019; Del Pozo and Patel, 2009; Gimza and Cassat, 2021; Gries and Kielian, 2017; McConoughey et al., 2014; Zoller et al.,

2020). A esse estágio de metabolismo bacteriano é dado o nome de viável mas não culturável (VBNC, do inglês *viable but non-culturable*) (Ramamurthy et al., 2014).

Outra forma de resistência das bactérias relacionadas a IAP é sua capacidade de invadir outras células, como macrófagos, osteoblastos e osteócitos, sobrevivendo e proliferando no seu interior, reduzindo sua exposição aos antibióticos e ao sistema imunológico do hospedeiro (Davidson et al., 2019; Gimza and Cassat, 2021; Yan et al., 2018; Zoller et al., 2020). Essa capacidade de sobreviver dentro de outras células ajuda a explicar a dificuldade de detecção dessas bactérias em métodos convencionais de cultura, podendo chegar a 50% de culturas negativas em IAP (Goh and Parvizi, 2022).

2.7.2 Resposta imune no contexto da IAP

No ambiente articular da infecção periprotética ocorre uma extensa reação inflamatória caracterizada, principalmente, por infiltrado inflamatório composto por neutrófilos (Antony and Farran, 2016; Vrgoc et al., 2014). Os neutrófilos são células do sistema imune inato que apresentam inúmeros grânulos citoplasmáticos contendo diversas proteínas e moléculas com ação antimicrobiana. Estas células representam a primeira linha de defesa do hospedeiro contra a infecção (Korn et al., 2020; Tande and Patel, 2014). No estágio inicial de uma infecção, moléculas inflamatórias e quimiotáticas liberadas localmente atraem os neutrófilos, que então migram rapidamente da corrente sanguínea para os tecidos infectados, onde se ligam, englobam e matam os microrganismos. Os neutrófilos utilizam três estratégias principais: fagocitose, degranulação e geração de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*) (Kaplan and Radic, 2012). Em 2004, Brinkmann et al. (Brinkmann et al., 2004) descreveram um novo mecanismo

bactericida destas células: as redes extracelulares de neutrófilos (NETs, do inglês *Neutrophil Extracellular Traps*) (Tan et al., 2021).

As NETs são estruturas extracelulares formadas por uma malha de fibras de cromatina que são associadas a histonas (H1, H2A, H2B, H3 e H4) e proteínas, incluídas nos grânulos dos neutrófilos, como elastase de neutrófilos, mieloperoxidase (MPO), catepsina G, proteinase 3, proteína do grupo de alta mobilidade B1, calprotectina, catelicidinas e defensinas (**Figura 2**) (Miyata and Fan, 2012).

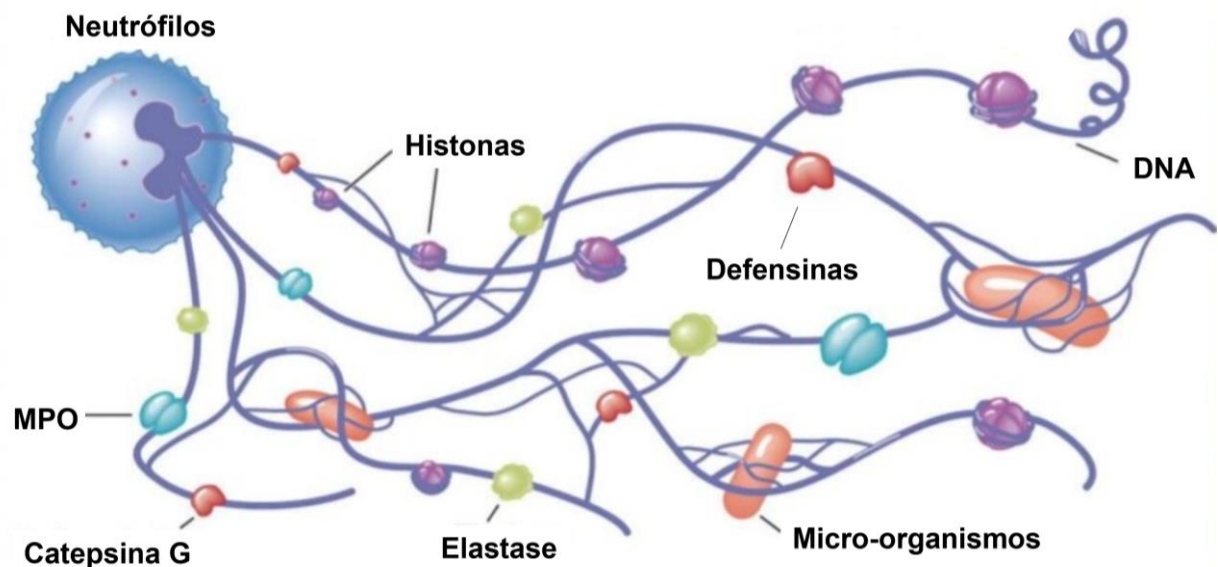


Figura 2. Estrutura das redes extracelulares de neutrófilos. Figura esquemática representando as diferentes biomoléculas que compõem as redes extracelulares de neutrófilos. Adaptado de Miyata e Fan (2012).

O mecanismo central de formação das NETs requer a ativação dos neutrófilos, descondensação da cromatina e liberação das NETs (**Figura 3**) (Brinkmann and Zychlinsky, 2012).

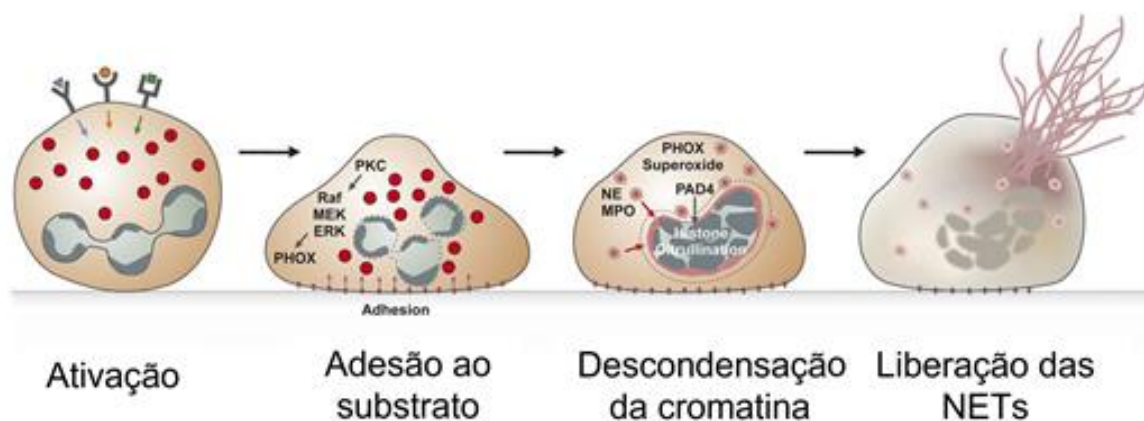


Figura 3. Etapas do processo de formação das NETs. Figura esquemática do processo de NETose, evidenciando as principais etapas deste a ativação dos neutrófilos até a liberação das NETs. Adaptado de Brinkman e Zychlinsky, 2012.

A maior parte do DNA que forma as NETs é proveniente do núcleo, no entanto essas estruturas também podem conter DNA de origem mitocondrial. As NETs podem prender, neutralizar e matar bactérias, fungos, vírus e parasitas, e já foi demonstrado que são capazes de prevenir a disseminação desses micro-organismos (Kaplan and Radic, 2012; Tan et al., 2021).

Além de desempenhar um papel central na imunidade antimicrobiana inata, estudos tem demonstrado que as NETs desempenham um papel prejudicial na fisiopatologia de muitas doenças infecciosas e não infecciosas. Por exemplo, as NETs induzem inflamação e promovem danos na sepse, induzem danos vasculares e desempenham um papel importante na promoção de aterosclerose e trombose. Quando liberadas de forma desregulada, as NETs também contribuem para a patogênese de doenças autoimunes (Tan et al., 2021).

Inicialmente, acreditava-se que o processo de formação das NETs exigia a morte celular dos neutrófilos através de mecanismo distintos de outros tipos de morte celular como a apoptose e necrose. Dessa forma, o processo de formação destas estruturas foi chamado de NETose. Atualmente, é sabido que as NETs também

podem ser liberadas através de mecanismo compatíveis com a viabilidade dos neutrófilos ao final da jornada, o que fez com que o termo NETose venha sendo utilizado para descrever o estado dos neutrófilos que liberam as NETs independentemente da viabilidade dos neutrófilos ao final dele. Diversos processos descrevem as alterações celulares que precedem a liberação dessas redes e que diferem entre si quanto à dependência da ativação de NADPH oxidase (do inglês, *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*), a origem do DNA liberado e a viabilidade do neutrófilo ao seu final. Dessa forma, as NETs podem ser classificadas em três tipos: NETose suicida, liberados através da morte celular; NETs vitais, liberados por células viáveis mediada por uma liberação vesicular de DNA nuclear; e NETs mitocondriais, compostos de DNA mitocondrial liberado por células viáveis (Tan et al., 2021).

Na NETose suicida, as membranas nucleares e granular se desintegram. A cromatina sofre descondensação e se dispersa no citoplasma, misturando-se com as proteínas citoplasmáticas. Por fim, as NETs são liberadas no espaço extracelular pela ruptura da membrana plasmática (Fuchs et al., 2007).

A formação de NETs vital ocorre sem morte celular ou mesmo sem a ruptura da membrana plasmática e não há liberação de DNA mitocondrial. Ao contrário da NETose suicida, os neutrófilos retêm algumas funções normais, como a fagocitose. Outra diferença entre NETose suicida e NETs vital é o tempo de liberação das NETs. Enquanto a NETose suicida requer várias horas após a estimulação para a formação de NETs, a formação de NETs vital ocorre dentro de um curto período após a estimulação de neutrófilos (Yipp and Kubes, 2013).

As NETs mitocondriais são formadas quando os neutrófilos liberam o DNA mitocondrial como armadilhas extracelulares. Essa liberação ocorre de maneira

dependente das ROS e não resultam em morte celular lítica. Esse fenômeno também foi observado em outras condições, como no câncer anaplásico da tireoide e no pós-operatório de cirurgia ortopédica (**Figura 4**) (Yousefi et al., 2009; Zhu et al., 2021).

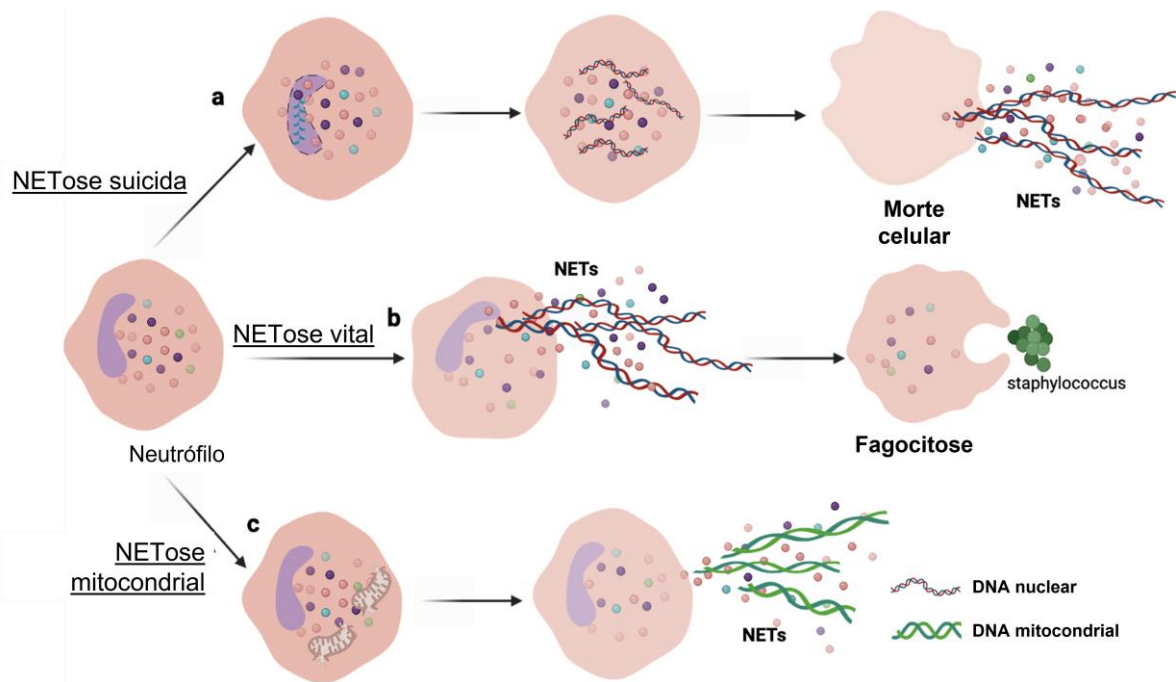


Figura 4. Mecanismos de liberação das redes extracelulares de neutrófilos. O mecanismo clássico de NETose suicida (a) é caracterizado pela descondesação da cromatina, ruptura da membrana nuclear e dos grânulos, seguido de ruptura da membrana plasmática e morte celular. Na Netose vital, após a liberação das NETs, os neutrófilos permanecem viáveis e capazes de realizar fagocitose. Na NETose mitocondrial (c) a estrutura de cromatina liberada é composta por DNA mitocondrial e não DNA nuclear. Adaptado de Zhu et al, 2021.

As NETs são produzidas em resposta a uma ampla gama de estímulos, como bactérias, fungos, vírus e células tumorais (Amulic et al., 2017; Brinkmann et al., 2004; Saitoh et al., 2012; Tilley et al., 2022; Urban et al., 2006). Os diferentes tipos de NETose podem ser deflagrados por estímulos distintos através da ativação de numerosas vias de sinalização intracelulares. As bases moleculares que medeiam a liberação das NETs, apesar de extensivamente estudadas, ainda são pouco compreendidas.

O mecanismo clássico, e mais bem descrito, de formação de NETs, é o da NETose suicida e inicia-se com a descondensação da cromatina mediada pela enzima Peptidil Arginina Deaminase 4 (PAD4), uma enzima expressa principalmente em neutrófilos. Esta enzima é translocada para o núcleo, onde promove a citrulinização da histona H3. No processo de citrulinização, os resíduos positivamente carregados do aminoácido arginina da histona H3 são convertidos em citrulina, que tem carga neutra. Dessa forma, há redução da interação eletrostática entre a histona H3 e o DNA, resultando na descondensação da cromatina, a etapa inicial da NETose. Portanto, a histona H3 citrulinada é considerada um marcador específico do processo de NETose (**Figura 5**) (Mohan et al., 2012; Thalin et al., 2017; Thiam et al., 2020).

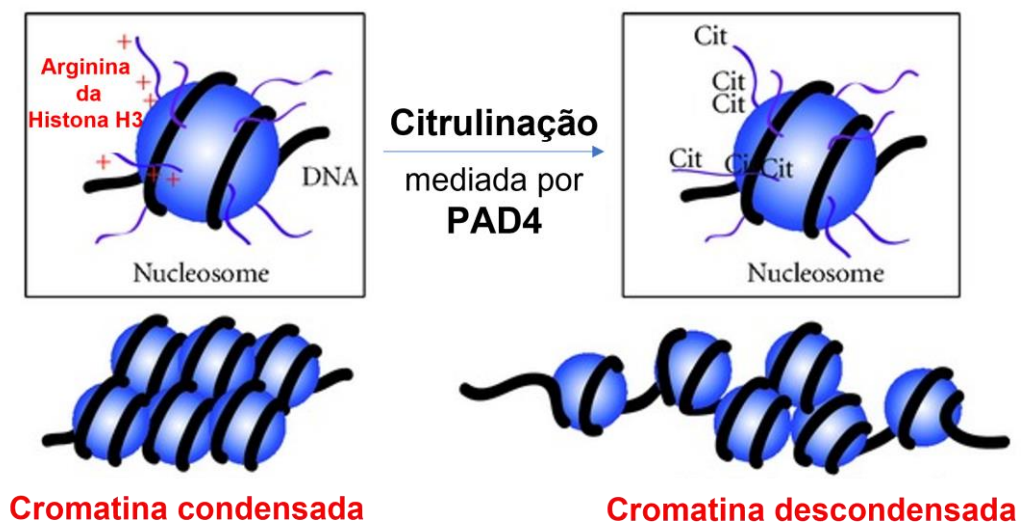


Figura 5. Descondensação da cromatina mediada por PAD4. A enzima PAD4 media a citrulinização dos resíduos de arginina positivamente carregados da histona H3. Ocorre a neutralização da interação eletrostática entre esta histona e o DNA, resultando na descondensação da cromatina. Adaptado de Mohanan et al, 2012.

Diversos estudos mostraram que a enzima PAD4 é essencial para o processo de NETose, entretanto, algumas evidências apontam que o processo de NETose pode

ocorrer mesmo na ausência de atividade desta enzima, de forma estímulo dependente. Ainda há diversas lacunas a serem preenchidas sobre o papel da PAD4 no processo de liberação das NETs (Thiam et al., 2020).

2.8 Avaliação da liberação das NETs

Os estudos que investigam o processo de liberação das NETs nas diferentes doenças se baseiam, principalmente, na estimulação *in vitro* de neutrófilos e avaliação da susceptibilidade destas células ao processo de NETose. Entretanto, apesar de tecnicamente complexo, estes ensaios podem não recapitular de forma fidedigna os processos que acontecem *in vivo* (Carmona-Rivera and Kaplan, 2016; Healy et al., 2016).

O processo de NETose pode ser estudado ainda através de técnicas de citometria de fluxo que buscam identificar a presença de neutrófilos ativado associados a marcadores específicos como a histona H3 citrulinada, ou ainda aqueles que apresentam moléculas de DNA associadas a sua superfície, através do uso de sondas intercalantes de DNA impermeáveis a membrana plasmática (Gavillet et al., 2015; Masuda et al., 2017; Zharkova et al., 2019).

Outra forma de avaliação deste processo, é através da quantificação de marcadores relacionados ao processo de liberação das NETs no plasma ou nos fluidos biológicos. Neste contexto, tem sido utilizada a quantificação de DNA livre, nucleossomos e das enzimas mieloperoxidases e elastase de neutrófilos, através de ensaios imunoenzimáticos. Entretanto, é importante ressaltar que os resultados da avaliação dos biomarcadores relacionados ao processo de NETose devem ser analisados com atenção, uma vez que alguns deles, quando utilizados de forma

isolada, podem refletir a ocorrência de outros processos que não a liberação das NETs. O aumento de DNA livre, por exemplo, pode ser resultado de lesão tecidual, apoptose ou necrose. As enzimas dos grânulos, como mieloperoxidase e elastase, podem ser liberadas a partir da ativação e degranulação dos neutrófilos, em mecanismos independentes da liberação das NETs. De acordo com diversos estudos, dada a necessidade de citrulinização das histonas para o processo de descondensação da cromatina, que antecede o processo de liberação das NETs, a presença de histona H3 citrulinada é considerada um marcador específico do processo de liberação das NETs, sendo considerado um achado característico do processo de NETose (Thalin et al., 2017).

2.9 NETs como biomarcador de doenças

Diversos estudos descreveram o papel das NETs no contexto de doenças infecciosas, autoimunes e até mesmo no neoplasias (37). Em pacientes com tuberculose, inflamações crônicas das vias aéreas, trombose e em alguns tipos de cânceres são reportados aumentos destas estruturas no plasma. Além disso, estudos recentes indicam que elas também participam da resposta imune gerada contra bactérias formadoras de biofilme, o que é de grande interesse no contexto das IAP (Bhattacharya et al., 2018; Masuda et al., 2016; Meyle et al., 2010; Mutua and Gershwin, 2021; Schechter et al., 2017).

Na área da ortopedia, ainda não há estudos que tenham avaliado, especificamente o processo de NETose no líquido sinovial de pacientes com IAP. Entretanto, dois artigos já identificaram o aumento de biomarcadores relacionados a este processo no LS de pacientes com infecções osteomusculares. Lögters e colaboradores, avaliaram 42 pacientes, 9 deles com diagnóstico de artrite séptica,

sendo reportado aumento significativo de DNA livre e da enzima mieloperoxidase no líquido sinovial dos pacientes com artrite infecciosa quando comparado com pacientes com artrite asséptica (Logters et al., 2009). Cobra e colaboradores (2022) avaliaram o líquido sinovial de pacientes com IAP pós ATJ e também reportaram aumento expressivo de DNA livre nos pacientes com IAP em relação ao grupo asséptico (Cobra et al., 2022). Ambos os estudos sugerem a liberação de NETs como uma potencial fonte deste DNA, entretanto os estudos não exploram esta hipótese.

A quantificação das NETs vem sendo estudada como método diagnóstico de várias doenças crônicas infecciosas, na avaliação da agressividade tumoral e como preditor do desenvolvimento de eventos tromboembólicos. Para isso, foram desenvolvidos e avaliados diferentes métodos para investigar o processo de NETose e consequente liberação destas estruturas. Importante salientar que, apesar de serem estruturas formadas por DNA, a simples quantificação desta macromolécula não é suficiente para confirmar o processo de NETose, já que este DNA pode ser oriundo de outras células ou até mesmo de bactérias. Por serem estruturas complexas, as NETs podem ser avaliadas de diversas formas, seja pela quantificação de DNA livre associado à quantificação de enzimas específicas de neutrófilos, como mieloperoxidase (MPO) e elastase de neutrófilo (NE), histonas citrulinadas (H3cit), complexo de DNA + histona, complexo DNA + MPO, complexo DNA + NE, entre outros. Contudo, cada método tem suas limitações e vantagens, apresentando diferentes graus de dificuldade na sua execução e diferentes sensibilidades (Xu et al., 2022).

Acreditamos que o estudo mais aprofundado da resposta deflagrada por neutrófilos no contexto da IAP, principalmente o processo de liberação das NETs, permitirá uma maior compreensão das particularidades da resposta imune no contexto

da IAP, permitindo a identificação de novos marcadores que auxiliem no diagnóstico e acompanhamento da evolução desta doença.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os biomarcadores relacionados ao processo de liberação de redes extracelulares de neutrófilos no líquido sinovial de pacientes com infecção articular periprotética de quadril e joelho.

3.2 Objetivos Específicos

- Descrever as características clínicas e pessoais dos pacientes submetidos a cirurgia de revisão de artroplastia de quadril e joelho
- Determinar a quantidade de DNA livre no líquido sinovial de pacientes submetidos a cirurgia de revisão de artroplastia de quadril e joelho com e sem IAP
- Determinar a quantidade de mieloperoxidase no líquido sinovial de pacientes submetidos a cirurgia de revisão de artroplastia de quadril e joelho com e sem IAP
- Determinar a quantidade de histona H3 citrulinada no líquido sinovial de pacientes submetidos a cirurgia de revisão de artroplastia de quadril e joelho com e sem IAP
- Avaliar a performance dos diferentes marcadores do processo de NETose no diagnóstico da IAP de quadril e joelho.

4 METODOLOGIA

4.1 Desenho Experimental

Foi realizado um estudo prospectivo com pacientes atendidos nos Centro de Atenção Especializada do Quadril e Joelho do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad (INTO), submetidos à cirurgia de revisão da artroplastia total de quadril ou joelho entre janeiro de 2021 a janeiro de 2022.

4.2 Aspectos éticos e participantes do estudo

A realização do estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética Institucional sob parecer: 21100519.1.0000.5273 (**Anexo A**). Foi realizado um estudo prospectivo com pacientes submetidos à cirurgia de revisão de artroplastia de quadril ou joelho no Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad, com autorização prévia dos participantes do estudo mediante o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), de acordo com as normas da Resolução do CNS nº 466 de 12/12/2012 (**Anexo B**). Foram incluídos pacientes de ambos os sexos com idade maior ou igual a 18 anos.

Os critérios de exclusão foram:

- pacientes que se recusarem a assinar o TCLE;
- pacientes que não tinham informações suficientes para a conclusão do diagnóstico de infecção periprotética;
- pacientes com doenças inflamatórias crônicas, como lúpus e artrite reumatóide; e doenças infecciosas, como hepatite C e HIV;

- pacientes submetidos à revisão de artroplastia unicompartmental do joelho;
- pacientes submetidos ao 2º tempo de revisão (reimplante em pacientes com espaçador);
- pacientes que utilizaram medicações antibióticas no período de 15 dias prévios ao procedimento cirúrgico;
- aqueles em que não foi possível a coleta de líquido sinovial;
- pacientes com IAP aguda;
- pacientes com pontuação entre 4-5 no algoritmo do Consenso Internacional de Infecções Musculoesquelética de 2018 e
- pacientes cujo líquido sinovial apresentava contaminação visível e grosseira com sangue.

Para confirmação do diagnóstico da IAP, foram utilizados os critérios do Consenso Internacional de Infecção de 2018 (**Quadro 1**).

4.3 Coleta de dados

Os pacientes incluídos no estudo foram avaliados quanto à presença de dor, edema e calor na articulação acometida, fístula ou secreção purulenta. Os prontuários foram consultados para coleta dos resultados dos exames pré-operatórios, informações como data de nascimento, sexo, peso, altura, data da primeira cirurgia, qual tipo de cirurgia foi submetido, início dos sintomas e comorbidades.

4.4 Coleta de materiais

No dia anterior à cirurgia de revisão, todos os pacientes foram submetidos à punção venosa periférica e coleta de amostra de sangue para realização de exames sorológicos da rotina pré-operatória da instituição, a qual incluía VHS, PCR e D-dímero.

No dia da cirurgia foi realizada coleta de sangue venoso utilizando tubos de coleta de sangue à vácuo contendo EDTA (do inglês, *ethylenediamine tetraacetic acid*).

Todos os pacientes foram submetidos à revisão de ATJ receberam anestesia raquidiana associada a bloqueio periférico dos nervos isquiático e femoral ou do canal adutor com auxílio de instrumento de eletroestimulação ou guiado por ultrassonografia. Todos os procedimentos foram realizados sob isquemia com o manguito pneumático posicionado na porção proximal da coxa e inflado com pressão de 100 mmHg superior à pressão arterial sistólica. Os pacientes submetidos a revisão de ATQ receberam anestesia geral associada a bloqueio periférico do nervo femoral guiado por ultrassonografia. A degermação e preparação do membro a ser operado foram realizadas com solução de clorexedina degermante 2% e clorexedina alcoólica 0,5%.

O líquido sinovial foi coletado durante a cirurgia. Nas revisões da ATJ a coleta das amostras de líquido sinovial foi realizada antes da incisão cirúrgica, após a colocação dos campos cirúrgicos e realização da isquemia através de punção com seringa de 20 ml e agulha de 1,2 x 40 mm, isto é, sem acesso cirúrgico e, também, sem bloqueio anestésico local adicional ou soro fisiológico a 0,9%, com objetivo de minimizar a contaminação do líquido sinovial por sangue ou outros agentes. Nos casos em que não foi possível a coleta de LS nesse momento, uma segunda tentativa

foi realizada por visualização direta após realização do acesso cirúrgico parapatelar medial (**Figura 6**).

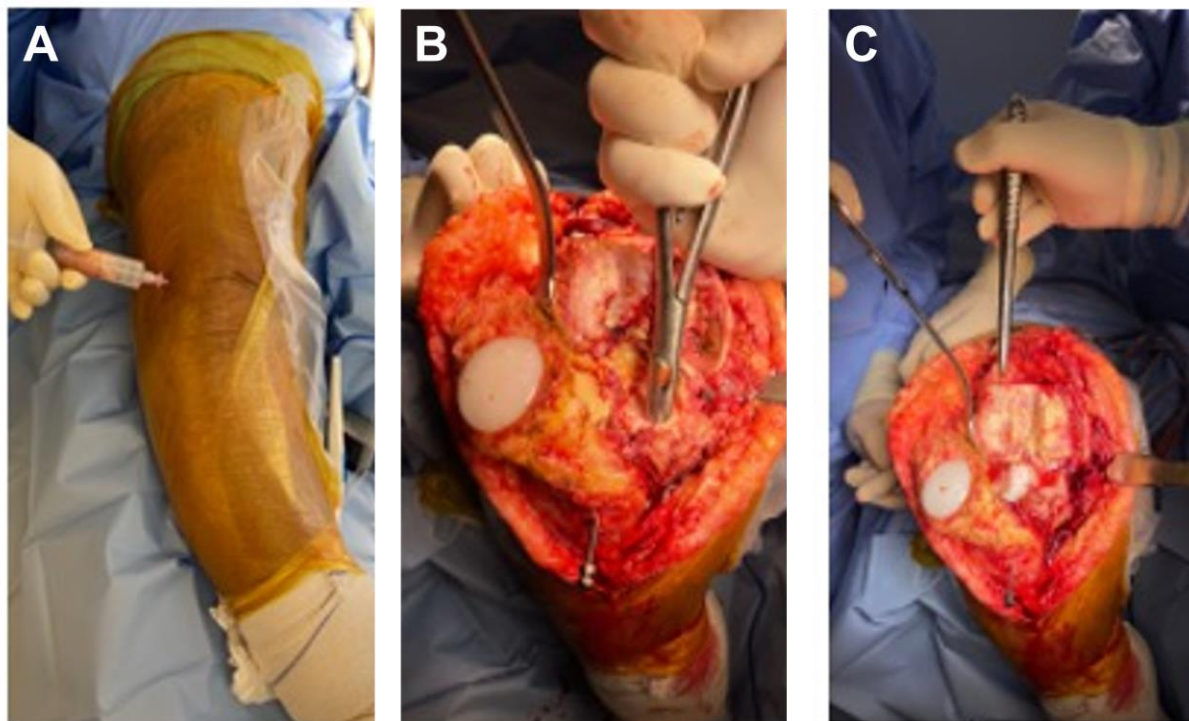


Figura 6. Procedimento cirúrgico e coleta de materiais biológicos na ATJ de revisão. (A) Após a colocação dos campos estéreis, foi realizada a artrocentese antes da incisão cirúrgica para evitar contaminação do líquido sinovial por sangue, (B) Coleta de amostras de tecido ósseo periprotético para análise microbiológica, (C) Coleta de membrana periprotética para análise histopatológica. Fonte: Imagens cedidas por Alan Mozella.

Nas revisões da ATQ a coleta das amostras de líquido sinovial foi realizada antes da abertura da capsula articular, após a colocação dos campos cirúrgicos, através de punção com seringa de 20 ml e agulha de 1,2 x 40 mm, também sem bloqueio anestésico local adicional ou soro fisiológico a 0,9%. Na impossibilidade de coleta do líquido sinovial nesse momento, uma segunda tentativa foi realizada por visualização direta após realização da capsulotomia posterior. Após a coleta, o LS foi imediatamente transferido para tubo a vácuo contendo EDTA (**Figura 7**).

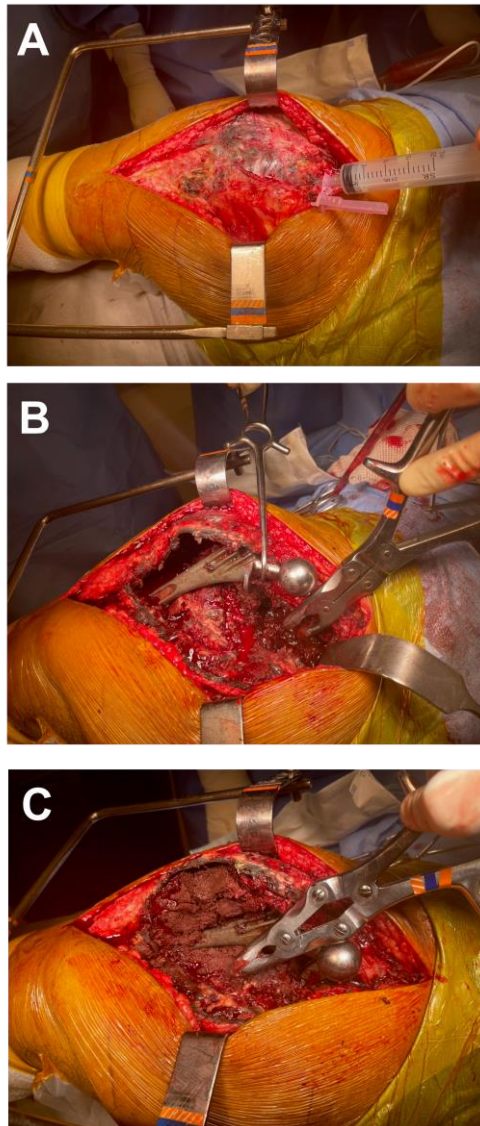


Figura 7. Procedimento cirúrgico e coleta de materiais biológicos na ATQ de revisão. (A) Após a incisão e exposição da capsula articular do quadril, foi realizada a artrocentese (B) Coleta de amostras de tecido ósseo e membrana periprotetica acetabular para cultura (C) Coleta de amostras de tecido ósseo e membrana periprotetica femoral para cultura. Fonte: Acervo do autor.

Foram coletados ainda fragmentos de membrana periprotética e fragmentos ósseos das regiões acetabular e femoral na ATQ e tibial e femoral na ATJ totalizando 6 amostras por cirurgia, 5 enviadas para cultura microbiológica e 1 enviado para exame histopatológico (**Figuras 6B, 6C, 7B e 7C**).

A coleta de líquido sinovial dos fragmentos de membrana periprotética e de fragmentos ósseos faz parte da rotina do hospital para o diagnóstico de infecção periprotética.

4.5 Cultura microbiológica

Para as análises microbiológicas, foram usados fragmentos da membrana periprotética, fragmentos ósseos e amostras do líquido sinovial. Para as análises microbiológicas da membrana periprotética e tecido ósseo, imediatamente após a coleta, os fragmentos ósseos foram acondicionados em tubos estéreis. Em cada tubo estéril foi adicionado 1 mL de soro fisiológico 0,9%. Quanto ao líquido sinovial, entre 3 e 5 ml foram inoculados em frascos de hemocultura aeróbio e anaeróbio. As amostras foram imediatamente enviadas ao laboratório de microbiologia do INTO, para realização dos testes de cultura microbiológica, de acordo com a rotina adotada pela instituição. Todas as amostras foram cultivadas por 14 dias. As informações sobre o número de culturas positivas e tipo de microrganismos isolados foram coletadas do laudo fornecido pelo laboratório (**Figura 8**).

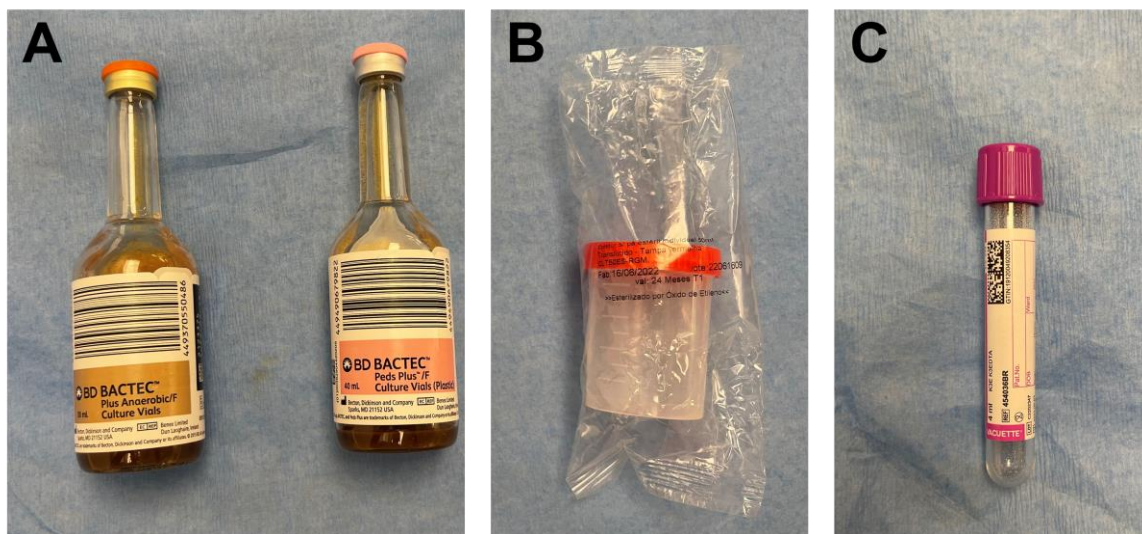


Figura 8. Análise microbiológica e contagem celular do líquido sinovial. (A) Frascos de hemocultura utilizados para realização de culturas microbiológicas do líquido sinovial coletado durante o procedimento cirúrgico (B) Frasco estéril utilizado para culturas microbiológicas de membrana periprotética e tecido ósseo (C) Tubo a vácuo de coleta de sangue contendo EDTA utilizado para acondicionamento de líquido sinovial destinado à contagem total de leucócitos e percentual de polimorfonucleares. Fonte: Acervo do autor.

4.6 Avaliação histopatológica

Para o exame histopatológico, fragmentos de membrana periprotética foram armazenados em frasco contendo formol a 10% e enviados para a Unidade de Anatomia Patológica do INTO, onde foram processados e analisados de acordo com o protocolo institucional, sendo avaliados em grande aumento microscópico (400 x) por médico patologista. As membranas foram classificadas de acordo com os parâmetros propostos por Morawietz e colaboradores (2009) e corroborados por Krenn e colaboradores (2014), em que a membrana periprotética é avaliada quanto às características do infiltrado inflamatório, presença de fibrose, *debris* celulares e número de neutrófilos por campo (**Quadro 3**) (Krenn et al., 2014; Morawietz et al., 2009).

Quadro 3. Classificação de Morawietz para avaliação da membrana periprotética.

| Classificação | Característica |
|---------------|---|
| TIPO I | -Membrana periprotética com reação gigantohistiocitária a partículas de material sintético. -Ausência de critérios histológicos indicativos de infecção |
| TIPO II | - Membrana periprotética do tipo infecciosa - Análise histológica de tecido periprotético mostrando número ≥ 23 neutrófilos em 10 campos de grande aumento (400x) |
| TIPO III | - Membrana periprotética do tipo infecciosa com reação gigantohistiocitária a partículas de material sintético. - Análise histológica de tecido periprotético mostrando número ≥ 23 neutrófilos em 10 campos de grande aumento (400x) |
| TIPO IV | -Membrana periprotética do tipo fibrosa -Ausência de partículas de material sintético e de critérios histológicos indicativos de infecção |

4.7 Análise no líquido sinovial

4.7.1 Citometria global e específica do líquido sinovial

Após a coleta do líquido sinovial durante a cirurgia de revisão, 1 a 2 mL da amostra coletada foi armazenada em tubo de coleta de sangue a vácuo, contendo (EDTA) e enviada imediatamente para o laboratório de análises clínicas do INTO para a realização da contagem de células brancas e identificação do percentual de polimorfonucleares no líquido sinovial. A citometria global e específica do LS foi realizada por método automatizado em aparelho Cell Dyn 3700 SL (Abbott).

4.7.2 Quantificação de DNA livre

Os níveis de DNA livre no líquido sinovial foram avaliados utilizando o reagente Quant-it Picogreen dsDNA (Thermo Fisher Scientific, EUA) que intercala

em DNA dupla fita. Para isso, o líquido sinovial foi descongelado, centrifugado por 10 minutos a 16.000 g e diluído cinquenta vezes em tampão Tris-EDTA. Cinquenta μL desta solução foram misturados a 50 μL do reagente Picogreen e adicionados nos poços de placa de 96 poços opaca da cor preta. A fluorescência foi medida utilizando o luminômetro GloMax Paradigm (Molecular Devices, EUA), com excitação em 485nm e emissão em 535nm. A quantidade de DNA foi determinada após correção do fator de diluição e comparação com os valores obtidos na curva padrão realizada com concentrações conhecidas de DNA Lambda controle, de acordo com as recomendações do fabricante.

4.7.3 Quantificação de mieloperoxidase e histona H3 citrulinada

Para avaliação dos marcadores de NETose no LS, foram utilizados kits de ELISA específicos para a dosagem de Histona H3 citrulinada (Cayman Chemical, EUA) e quantificação de Mieloperoxidase (Thermo Fischer Scientific, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Em ambos os casos foi realizada uma análise prévia para identificação da diluição ideal das amostras de líquido sinovial. Para ambas as análises as amostras do grupo IAP foram diluídas 50 vezes utilizando tampão de ensaio fornecido pelo kit.

4.8 Análise dos resultados

O tamanho da amostra foi determinado com base em uma análise de poder usando a média e o desvio padrão dos resultados relacionados a quantificação de DNA livre, de forma a obter um poder de 0,8 e um alfa de 0,05. Para a análise foram utilizados valores médios de DNA livre de 105 e desvio padrão de 58 no

grupo de IAP crônica e uma média de 1,9 no grupo asséptico. As análises foram realizadas usando o software ClinCalc (<https://clincalc.com/stats/samplesize.aspx>), sendo identificada a necessidade de uma amostra de 10 participantes (5 participantes por grupo).

Além do cálculo amostral, ao final do estudo foi realizada uma análise pós hoc para cada um dos novos biomarcadores avaliados, considerando as médias e desvios padrões obtidos e o número de participantes do estudo, considerando erro alfa de 0,05, sendo obtido poder de 100% tanto para a mieloperoxidase quanto para a histona H3 citrulinada.

Para análise descritiva dos dados relativos às características clínicas e demográficas dos pacientes foram calculadas médias, medianas, desvio padrão, intervalo interquartil (IIQ) e proporções. As variáveis categóricas foram expressas através de suas frequências e porcentagens. Os valores de sensibilidade (verdadeiros positivos (VP) / [VP + falso negativos (FN)]) e especificidade (verdadeiros negativos (VN) / [falsos positivos (FP) + VN]), assim como a área sob a curva (AUC, do inglês "*area under the curve*") ROC (do inglês "*receiver operator characteristic*"), foram calculados considerando-se como padrão ouro a adaptação dos critérios definidores de infecção propostos no ICM de 2018 (Parvizi et al., 2018). A acurácia dos métodos diagnósticos propostos foi calculada pelo somatório dos VP e dos VN, dividido pelo número de testes feitos. Variáveis contínuas foram analisadas pelo teste T-student ou Mann-Whitney, quando indicado. O valor de p foi considerado significativo quando menor que 0,05. Todas as análises foram realizadas utilizando os softwares Med Calc versão 21 e GraphPad Prism versão 7.0.

5 RESULTADOS

5.1 População de estudo

Foram incluídos no estudo 32 pacientes. A partir da avaliação dos dados clínicos e exames laboratoriais, os pacientes foram avaliados quanto ao diagnóstico de IAP de acordo com os critérios propostos pelo ICM de 2018 (Parvizi et al., 2018). Após esta avaliação, 16 pacientes foram incluídos no grupo infecção e 16 pacientes, por não preencherem os critérios diagnósticos de IAP, compuseram o grupo não infecção, ou falha asséptica. As características demográficas de ambos os grupos estão resumidas na **Tabela 1**. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação à idade ($p= 0,18$), sexo ($p>0,99$) e IMC ($p=0,39$).

Tabela 1. Características da população de estudo.

| | Não infecção (n=16) | Infecção (n=16) | P |
|--|------------------------|--------------------|-------------------|
| Sexo | | | |
| Masculino | 6 | 9 | >0,999 |
| Feminino | 10 | 7 | ^a |
| Idade (anos), mediana [IIQ] | 70 [68 – 80] | 67 [60 – 78] | 0,18 ^b |
| IMC (kg/m²), mediana [IIQ] | 31,8 [27 – 37,4] | 29,1 [23,9 – 32,5] | 0,39 ^b |
| Articulação | | | |
| Quadril | 2 | 3 | |
| Joelho | 14 | 13 | |

Dados apresentados com mediana com amplitude interquartilica, ou soma com a respectiva percentagem. ^a Teste de Fischer. ^b Teste de Mann Whitney. IMC: índice de massa corporal

Dos pacientes do grupo infecção, quatro apresentaram fístula ativa. Quinze pacientes apresentaram crescimento de microrganismos na cultura microbiológica de duas ou mais amostras. Seis destes pacientes apresentavam

infecções polimicrobianas e em apenas um paciente não foi observado o crescimento de patógeno na cultura microbiológica. O patógeno mais frequentemente identificado foi o *Staphylococcus aureus*. Dentre as bactérias classificadas como *Staphylococcus* coagulase negativa, foram identificadas: *Staphylococcus hominis* (1), *Staphylococcus epidermidis* (1), *Staphylococcus capitis* (1) e *Staphylococcus saprophyticus* (1). Dentre as bactérias gram-negativas, foram identificadas: *Pseudomonas aeruginosas* (4), *Klebsiella pneumoniae* (3) e *Morganella morganii* (1). Na **tabela 2** estão descritas as bactérias identificadas nas culturas microbiológicas dos pacientes com IAP e a frequência com que foram identificadas.

Tabela 2. Perfil microbiológico dos pacientes do grupo infecção.

| Patógeno | Frequência N (%) |
|--|---------------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 7 (44%) |
| <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa | 4 (25%) |
| <i>Enterococcus</i> spp | 2 (13%) |
| Gram negativas | 8 (50%) |
| Polimicrobiana ^a | 6 (37%) |
| Cultura negativa | 2 (13%) |

^a ≥ 2 dois patógenos diferentes. O número total / porcentagem de pacientes com cultura positiva é >20/100% devido aos 6 pacientes com infecções polimicrobianas.

5.2 Exames laboratoriais

Em relação a quantificação de PCR no plasma, a média do grupo infecção foi significativamente maior que a observada no grupo não infectado ($0,78 \pm 1,0$

vs $7,4 \pm 7,4$, $p < 0,0001$). A média da VHS do grupo infecção também foi significativamente maior que a observada no grupo de pacientes não infectados ($41,1 \pm 24,4$ vs $80,1 \pm 28,9$, $p = 0,0008$). Os níveis de D-dímero não foram significativamente diferentes entre os dois grupos avaliados ($2,0 \pm 2,3$ vs $3,1 \pm 2,3$, $p=0,14$).

Na avaliação do líquido sinovial, em relação a citometria global e específica, não foram encontradas diferenças significativas na contagem total de leucócitos nos pacientes do grupo infecção em relação ao grupo não infectado (1245 ± 1295 vs 27990 ± 32614 , $p=0,06$). Quanto à avaliação do percentual de polimorfonucleares no líquido sinovial, foram identificados níveis significativamente maiores nos pacientes com infecção em relação aos pacientes sem infecção ($20,3 \pm 12,9$ vs $66,3 \pm 25,1$, $p < 0,0001$). Os resultados dos testes laboratoriais realizados tanto no sangue quanto no líquido sinovial estão sumarizados na **Tabela 3**.

Tabela 3. Avaliação dos níveis de marcadores sorológicos e do líquido sinovial

| | Não infecção (n=16) | Infecção (n=16) | P |
|--------------------------|--------------------------------|----------------------------|-----------|
| PCR (Sérico) | $0,78 \pm 1,0$ | $7,4 \pm 7,4$ | $<0,0001$ |
| D-dímero (Sérico) | $2,0 \pm 2,3$ | $3,1 \pm 2,3$ | $0,14$ |
| VHS (Sérico) | $41,1 \pm 24,4$ | $80,1 \pm 28,9$ | $0,0008$ |
| Leucócitos (LS) | 1245 ± 1295 | 27990 ± 32614 | $0,06$ |
| % PMN (LS) | $20,3 \pm 12,9$ | $66,3 \pm 25,1$ | $<0,0001$ |

Teste de Mann Whitney.

5.3 Investigação da liberação de redes extracelulares de neutrófilos no líquido sinovial

Uma vez que estudos prévios evidenciaram o aumento de DNA livre no LS de pacientes com IAP (Cobra et al., 2022), buscamos identificar se na amostra do presente estudo este marcador também se encontrava elevado. Após as análises, foi observado que o líquido sinovial dos pacientes do grupo infecção apresentaram níveis significativamente maiores deste biomarcador ($105,5 \pm 58,3$) em relação aos pacientes com falha asséptica ($1,9 \pm 1,2$, $p > 0,0001$) (Figura 9).

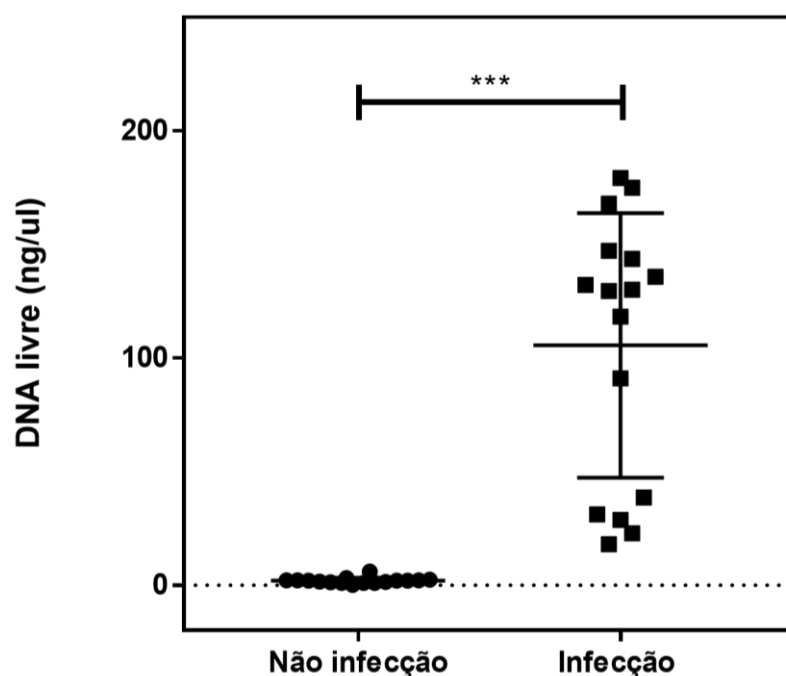


Figura 9. Quantificação de DNA livre. Os níveis de DNA livre foram determinados utilizando a sonda Picogreen. Cada símbolo representa o valor obtido para determinado paciente. A linha horizontal central representa a média obtida para cada grupo e as linhas das extremidades representam o desvio padrão. **** $p < 0,0001$. Teste de Mann Whitney.

A seguir, foram analisados os níveis da enzima MPO. Novamente, os níveis desta proteína estavam significativamente aumentados no LS dos pacientes do grupo infecção (1575 ± 826) em relação aos pacientes do grupo asséptico ($50,16 \pm 100$, $p < 0,0001$). Cabe ressaltar que nove pacientes do grupo asséptico apresentaram níveis de MPO no líquido sinovial abaixo do limiar de detecção do Kit de ELISA. Nesses casos, o valor reportado foi 0 pg/ml (**Figura 10**).

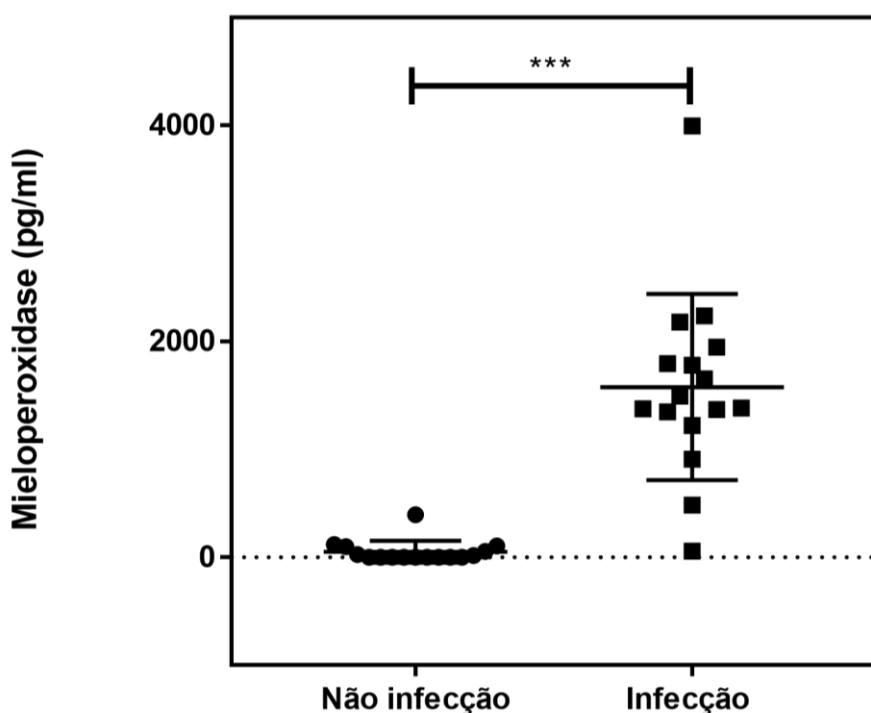


Figura 10. Quantificação da enzima mieloperoxidase. Os níveis da enzima mieloperoxidase no líquido sinovial foram determinados através de ensaio de ELISA. Cada símbolo representa os valores obtidos para determinado paciente. A linha horizontal central representa a média obtida para cada grupo e as linhas das extremidades representam o desvio padrão. **** $p < 0,0001$. Teste de Mann Whitney.

Por fim, foram avaliados os níveis de histona H3 citrulinada no LS. Os níveis deste marcador estavam significativamente aumentados nos pacientes com IAP ($13,88 \pm 24,4$ vs 1.688 ± 1.214 , $p < 0,0001$). Em sete pacientes do grupo

não infecção os níveis desta molécula se encontravam abaixo do limiar de detecção do kit de ELISA. Nesses casos, o valor reportado foi 0 ng/ml (**Figura 11**).

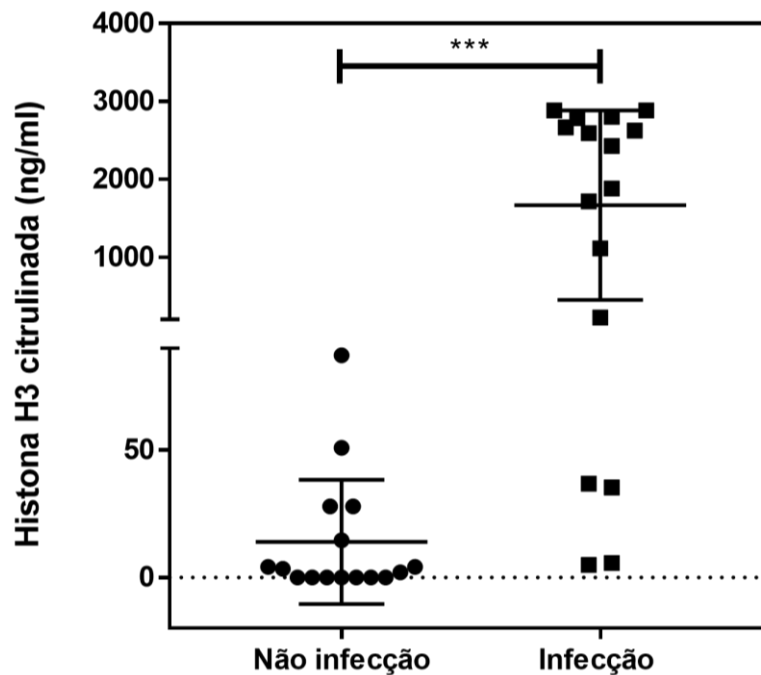


Figura 11. Quantificação da Histona H3 Citrulinada. Os níveis de Histona H3 citrulinada no líquido sinovial foram determinados através de ensaio de ELISA. Cada símbolo representa os valores obtidos para determinado paciente. A linha horizontal central representa a média obtida para cada grupo e as linhas das extremidades representam o desvio padrão. **** $p < 0,0001$. Teste de Mann Whitney.

Uma vez que todos os biomarcadores avaliados foram encontrados aumentados no LS, buscamos avaliar a correlação entre os níveis de DNA livre e mieloperoxidase; e DNA livre e histona H3 citrulinada; uma vez que a correlação positiva entre estes marcadores também é um indicativo da liberação de NETs. Foi encontrada uma forte correlação entre o DNA livre e mieloperoxidase ($r=0,73$, $p<0,0001$) assim como entre o DNA livre e a histona H3 citrulinada ($r=0,87$, $p<0,0001$) (**Figura 12**).

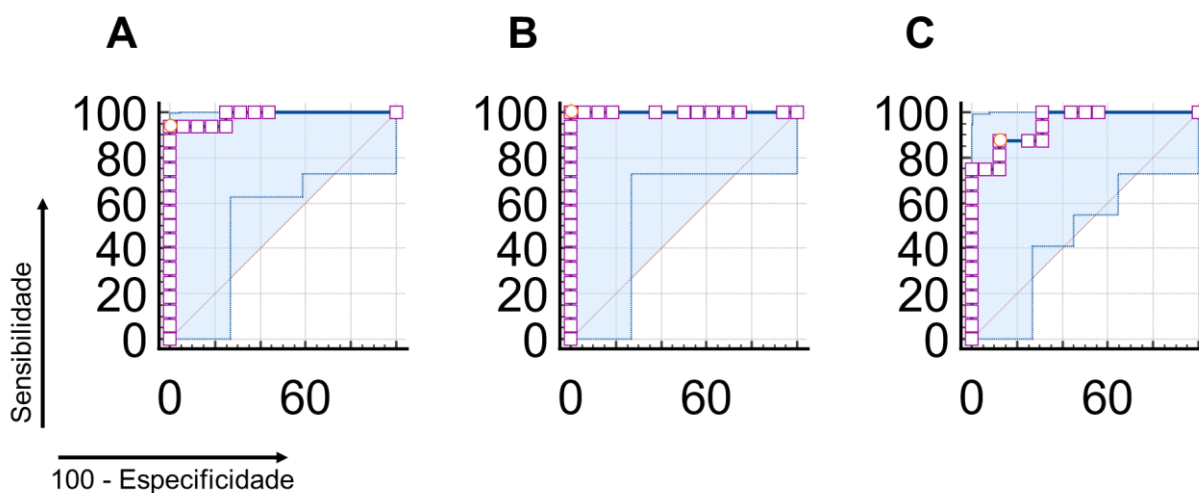


Figura 13. Curvas ROC dos biomarcadores relacionados ao processo de NETose no diagnóstico da IAP. A área sob a curva ROC foi determinada para os seguintes metabólitos: (A) DNA livre (B) mieloperoxidase e (C) histona H3 citrulinada.

Para o DNA livre, a área sob a curva ROC calculada foi de 1 [0,89 – 1], com ponto de corte maior que 5,9 e índice de Youden de 1. Para a mieloperoxidase, a área sob a curva ROC foi de 0,984 [0,86 – 1] com ponto de corte de 393,6 e índice de Youden de 0,93. Já para a histona H3 citrulinada, a área sob a curva ROC foi 0,94 [0,8 – 0,99], com ponto de corte de 27,9 e índice de Youden de 0,75.

Na **Tabela 4**, estão discriminadas a sensibilidade e especificidade para cada marcador relacionado ao processo de NETose, assim como para os exames laboratoriais preconizados pelo critério do ICM de 2018. Nesta análise é possível observar que os marcadores relacionados ao processo de NETose apresentam elevada sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da IAP tanto em relação aos testes sanguíneos quanto em relação àqueles do líquido sinovial.

Tabela 4. Performance diagnóstica dos biomarcadores relacionados a IAP e NETose

| Parâmetro | Sensibilidade | Especificidade | Acurácia | VPP | VPN |
|-------------------------------|----------------------|-----------------------|---------------------|----------------------|---------------------|
| PCR | 93,3% [68 – 99,8] | 80% [51,9 – 95,6] | 83,3% [65,2 – 94,3] | 60,8% [35,9 – 81,1] | 97,2% [84,1 – 99,6] |
| VHS | 93,3 % [68 – 99,8] | 40% [16,3 – 67,7] | 53,3% [34,3 – 71,6] | 34, 1% [25,1 – 44,4] | 94,7% [71 – 99,2] |
| Leucócitos LS | 60% [26,2 – 87,7] | 81,2% [54,3 – 95,9] | 75,9% [55,2 – 90,3] | 51,6% [25,4 – 76,9] | 85,9% [73,3 – 93] |
| %PMN LS | 33,3% [7,4 – 70] | 100% [79,4 – 100] | 8,3% [63,1 – 95] | 100% | 81,8% [73,9 – 87,7] |
| DNA livre | 100% [79,4 – 100] | 100% [79,4 – 100] | 100 % [89,1 – 100] | 100% | 100% |
| Mieloperoxidase | 93,7% [69,7 – 99,8] | 100% [79,4 – 100] | 98,4% [86,3 – 99,9] | 100% | 97,9% [87,7 – 99,6] |
| Histona H3 citrulinada | 87,5% [61,6 – 98,4] | 87,5% [61,6 – 98,4] | 87,5% [71 – 96,4] | 70% [38,6 – 89,6] | 95,4% [85 – 98,7] |

6 DISCUSSÃO

A infecção articular periprotética representa um importante problema de saúde pública que deve ser agravado devido às projeções de aumento no número de artroplastias de quadril e joelho prevista para os próximos anos (Zardi and Franceschi, 2020). Apesar disso, a fisiopatologia desta complicação, especialmente os processos celulares e moleculares que ocorrem no microambiente articular infectado, ainda não são completamente estabelecidos. Este estudo é o primeiro a demonstrar o aumento concomitante de marcadores relacionados ao processo de liberação de NETs no líquido sinovial de pacientes com IAP, sugerindo a ocorrência deste processo no microambiente da articulação periprotética infectada. Nossos resultados evidenciam que o aumento de DNA livre no LS destes pacientes é, pelo menos em parte, resultado do processo de liberação de NETs pelos neutrófilos, uma vez que tanto a mieloperoxidase, um marcador relacionado ao processo de NETose, quanto a histona H3 citrulinada, um marcador específico deste processo, encontram-se significativamente aumentados no líquido sinovial de pacientes com IAP (**Figura 14**).

Os testes diagnósticos atualmente disponíveis para o diagnóstico da IAP avaliam dois aspectos principais da infecção: a presença de bactérias e a resposta imunológica deflagrada para combater o patógeno. Em relação aos aspectos da resposta imunológica, uma das principais características da IAP é o aumento local de neutrófilos. A importância destas células é evidenciada uma vez que a maioria dos testes diagnósticos se baseia na sua quantificação (contagem de PMN no líquido sinovial, avaliação histopatológica da membrana periprotética) ou na mensuração de moléculas produzidas por estas células (alfa defensina e esterase leucocitária) (Deirmengian et al., 2010; Guan et al., 2019).

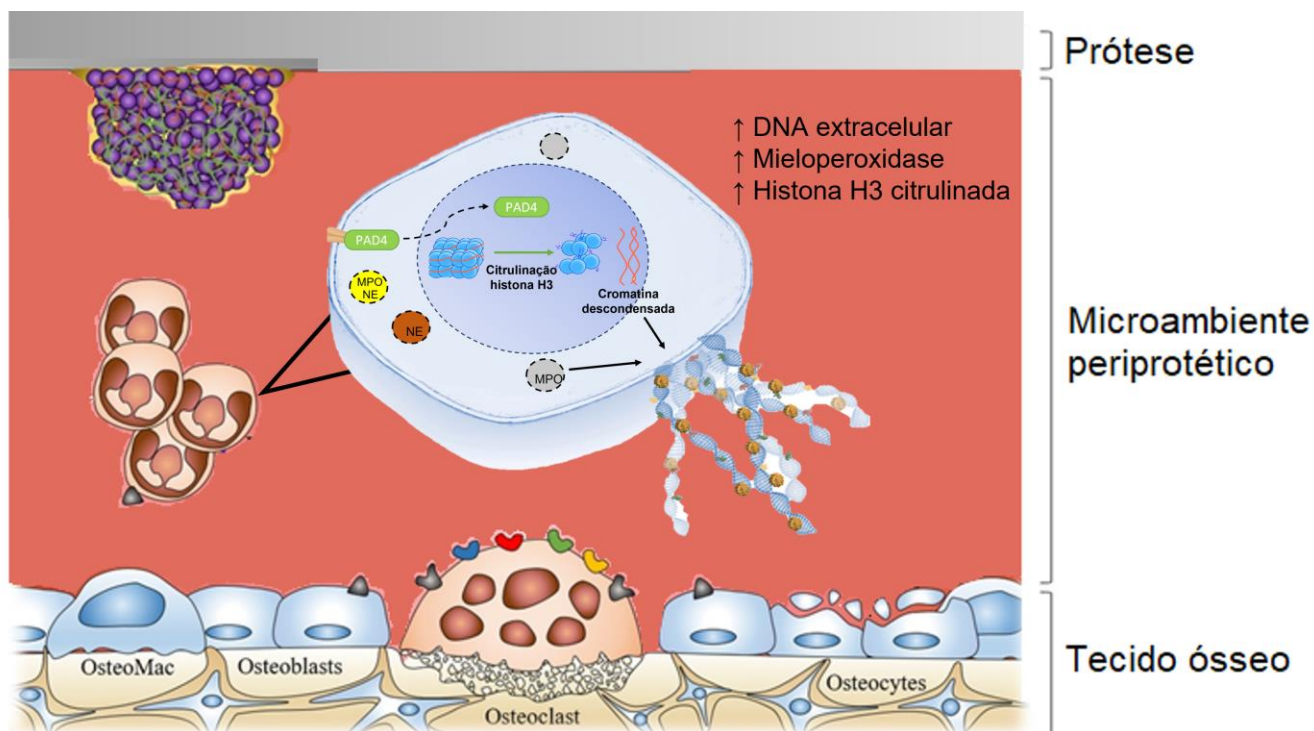


Figura 14. Microambiente da articulação periprotética infectada. Mecanismo proposto de liberação de NETs no líquido sinovial de pacientes com infecção articular periprotética.

Apesar de sua importância, os mecanismos e processos de ativação e função dos neutrófilos no microambiente da IAP ainda não foram completamente elucidados. Dessa forma, apesar da existência de inúmeros biomarcadores no líquido sinovial, pouco se sabe sobre os processos biológicos relacionados a sua modulação no contexto específico da IAP, sendo o conhecimento existente baseado, principalmente, em conceitos mais gerais e abrangentes sobre o funcionamento do sistema imune. Este cenário pode ser exemplificado pelo fato de que, apesar da determinação do percentual de neutrófilos ser amplamente utilizado no diagnóstico da IAP, apenas recentemente foi realizado um estudo que analisou, de forma específica e aprofundada, a composição celular do líquido sinovial de pacientes com esta condição (Korn et al., 2020).

Recentemente, Cobra e colaboradores demonstraram o aumento de DNA livre no LS de pacientes com IAP após artroplastia de joelho (Cobra et al., 2022). De forma similar, Logters e colaboradores, em 2009, também demonstraram o aumento desta molécula no líquido sinovial de pacientes com artrite séptica (Logters et al., 2009). Ambos os artigos apontaram o processo de NETose como provável fonte do DNA livre, contudo, não aprofundaram suas análises de forma a confirmar ou refutar esta hipótese. Diversos estudos *in vitro* vem demonstrando que, em condições infecciosas, as bactérias são uma importante fonte de DNA extracelular, este, um componente estrutural e estabilizador dos biofilmes (Panlilio and Rice, 2021). Por outro lado, estudos sobre a resposta imune evidenciaram que a presença de bactérias e de biofilmes bacterianos estimulam a liberação de NETs pelos neutrófilos, assim como, deflagram a resposta imune inata para conter a infecção, levando à ativação de diferentes mecanismos de morte celular. Todos estes processos estão associados, direta ou indiretamente, à liberação de DNA livre (Fernandez-Carballo et al., 2019; Huttunen et al., 2011).

Ikeda e colaboradores avaliaram a presença da enzima mieloperoxidase, um marcador relacionado ao processo de NETose, no LS de pacientes com IAP crônica (Ikeda et al., 2020). Os níveis deste marcador encontravam-se aumentados cerca de 200 vezes nos pacientes com IAP em relação ao grupo controle. A área sob a curva ROC calculada foi de 0,99, com sensibilidade e especificidade de 100% e 94,4%, respectivamente, para o ponto de corte de 16.463 ng/mL. Novamente os autores atribuem o aumento de DNA livre ao processo de NETose, contudo não há evidências robustas para tal afirmação.

Importante ressaltar que, embora o DNA livre e a mieloperoxidase sejam apontados como marcadores de NETose, eles não necessariamente indicam a

ocorrência deste processo, uma vez que, como já mencionado, eventos não relacionados à NETose, como lesão tecidual, apoptose e necrose, podem gerar DNA livre; e a mieloperoxidase pode ser liberada por neutrófilos ativados de maneira independente da formação das NETs. Por outro lado, a presença de histona H3 citrulinada é apontada como um marcador específico do processo de NETose, visto que, durante o processo de ativação dos neutrófilos para formação e liberação das NETs, a enzima PAD 4 é ativada e translocada para o núcleo onde atua promovendo a citrulinação da histona H3, gerando histona H3 citrulinada. A citrulinação da histona H3 é considerada específica de neutrófilos e independente de outros mecanismos de morte celular, como apoptose e necrose (Grilz et al., 2019; Thalin et al., 2017).

Em nosso estudo, os níveis de histona H3 citrulinada apresentaram correlação positiva com os níveis de DNA livre e mieloperoxidase. Entretanto, quatro pacientes do grupo infecção não apresentaram níveis aumentados deste biomarcador. Dois destes pacientes apresentaram infecções causadas por bactérias *Staphylococcus coagulase negativa* (*S. epidermidis* e *S. hominis*), apresentando também níveis mais baixos de DNA livre. Um paciente apresentava fístula ativa e a concentração de mieloperoxidase também se mostrou reduzida, ainda que os níveis de DNA livre estivessem bastante aumentados. O último paciente apresentava infecção com cultura negativa e, também, apresentou níveis mais baixos de DNA livre, porém com níveis elevados de mieloperoxidase. A avaliação deste resultado possibilita algumas reflexões que devem ser abordadas em estudos futuro. A primeira é que não se pode afirmar que não há liberação de NETs no LS destes pacientes, uma vez que já foram descritas vias de liberação de NETs que independem da citrulinação das histonas pela enzima PAD4, e não se pode excluir que tal processo esteja ocorrendo nestes pacientes, uma vez que eles apresentam aumento de DNA livre, ainda que não tão

exacerbado (Silva et al., 2020). Novos estudos são necessários para identificar as vias envolvidas no processo de liberação de NETs no LS de pacientes com IAP. Além disso, estudos tem demonstrado que infecções causadas por *Staphylococcus* coagulase negativa apresentam menor quantidade de leucócitos no líquido sinovial, além de não serem capazes de deflagrar uma resposta neutrofílica robusta (Tande and Patel, 2014; Trampuz et al., 2004), o que pode impactar diretamente na liberação de NETs. Novos estudos são necessários para avaliar o processo de NETose especificamente nas infecções causadas por estes microrganismos.

Nos últimos anos, marcadores relacionados ao processo de NETose vem sendo amplamente pesquisados para o diagnóstico de doenças crônicas e infecciosas, como sepse, tuberculose e neoplasias, bem como para prever o prognóstico de tais doenças, como a COVID-19 (Eilenberg et al., 2021; Ng et al., 2021; Pan et al., 2021; Thalín et al., 2018). Nossos resultados além de apontarem, de forma inédita, a ocorrência desse processo no LS, evidenciam os biomarcadores relacionados a ele como potenciais marcadores para o diagnóstico da IAP.

Como mencionado, a avaliação de aspectos relacionados a resposta imune desencadeada no microambiente articular de pacientes com IAP é a base das análises do LS. A avaliação da contagem de leucócitos, percentual de polimorfonucleares, esterase leucocitária e alfa-defensina já foram previamente avaliados e incluídos como critérios menores para o diagnóstico da IAP (McNally et al., 2021; Parvizi et al., 2018). Estes marcadores, ainda que sejam úteis, apresentam algumas limitações. Contagem de leucócitos no líquido sinovial e porcentagem de polimorfonucleares apresentam grande variabilidade através de diferentes instituições e um limiar definitivo para o diagnóstico de IAP crônica ainda não foi estabelecido, bem como a contaminação com agentes externos como sangue podem dificultar sua análise

(Higuera et al., 2017). Outro empecilho é a quantidade de LS necessária para a análise, de 1mL a 3mL. Numa articulação profunda e pequena como o quadril, esses dois últimos fatores, contaminação com sangue e quantidade reduzida de LS, podem limitar a realização desse exame. Um estudo recente avaliou o valor diagnóstico desses dois biomarcadores na IAP crônica após ATJ e mostrou que para um ponto de corte de 1630 leucócitos/ μ L, a contagem de leucócitos apresentou 83,6% de sensibilidade e 82,2% de especificidade, e o percentual de células polimorfonucleares atingiram uma sensibilidade de 80,6% e 83,3%, para um *cutoff* ótimo de 66,1% (Zahar et al., 2018). O teste rápido de alfa defensina apresenta resultados controversos quanto à sua eficácia, com evidências recentes mostrando que o teste de fluxo lateral apresenta menor sensibilidade que o imunoensaio, alcançando 80% de sensibilidade e 89% de especificidade, sendo o custo de aquisição e a contaminação com sangue um problema para sua análise (Ahmad et al., 2018; Eriksson et al., 2018). O teste rápido de esterase leucocitária apresenta sensibilidade de 84%, juntamente com uma especificidade de 100%, e a contaminação do LS com sangue também dificulta sua análise (Koh et al., 2017b).

Outro aspecto relevante na avaliação dos marcadores relacionados ao processo de NETose é a necessidade de pequena quantidade de amostra biológica para realização dos testes, uma vez que estes biomarcadores se encontram aberrantemente aumentados no líquido sinovial. Para o presente estudo, foi necessária a diluição de pelo menos cinquenta vezes das amostras dos pacientes do grupo IAP para que a quantificação dos biomarcadores fosse possível, sem extrapolar o limite máximo da curva padrão. Este aspecto é importante uma vez que o líquido sinovial obtido é utilizado para diversas análises que necessitam de uma quantidade considerável de material, como a citometria global e específica, cultura microbiológica,

avaliação da esterase leucocitária e alfa-defensina. Dessa forma, a quantidade de LS necessária para as avaliações pode representar uma limitação à realização de todos estes ensaios, particularmente nas revisões da ATQ que, segundo nossa experiência, resulta na obtenção de menor volume de LS e com maior risco de contaminação com sangue devido a profundidade da articulação do que a obtida nos pacientes submetidos a cirurgia de revisão da ATJ.

Em nossa análise, os marcadores relacionados ao processo de NETose apresentaram maior sensibilidade, especificidade e acurácia em relação aos marcadores dos critérios de ICM de 2018 (Parvizi et al., 2018). Chama atenção o fato destes marcadores apresentarem maior especificidade em relação a todos os outros biomarcadores avaliados, sugerindo que eles são modulados como resultado de processos diretamente relacionados a IAP. Diante do exposto, acreditamos que os biomarcadores da NETose poderão fornecer maior precisão ao diagnóstico da IAP e novos estudos podem ajudar a determinar se esses eles podem ser incorporados aos critérios de diagnóstico da IAP.

O presente estudo apresenta algumas limitações. O número relativamente pequeno de participantes e a desproporção entre pacientes com IAP de quadril e joelho não permitiu a realização de análises de subgrupos. Além disso, não foi possível a comparação da performance diagnóstica dos novos biomarcadores com a alfa-defensina, uma vez que este exame, além de apresentar alto custo, não é realizado de forma rotineira em nossa instituição. Além disso, apesar de identificação da histona H3 citrulinada, de forma inédita, como um potencial biomarcador da IAP, novos estudos, com maior número de participantes, são necessários para corroborar este achado.

Por fim, nossos resultados evidenciam a ocorrência do processo de NETose no LS de pacientes com IAP, além de apresentar a histona citrulinada como um novo potencial biomarcador que pode ajudar no diagnóstico da IAP crônica de quadril e joelho.

8 CONCLUSÃO

Nossos resultados evidenciam o aumento na concentração de DNA livre, mieloperoxidase e histona H3 citrulinada, biomarcadores relacionados ao processo de NETose no líquido sinovial de pacientes com IAP, sugerindo a ocorrência deste processo no microambiente articular periprotético infectado.

As três biomoléculas avaliadas apresentaram elevada sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da IAP, sugerindo que possam ser utilizadas como potenciais biomarcadores para diagnóstico desta complicação.

Ahmad, S. S., Hirschmann, M. T., Becker, R., Shaker, A., Ateschrang, A., Keel, M. J. B., Albers, C. E., Buetikofer, L., Maqungo, S., Stockle, U. and Kohl, S. (2018). A meta-analysis of synovial biomarkers in periprosthetic joint infection: Synovasure is less effective than the ELISA-based alpha-defensin test. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 26(10), 3039-3047. doi:10.1007/s00167-018-4904-8

Amulic, B., Knackstedt, S. L., Abu Abed, U., Deigendesch, N., Harbort, C. J., Caffrey, B. E., Brinkmann, V., Heppner, F. L., Hinds, P. W. and Zychlinsky, A. (2017). Cell-Cycle Proteins Control Production of Neutrophil Extracellular Traps. *Dev Cell*, 43(4), 449-462 e445. doi:10.1016/j.devcel.2017.10.013

Andrews, R. K., Arthur, J. F. and Gardiner, E. E. (2014). Neutrophil extracellular traps (NETs) and the role of platelets in infection. *Thromb Haemost*, 112(4), 659-665. doi:10.1160/TH14-05-0455

Anthony, C. A., Wasko, M. K., Pashos, G. E., Barrack, R. L., Nunley, R. M. and Clohisy, J. C. (2021). Total Hip Arthroplasty in Patients With Osteoarthritis Associated With Legg-Calve-Perthes Disease: Perioperative Complications and Patient-Reported Outcomes. *J Arthroplasty*, 36(7), 2518-2522. doi:10.1016/j.arth.2021.02.031

Antony, S. and Farran, Y. (2016). Prosthetic Joint and Orthopedic Device Related Infections. The Role of Biofilm in the Pathogenesis and Treatment. *Infect Disord Drug Targets*, 16(1), 22-27. doi:10.2174/1871526516666160407113646

Aweid, O., Haider, Z., Saed, A. and Kalairajah, Y. (2018). Treatment modalities for hip and knee osteoarthritis: A systematic review of safety. *J Orthop Surg (Hong Kong)*, 26(3), 2309499018808669. doi:10.1177/2309499018808669

Badarudeen, S., Shu, A. C., Ong, K. L., Baykal, D., Lau, E. and Malkani, A. L. (2017). Complications After Revision Total Hip Arthroplasty in the Medicare Population. *J Arthroplasty*, 32(6), 1954-1958. doi:10.1016/j.arth.2017.01.037

Bannuru, R. R., Osani, M. C., Vaysbrot, E. E., Arden, N. K., Bennell, K., Bierma-Zeinstra, S. M. A., Kraus, V. B., Lohmander, L. S., Abbott, J. H., Bhandari, M., Blanco, F. J., Espinosa, R., Haugen, I. K., Lin, J., Mandl, L. A., Moilanen, E., Nakamura, N., Snyder-Mackler, L., Trojian, T., Underwood, M. and McAlindon, T. E. (2019). OARSI guidelines for the non-surgical management of knee, hip, and polyarticular osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 27(11), 1578-1589. doi:10.1016/j.joca.2019.06.011

Bauer, T. W., Parvizi, J., Kobayashi, N. and Krebs, V. (2006). Diagnosis of periprosthetic infection. *J Bone Joint Surg Am*, 88(4), 869-882. doi:10.2106/JBJS.E.01149

Bhattacharya, M., Berends, E. T. M., Chan, R., Schwab, E., Roy, S., Sen, C. K., Torres, V. J. and Wozniak, D. J. (2018). Staphylococcus aureus biofilms release leukocidins to elicit extracellular trap formation and evade neutrophil-mediated killing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115(28), 7416-7421. doi:10.1073/pnas.1721949115

Bittersohl, B., Zilkens, C., Kim, Y. J., Werlen, S., Siebenrock, K. A., Mamisch, T. C. and Hosalkar, H. S. (2011). Delayed gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging of hip joint cartilage: pearls and pitfalls. *Orthop Rev (Pavia)*, 3(2), e11. doi:10.4081/or.2011.e11

Bozic, K. J., Kurtz, S. M., Lau, E., Ong, K., Chiu, V., Vail, T. P., Rubash, H. E. and Berry, D. J. (2010). The epidemiology of revision total knee arthroplasty in the United States. *Clin Orthop Relat Res*, 468(1), 45-51. doi:10.1007/s11999-009-0945-0

Bozic, K. J., Kurtz, S. M., Lau, E., Ong, K., Vail, T. P. and Berry, D. J. (2009). The epidemiology of revision total hip arthroplasty in the United States. *J Bone Joint Surg Am*, 91(1), 128-133. doi:10.2106/JBJS.H.00155

Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Weinrauch, Y. and Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 303(5663), 1532-1535. doi:10.1126/science.1092385

Brinkmann, V. and Zychlinsky, A. (2012). Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol*, 198(5), 773-783. doi:10.1083/jcb.201203170

Brophy, R. H. and Fillingham, Y. A. (2022). AAOS Clinical Practice Guideline Summary: Management of Osteoarthritis of the Knee (Nonarthroplasty), Third Edition. *J Am Acad Orthop Surg*, 30(9), e721-e729. doi:10.5435/JAAOS-D-21-01233

Bruyere, O. and Reginster, J. Y. (2007). Glucosamine and chondroitin sulfate as therapeutic agents for knee and hip osteoarthritis. *Drugs Aging*, 24(7), 573-580. doi:10.2165/00002512-200724070-00005

Carmona-Rivera, C. and Kaplan, M. J. (2016). Induction and Quantification of NETosis. *Curr Protoc Immunol*, 115, 14 41 11-14 41 14. doi:10.1002/cpim.16

Castanheira, F. V. S. and Kubes, P. (2019). Neutrophils and NETs in modulating acute and chronic inflammation. *Blood*, 133(20), 2178-2185. doi:10.1182/blood-2018-11-844530

Chao, Y. S. and Loshak, H. (2019). In *Intra-Articular Hyaluronic Acid for Osteoarthritis of the Hip or Ankle: A Review of Clinical Effectiveness*. Ottawa (ON).

Chen, Z., Zhang, H., Qu, M., Nan, K., Cao, H., Cata, J. P., Chen, W. and Miao, C. (2021). Review: The Emerging Role of Neutrophil Extracellular Traps in Sepsis and Sepsis-Associated Thrombosis. *Front Cell Infect Microbiol*, 11, 653228. doi:10.3389/fcimb.2021.653228

Clegg, D. O., Reda, D. J., Harris, C. L., Klein, M. A., O'Dell, J. R., Hooper, M. M., Bradley, J. D., Bingham, C. O., 3rd, Weisman, M. H., Jackson, C. G., Lane, N. E., Cush, J. J., Moreland, L. W., Schumacher, H. R., Jr., Oddis, C. V., Wolfe, F., Molitor, J. A., Yocum, D. E., Schnitzer, T. J., Furst, D. E., Sawitzke, A. D., Shi, H., Brandt, K. D., Moskowitz, R. W. and Williams, H. J. (2006). Glucosamine, chondroitin sulfate, and the two in combination for painful knee osteoarthritis. *N Engl J Med*, 354(8), 795-808. doi:10.1056/NEJMoa052771

Cobra, H., Mozella, A. P., da Palma, I. M., Salim, R. and Leal, A. C. (2022). Cell-free Deoxyribonucleic Acid: A Potential Biomarker of Chronic Periprosthetic Knee Joint Infection. *J Arthroplasty*, 37(12), 2455-2459. doi:10.1016/j.arth.2022.07.002

Colvin, O. C., Kransdorf, M. J., Roberts, C. C., Chivers, F. S., Lorans, R., Beauchamp, C. P. and Schwartz, A. J. (2015). Leukocyte esterase analysis in the

diagnosis of joint infection: can we make a diagnosis using a simple urine dipstick? *Skeletal Radiol*, 44(5), 673-677. doi:10.1007/s00256-015-2097-5

Costerton, J. W., Stewart, P. S. and Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418), 1318-1322. doi:10.1126/science.284.5418.1318

Cram, P., Lu, X., Kates, S. L., Singh, J. A., Li, Y. and Wolf, B. R. (2012). Total knee arthroplasty volume, utilization, and outcomes among Medicare beneficiaries, 1991-2010. *JAMA*, 308(12), 1227-1236. doi:10.1001/2012.jama.11153

Dagenais, S., Garbedian, S. and Wai, E. K. (2009). Systematic review of the prevalence of radiographic primary hip osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res*, 467(3), 623-637. doi:10.1007/s11999-008-0625-5

Davidson, D. J., Spratt, D. and Liddle, A. D. (2019). Implant materials and prosthetic joint infection: the battle with the biofilm. *EFORT Open Rev*, 4(11), 633-639. doi:10.1302/2058-5241.4.180095

de Buhr, N. and von Kockritz-Blickwede, M. (2020). Detection, Visualization, and Quantification of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) and NET Markers. *Methods Mol Biol*, 2087, 425-442. doi:10.1007/978-1-0716-0154-9_25

De Vecchi, E., Romano, C. L., De Grandi, R., Cappelletti, L., Villa, F. and Drago, L. (2018). Alpha defensin, leukocyte esterase, C-reactive protein, and leukocyte count in synovial fluid for pre-operative diagnosis of periprosthetic infection. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 32, 2058738418806072. doi:10.1177/2058738418806072

Deirmengian, C., Hallab, N., Tarabishy, A., Della Valle, C., Jacobs, J. J., Lonner, J. and Booth, R. E., Jr. (2010). Synovial fluid biomarkers for periprosthetic infection. *Clin Orthop Relat Res*, 468(8), 2017-2023. doi:10.1007/s11999-010-1298-4

Deirmengian, C., Kardos, K., Kilmartin, P., Cameron, A., Schiller, K. and Parvizi, J. (2014). Combined measurement of synovial fluid alpha-Defensin and C-reactive protein levels: highly accurate for diagnosing periprosthetic joint infection. *J Bone Joint Surg Am*, 96(17), 1439-1445. doi:10.2106/JBJS.M.01316

Del Pozo, J. L. and Patel, R. (2009). Clinical practice. Infection associated with prosthetic joints. *N Engl J Med*, 361(8), 787-794. doi:10.1056/NEJMcp0905029

Delanois, R. E., Mistry, J. B., Gwam, C. U., Mohamed, N. S., Choksi, U. S. and Mont, M. A. (2017). Current Epidemiology of Revision Total Knee Arthroplasty in the United States. *J Arthroplasty*, 32(9), 2663-2668. doi:10.1016/j.arth.2017.03.066

Denning, N. L., Aziz, M., Gurien, S. D. and Wang, P. (2019). DAMPs and NETs in Sepsis. *Front Immunol*, 10, 2536. doi:10.3389/fimmu.2019.02536

Domb, B. G., El Bitar, Y. F., Lindner, D., Jackson, T. J. and Stake, C. E. (2014). Arthroscopic hip surgery with a microfracture procedure of the hip: clinical outcomes with two-year follow-up. *Hip Int*, 24(5), 448-456. doi:10.5301/hipint.5000144

Eilenberg, W., Zagrapan, B., Bleichert, S., Ibrahim, N., Knobl, V., Brandau, A., Martelanz, L., Grasl, M. T., Hayden, H., Nawrozi, P., Rajic, R., Hausler, C., Potolidis, A., Schirwani, N., Scheuba, A., Klopff, J., Teubenbacher, P., Weigl, M. P., Kirchweger, P., Beitzke, D., Stiglbauer-Tscholakoff, A., Panzenbock, A., Lang, I., Mauracher, L. M., Hell, L., Pabinger, I., Bailey, M. A., Scott, D. J. A., Maegdefessel, L., Busch, A., Huk, I., Neumayer, C. and Brostjan, C. (2021). Histone citrullination as a novel biomarker and target to inhibit progression of abdominal aortic aneurysms. *Transl Res*, 233, 32-46. doi:10.1016/j.trsl.2021.02.003

Ellsworth, B. K., Sink, E. L. and Doyle, S. M. (2021). Adolescent hip dysplasia: what are the symptoms and how to diagnose it. *Curr Opin Pediatr*, 33(1), 65-73. doi:10.1097/MOP.0000000000000969

Eriksson, H. K., Nordstrom, J., Gabrysch, K., Hailer, N. P. and Lazarinis, S. (2018). Does the Alpha-defensin Immunoassay or the Lateral Flow Test Have Better Diagnostic Value for Periprosthetic Joint Infection? A Meta-analysis. *Clin Orthop Relat Res*, 476(5), 1065-1072. doi:10.1007/s11999.0000000000000244

Evans, J. T., Evans, J. P., Walker, R. W., Blom, A. W., Whitehouse, M. R. and Sayers, A. (2019). How long does a hip replacement last? A systematic review and meta-analysis of case series and national registry reports with more than 15 years of follow-up. *Lancet*, 393(10172), 647-654. doi:10.1016/S0140-6736(18)31665-9

Fernandez-Carballo, B. L., Broger, T., Wyss, R., Banaei, N. and Denking, C. M. (2019). Toward the Development of a Circulating Free DNA-Based In Vitro Diagnostic Test for Infectious Diseases: a Review of Evidence for Tuberculosis. *J Clin Microbiol*, 57(4). doi:10.1128/JCM.01234-18

Fernquest, S., Palmer, A., Gammer, B., Hirons, E., Kendrick, B., Taylor, A., De Berker, H., Bangerter, N., Carr, A. and Glyn-Jones, S. (2021). Compositional MRI of the Hip: Reproducibility, Effect of Joint Unloading, and Comparison of T2 Relaxometry with Delayed Gadolinium-Enhanced Magnetic Resonance Imaging of Cartilage. *Cartilage*, 12(4), 418-430. doi:10.1177/1947603519841670

Fuchs, T. A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., Weinrauch, Y., Brinkmann, V. and Zychlinsky, A. (2007). Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*, 176(2), 231-241. doi:10.1083/jcb.200606027

Gala, L., Clohisy, J. C. and Beaule, P. E. (2016). Hip Dysplasia in the Young Adult. *J Bone Joint Surg Am*, 98(1), 63-73. doi:10.2106/JBJS.O.00109

Ganz, R., Parvizi, J., Beck, M., Leunig, M., Notzli, H. and Siebenrock, K. A. (2003). Femoroacetabular impingement: a cause for osteoarthritis of the hip. *Clin Orthop Relat Res*(417), 112-120. doi:10.1097/01.blo.0000096804.78689.c2

Gavillet, M., Martinod, K., Renella, R., Harris, C., Shapiro, N. I., Wagner, D. D. and Williams, D. A. (2015). Flow cytometric assay for direct quantification of neutrophil extracellular traps in blood samples. *Am J Hematol*, 90(12), 1155-1158. doi:10.1002/ajh.24185

Gay, C., Chabaud, A., Guilley, E. and Coudeyre, E. (2016). Educating patients about the benefits of physical activity and exercise for their hip and knee osteoarthritis. Systematic literature review. *Ann Phys Rehabil Med*, 59(3), 174-183. doi:10.1016/j.rehab.2016.02.005

Gbejuade, H. O., Lovering, A. M. and Webb, J. C. (2015). The role of microbial biofilms in prosthetic joint infections. *Acta Orthop*, 86(2), 147-158. doi:10.3109/17453674.2014.966290

Gimza, B. D. and Cassat, J. E. (2021). Mechanisms of Antibiotic Failure During Staphylococcus aureus Osteomyelitis. *Front Immunol*, 12, 638085. doi:10.3389/fimmu.2021.638085

Godziuk, K., Prado, C. M., Woodhouse, L. J. and Forhan, M. (2018). The impact of sarcopenic obesity on knee and hip osteoarthritis: a scoping review. *BMC Musculoskelet Disord*, 19(1), 271. doi:10.1186/s12891-018-2175-7

Goh, G. S. and Parvizi, J. (2022). Diagnosis and Treatment of Culture-Negative Periprosthetic Joint Infection. *J Arthroplasty*, 37(8), 1488-1493. doi:10.1016/j.arth.2022.01.061

Gries, C. M. and Kielian, T. (2017). Staphylococcal Biofilms and Immune Polarization During Prosthetic Joint Infection. *J Am Acad Orthop Surg*, 25 Suppl 1(Suppl 1), S20-S24. doi:10.5435/JAAOS-D-16-00636

Grilz, E., Mauracher, L. M., Posch, F., Konigsbrugge, O., Zochbauer-Muller, S., Marosi, C., Lang, I., Pabinger, I. and Ay, C. (2019). Citrullinated histone H3, a biomarker for neutrophil extracellular trap formation, predicts the risk of mortality in patients with cancer. *Br J Haematol*, 186(2), 311-320. doi:10.1111/bjh.15906

Guan, H., Fu, J., Li, X., Chai, W., Hao, L., Li, R., Zhao, J. and Chen, J. (2019). The 2018 new definition of periprosthetic joint infection improves the diagnostic efficiency in the Chinese population. *J Orthop Surg Res*, 14(1), 151. doi:10.1186/s13018-019-1185-y

Gwam, C. U., Mistry, J. B., Mohamed, N. S., Thomas, M., Bigart, K. C., Mont, M. A. and Delanois, R. E. (2017). Current Epidemiology of Revision Total Hip Arthroplasty in the United States: National Inpatient Sample 2009 to 2013. *J Arthroplasty*, 32(7), 2088-2092. doi:10.1016/j.arth.2017.02.046

Haneda, M., Rai, M. F., O'Keefe, R. J., Brophy, R. H., Clohisy, J. C. and Pascual-Garrido, C. (2020). Inflammatory Response of Articular Cartilage to Femoroacetabular Impingement in the Hip. *Am J Sports Med*, 48(7), 1647-1656. doi:10.1177/0363546520918804

Harris, E. C. and Coggon, D. (2015). HIP osteoarthritis and work. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 29(3), 462-482. doi:10.1016/j.berh.2015.04.015

Healy, L. D., Puy, C., Itakura, A., Chu, T., Robinson, D. K., Bylund, A., Phillips, K. G., Gardiner, E. E. and McCarty, O. J. (2016). Colocalization of neutrophils, extracellular DNA and coagulation factors during NETosis: Development and utility of an immunofluorescence-based microscopy platform. *J Immunol Methods*, 435, 77-84. doi:10.1016/j.jim.2016.06.002

Higuera, C. A., Zmistowski, B., Malcom, T., Barsoum, W. K., Sporer, S. M., Mommsen, P., Kendoff, D., Della Valle, C. J. and Parvizi, J. (2017). Synovial Fluid Cell Count for Diagnosis of Chronic Periprosthetic Hip Infection. *J Bone Joint Surg Am*, 99(9), 753-759. doi:10.2106/JBJS.16.00123

Horisberger, M., Brunner, A. and Herzog, R. F. (2010). Arthroscopic treatment of femoral acetabular impingement in patients with preoperative generalized degenerative changes. *Arthroscopy*, 26(5), 623-629. doi:10.1016/j.arthro.2009.09.003

Huerfano, E., Bautista, M., Huerfano, M., Bonilla, G. and Llinas, A. (2017). Screening for Infection Before Revision Hip Arthroplasty: A Meta-analysis of Likelihood Ratios of Erythrocyte Sedimentation Rate and Serum C-reactive Protein Levels. *J Am Acad Orthop Surg*, 25(12), 809-817. doi:10.5435/JAAOS-D-16-00642

Huttunen, R., Kuparinen, T., Jylhava, J., Aittoniemi, J., Vuento, R., Huhtala, H., Laine, J., Syrjanen, J. and Hurme, M. (2011). Fatal outcome in bacteremia is characterized by high plasma cell free DNA concentration and apoptotic DNA fragmentation: a prospective cohort study. *PLoS One*, 6(7), e21700. doi:10.1371/journal.pone.0021700

Ikeda, S., Uchiyama, K., Minegishi, Y., Nakamura, M. and Takaso, M. (2020). Evaluation of myeloperoxidase in synovial fluid as a biomarker for chronic periprosthetic joint infection. *Int Orthop*, 44(10), 1915-1920. doi:10.1007/s00264-020-04753-0

Izakovicova, P., Borens, O. and Trampuz, A. (2019). Periprosthetic joint infection: current concepts and outlook. *EFORT Open Rev*, 4(7), 482-494. doi:10.1302/2058-5241.4.180092

Jacobsen, S. (2006). Adult hip dysplasia and osteoarthritis. Studies in radiology and clinical epidemiology. *Acta Orthop Suppl*, 77(324), 1-37.

Jacobsen, S., Sonne-Holm, S., Soballe, K., Gebuhr, P. and Lund, B. (2004). Radiographic case definitions and prevalence of osteoarthrosis of the hip: a survey of 4 151 subjects in the Osteoarthritis Substudy of the Copenhagen City Heart Study. *Acta Orthop Scand*, 75(6), 713-720. doi:10.1080/00016470410004085

Jamsen, E., Varonen, M., Huhtala, H., Lehto, M. U., Lumio, J., Konttinen, Y. T. and Moilanen, T. (2010). Incidence of prosthetic joint infections after primary knee arthroplasty. *J Arthroplasty*, 25(1), 87-92. doi:10.1016/j.arth.2008.10.013

Kapadia, B. H., Banerjee, S., Cherian, J. J., Bozic, K. J. and Mont, M. A. (2016). The Economic Impact of Periprosthetic Infections After Total Hip Arthroplasty at a Specialized Tertiary-Care Center. *J Arthroplasty*, 31(7), 1422-1426. doi:10.1016/j.arth.2016.01.021

Kaplan, M. J. and Radic, M. (2012). Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *J Immunol*, 189(6), 2689-2695. doi:10.4049/jimmunol.1201719

Katz, J. N., Arant, K. R. and Loeser, R. F. (2021). Diagnosis and Treatment of Hip and Knee Osteoarthritis: A Review. *JAMA*, 325(6), 568-578. doi:10.1001/jama.2020.22171

Kellgren, J. H. and Lawrence, J. S. (1957). Radiological assessment of osteoarthrosis. *Ann Rheum Dis*, 16(4), 494-502. doi:10.1136/ard.16.4.494

Kelly, B. T., Williams, R. J., 3rd and Philippon, M. J. (2003). Hip arthroscopy: current indications, treatment options, and management issues. *Am J Sports Med*, 31(6), 1020-1037. doi:10.1177/03635465030310060701

Khan, M., Osman, K., Green, G. and Haddad, F. S. (2016). The epidemiology of failure in total knee arthroplasty: avoiding your next revision. *Bone Joint J*, 98-B(1 Suppl A), 105-112. doi:10.1302/0301-620X.98B1.36293

Kim, H. K. (2012). Pathophysiology and new strategies for the treatment of Legg-Calve-Perthes disease. *J Bone Joint Surg Am*, 94(7), 659-669. doi:10.2106/JBJS.J.01834

Klement, M. R., Cunningham, D. J., Wooster, B. M., Wellman, S. S., Bolognesi, M. P., Green, C. L. and Garrigues, G. E. (2019). Comparing Standard Versus Extended Culture Duration in Acute Hip and Knee Periprosthetic Joint Infection. *J Am Acad Orthop Surg*, 27(9), e437-e443. doi:10.5435/JAAOS-D-17-00674

Koh, C. K., Zeng, I., Ravi, S., Zhu, M., Vince, K. G. and Young, S. W. (2017a). Periprosthetic Joint Infection Is the Main Cause of Failure for Modern Knee Arthroplasty: An Analysis of 11,134 Knees. *Clin Orthop Relat Res*, 475(9), 2194-2201. doi:10.1007/s11999-017-5396-4

Koh, I. J., Han, S. B., In, Y., Oh, K. J., Lee, D. H., Kim, T. K. and Knee Multicenter Collaboration, T. (2017b). The Leukocyte Esterase Strip Test has Practical Value for Diagnosing Periprosthetic Joint Infection After Total Knee Arthroplasty: A Multicenter Study. *J Arthroplasty*, 32(11), 3519-3523. doi:10.1016/j.arth.2017.06.008

Kolasinski, S. L., Neogi, T., Hochberg, M. C., Oatis, C., Guyatt, G., Block, J., Callahan, L., Copenhaver, C., Dodge, C., Felson, D., Gellar, K., Harvey, W. F., Hawker, G., Herzig, E., Kwoh, C. K., Nelson, A. E., Samuels, J., Scanzello, C., White, D., Wise, B., Altman, R. D., DiRenzo, D., Fontanarosa, J., Giradi, G., Ishimori, M., Misra, D., Shah, A. A., Shmagel, A. K., Thoma, L. M., Turgunbaev, M., Turner, A. S. and Reston, J. (2020). 2019 American College of Rheumatology/Arthritis Foundation Guideline for the Management of Osteoarthritis of the Hand, Hip, and Knee. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 72(2), 149-162. doi:10.1002/acr.24131

Korn, M. F., Stein, R. R., Dolf, A., Shakeri, F., Buness, A., Hilgers, C., Masson, W., Gravius, S., Kohlhof, H., Burger, C., Wirtz, D. C., Randau, T. M. and Schildberg, F. A. (2020). High-Dimensional Analysis of Immune Cell Composition Predicts

Periprosthetic Joint Infections and Dissects Its Pathophysiology. *Biomedicines*, 8(9). doi:10.3390/biomedicines8090358

Krenn, V., Morawietz, L., Perino, G., Kienapfel, H., Ascherl, R., Hassenpflug, G. J., Thomsen, M., Thomas, P., Huber, M., Kendoff, D., Baumhoer, D., Krukemeyer, M. G., Natu, S., Boettner, F., Zustin, J., Kolbel, B., Ruther, W., Kretzer, J. P., Tiemann, A., Trampuz, A., Frommelt, L., Tichilow, R., Soder, S., Muller, S., Parvizi, J., Illgner, U. and Gehrke, T. (2014). Revised histopathological consensus classification of joint implant related pathology. *Pathol Res Pract*, 210(12), 779-786. doi:10.1016/j.prp.2014.09.017

Kurtz, S., Mowat, F., Ong, K., Chan, N., Lau, E. and Halpern, M. (2005). Prevalence of primary and revision total hip and knee arthroplasty in the United States from 1990 through 2002. *J Bone Joint Surg Am*, 87(7), 1487-1497. doi:10.2106/JBJS.D.02441

Kurtz, S., Ong, K., Lau, E., Mowat, F. and Halpern, M. (2007). Projections of primary and revision hip and knee arthroplasty in the United States from 2005 to 2030. *J Bone Joint Surg Am*, 89(4), 780-785. doi:10.2106/JBJS.F.00222

Kurtz, S. M., Lau, E. C., Son, M. S., Chang, E. T., Zimmerli, W. and Parvizi, J. (2018). Are We Winning or Losing the Battle With Periprosthetic Joint Infection: Trends in Periprosthetic Joint Infection and Mortality Risk for the Medicare Population. *J Arthroplasty*, 33(10), 3238-3245. doi:10.1016/j.arth.2018.05.042

Kurtz, S. M., Ong, K. L., Lau, E. and Bozic, K. J. (2014). Impact of the economic downturn on total joint replacement demand in the United States: updated projections to 2021. *J Bone Joint Surg Am*, 96(8), 624-630. doi:10.2106/JBJS.M.00285

Lavernia, C. J., Iacobelli, D. A., Brooks, L. and Villa, J. M. (2015). The Cost-Utility of Total Hip Arthroplasty: Earlier Intervention, Improved Economics. *J Arthroplasty*, 30(6), 945-949. doi:10.1016/j.arth.2014.12.028

Learmonth, I. D., Young, C. and Rorabeck, C. (2007). The operation of the century: total hip replacement. *Lancet*, 370(9597), 1508-1519. doi:10.1016/s0140-6736(07)60457-7

Lee, K. H., Kronbichler, A., Park, D. D., Park, Y., Moon, H., Kim, H., Choi, J. H., Choi, Y., Shim, S., Lyu, I. S., Yun, B. H., Han, Y., Lee, D., Lee, S. Y., Yoo, B. H., Lee, K. H., Kim, T. L., Kim, H., Shim, J. S., Nam, W., So, H., Choi, S., Lee, S. and Shin, J. I. (2017). Neutrophil extracellular traps (NETs) in autoimmune diseases: A comprehensive review. *Autoimmun Rev*, 16(11), 1160-1173. doi:10.1016/j.autrev.2017.09.012

Leroux, J., Abu Amara, S. and Lechevallier, J. (2018). Legg-Calve-Perthes disease. *Orthop Traumatol Surg Res*, 104(1S), S107-S112. doi:10.1016/j.otsr.2017.04.012

Lespasio, M. J., Sultan, A. A., Piuizzi, N. S., Khlopas, A., Husni, M. E., Muschler, G. F. and Mont, M. A. (2018). Hip Osteoarthritis: A Primer. *Perm J*, 22, 17-084. doi:10.7812/TPP/17-084

Liddle, A. D., Pandit, H., Judge, A. and Murray, D. W. (2015). Optimal usage of unicompartmental knee arthroplasty: a study of 41,986 cases from the National Joint Registry for England and Wales. *Bone Joint J*, 97-B(11), 1506-1511. doi:10.1302/0301-620X.97B11.35551

Lieberman, J. R., Engstrom, S. M., Solovyova, O., Au, C. and Grady, J. J. (2015). Is intra-articular hyaluronic acid effective in treating osteoarthritis of the hip joint? *J Arthroplasty*, 30(3), 507-511. doi:10.1016/j.arth.2013.10.019

Lievensse, A. M., Bierma-Zeinstra, S. M., Verhagen, A. P., Verhaar, J. A. and Koes, B. W. (2004). Influence of hip dysplasia on the development of osteoarthritis of the hip. *Ann Rheum Dis*, 63(6), 621-626. doi:10.1136/ard.2003.009860

Liu, X., Machado, G. C., Eyles, J. P., Ravi, V. and Hunter, D. J. (2018). Dietary supplements for treating osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Br J Sports Med*, 52(3), 167-175. doi:10.1136/bjsports-2016-097333

Logters, T., Paunel-Gorgulu, A., Zilkens, C., Altrichter, J., Scholz, M., Thelen, S., Krauspe, R., Margraf, S., Jeri, T., Windolf, J. and Jager, M. (2009). Diagnostic accuracy of neutrophil-derived circulating free DNA (cf-DNA/NETs) for septic arthritis. *J Orthop Res*, 27(11), 1401-1407. doi:10.1002/jor.20911

Losina, E., Walensky, R. P., Kessler, C. L., Emrani, P. S., Reichmann, W. M., Wright, E. A., Holt, H. L., Solomon, D. H., Yelin, E., Paltiel, A. D. and Katz, J. N. (2009). Cost-effectiveness of total knee arthroplasty in the United States: patient risk and hospital volume. *Arch Intern Med*, 169(12), 1113-1121; discussion 1121-1112. doi:10.1001/archinternmed.2009.136

Lynch, T. S., O'Connor, M., Minkara, A. A., Westermann, R. W. and Rosneck, J. T. (2019). Biomarkers for Femoroacetabular Impingement and Hip Osteoarthritis: A Systematic Review and Meta-analysis. *Am J Sports Med*, 47(9), 2242-2250. doi:10.1177/0363546518803360

Maistrelli, G. L., Gerundini, M., Fusco, U., Bombelli, R., Bombelli, M. and Avai, A. (1990). Valgus-extension osteotomy for osteoarthritis of the hip. Indications and long-term results. *J Bone Joint Surg Br*, 72(4), 653-657. doi:10.1302/0301-620X.72B4.2380222

Masrouha, K. Z., Callaghan, J. J. and Morcuende, J. A. (2018). Primary Total Hip Arthroplasty for Legg-Calve-Perthes Syndrome: 20 Year Follow-Up Study. *Iowa Orthop J*, 38, 197-202.

Masucci, M. T., Minopoli, M., Del Vecchio, S. and Carriero, M. V. (2020). The Emerging Role of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Tumor Progression and Metastasis. *Front Immunol*, 11, 1749. doi:10.3389/fimmu.2020.01749

Masuda, S., Nakazawa, D., Shida, H., Miyoshi, A., Kusunoki, Y., Tomaru, U. and Ishizu, A. (2016). NETosis markers: Quest for specific, objective, and quantitative markers. *Clin Chim Acta*, 459, 89-93. doi:10.1016/j.cca.2016.05.029

Masuda, S., Shimizu, S., Matsuo, J., Nishibata, Y., Kusunoki, Y., Hattanda, F., Shida, H., Nakazawa, D., Tomaru, U., Atsumi, T. and Ishizu, A. (2017). Measurement of NET formation in vitro and in vivo by flow cytometry. *Cytometry A*, 91(8), 822-829. doi:10.1002/cyto.a.23169

Mathew, S. E. and Larson, A. N. (2019). Natural History of Slipped Capital Femoral Epiphysis. *J Pediatr Orthop*, 39(Issue 6, Supplement 1 Suppl 1), S23-S27. doi:10.1097/BPO.0000000000001369

McConoughey, S. J., Howlin, R., Granger, J. F., Manring, M. M., Calhoun, J. H., Shirliff, M., Kathju, S. and Stoodley, P. (2014). Biofilms in periprosthetic orthopedic infections. *Future Microbiol*, 9(8), 987-1007. doi:10.2217/fmb.14.64

McNally, M., Sousa, R., Wouthuyzen-Bakker, M., Chen, A. F., Soriano, A., Vogely, H. C., Clauss, M., Higuera, C. A. and Trebse, R. (2021). The EBJIS definition of periprosthetic joint infection. *Bone Joint J*, 103-B(1), 18-25. doi:10.1302/0301-620X.103B1.BJJ-2020-1381.R1

Meyle, E., Stroh, P., Gunther, F., Hoppy-Tichy, T., Wagner, C. and Hansch, G. M. (2010). Destruction of bacterial biofilms by polymorphonuclear neutrophils: relative contribution of phagocytosis, DNA release, and degranulation. *Int J Artif Organs*, 33(9), 608-620. doi:10.1177/039139881003300906

Miyata, T. and Fan, X. (2012). A second hit for TMA. *Blood*, 120(6), 1152-1154. doi:10.1182/blood-2012-06-433235

Mohanan, S., Cherrington, B. D., Horibata, S., McElwee, J. L., Thompson, P. R. and Coonrod, S. A. (2012). Potential role of peptidylarginine deiminase enzymes and protein citrullination in cancer pathogenesis. *Biochem Res Int*, 2012, 895343. doi:10.1155/2012/895343

Morawietz, L., Tiddens, O., Mueller, M., Tohtz, S., Gansukh, T., Schroeder, J. H., Perka, C. and Krenn, V. (2009). Twenty-three neutrophil granulocytes in 10 high-power fields is the best histopathological threshold to differentiate between aseptic and septic endoprosthesis loosening. *Histopathology*, 54(7), 847-853. doi:10.1111/j.1365-2559.2009.03313.x

Morscher, E. (1979). [Intertrochanteric osteotomy in coxarthrosis as an alternative to endoprosthesis]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb*, 117(4), 427-432.

Munoz-Mahamud, E., Molinas, I., Lozano, L., Bosch, J., Morata, L., Combalia, A., Soriano, A. and Bori, G. (2018). Usefulness of Culturing the Periprosthetic Membrane or Neosynovium for the Diagnosis of Infection During Hip and Knee Revision Arthroplasty. *J Am Acad Orthop Surg*, 26(20), e442-e447. doi:10.5435/JAAOS-D-16-00583

Mutua, V. and Gershwin, L. J. (2021). A Review of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Disease: Potential Anti-NETs Therapeutics. *Clin Rev Allergy Immunol*, 61(2), 194-211. doi:10.1007/s12016-020-08804-7

Natsuhara, K. M., Shelton, T. J., Meehan, J. P. and Lum, Z. C. (2019). Mortality During Total Hip Periprosthetic Joint Infection. *J Arthroplasty*, 34(7S), S337-S342. doi:10.1016/j.arth.2018.12.024

Nemes, S., Gordon, M., Rogmark, C. and Rolfson, O. (2014). Projections of total hip replacement in Sweden from 2013 to 2030. *Acta Orthop*, 85(3), 238-243. doi:10.3109/17453674.2014.913224

Ng, H., Havervall, S., Rosell, A., Aguilera, K., Parv, K., von Meijenfildt, F. A., Lisman, T., Mackman, N., Thalín, C. and Phillipson, M. (2021). Circulating Markers of Neutrophil Extracellular Traps Are of Prognostic Value in Patients With COVID-19. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 41(2), 988-994. doi:10.1161/ATVBAHA.120.315267

O'Connor, M., Minkara, A. A., Westermann, R. W., Rosneck, J. and Lynch, T. S. (2018). Outcomes of Joint Preservation Procedures for Cartilage Injuries in the Hip: A Systematic Review and Meta-analysis. *Orthop J Sports Med*, 6(6), 2325967118776944. doi:10.1177/2325967118776944

O'Connor, M. I. (2006). Osteoarthritis of the hip and knee: sex and gender differences. *Orthop Clin North Am*, 37(4), 559-568. doi:10.1016/j.ocl.2006.09.004

Osmon, D. R., Berbari, E. F., Berendt, A. R., Lew, D., Zimmerli, W., Steckelberg, J. M., Rao, N., Hanssen, A., Wilson, W. R. and Infectious Diseases Society of, A. (2013). Diagnosis and management of prosthetic joint infection: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*, 56(1), e1-e25. doi:10.1093/cid/cis803

Outerbridge, R. E. and Dunlop, J. A. (1975). The problem of chondromalacia patellae. *Clin Orthop Relat Res*(110), 177-196. doi:10.1097/00003086-197507000-00024

- Pan, B., Li, Y., Liu, Y., Wang, W., Huang, G. and Ouyang, Y. (2021). Circulating CitH3 Is a Reliable Diagnostic and Prognostic Biomarker of Septic Patients in Acute Pancreatitis. *Front Immunol*, 12, 766391. doi:10.3389/fimmu.2021.766391
- Panlilio, H. and Rice, C. V. (2021). The role of extracellular DNA in the formation, architecture, stability, and treatment of bacterial biofilms. *Biotechnol Bioeng*, 118(6), 2129-2141. doi:10.1002/bit.27760
- Papayannopoulos, V. (2018). Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol*, 18(2), 134-147. doi:10.1038/nri.2017.105
- Park, J. W., Won, S. H., Moon, S. Y., Lee, Y. K., Ha, Y. C. and Koo, K. H. (2021). Burden and future projection of revision Total hip Arthroplasty in South Korea. *BMC Musculoskelet Disord*, 22(1), 375. doi:10.1186/s12891-021-04235-3
- Parvizi, J., Alijanipour, P., Barberi, E. F., Hickok, N. J., Phillips, K. S., Shapiro, I. M., Schwarz, E. M., Stevens, M. H., Wang, Y. and Shirliff, M. E. (2015). Novel developments in the prevention, diagnosis, and treatment of periprosthetic joint infections. *J Am Acad Orthop Surg*, 23 Suppl, S32-43. doi:10.5435/JAAOS-D-14-00455
- Parvizi, J., Jacovides, C., Antoci, V. and Ghanem, E. (2011). Diagnosis of periprosthetic joint infection: the utility of a simple yet unappreciated enzyme. *J Bone Joint Surg Am*, 93(24), 2242-2248. doi:10.2106/JBJS.J.01413
- Parvizi, J., Tan, T. L., Goswami, K., Higuera, C., Della Valle, C., Chen, A. F. and Shohat, N. (2018). The 2018 Definition of Periprosthetic Hip and Knee Infection: An Evidence-Based and Validated Criteria. *J Arthroplasty*, 33(5), 1309-1314 e1302. doi:10.1016/j.arth.2018.02.078
- Pereira, D., Peleteiro, B., Araujo, J., Branco, J., Santos, R. A. and Ramos, E. (2011). The effect of osteoarthritis definition on prevalence and incidence estimates: a systematic review. *Osteoarthritis Cartilage*, 19(11), 1270-1285. doi:10.1016/j.joca.2011.08.009
- Phillips, J. E., Crane, T. P., Noy, M., Elliott, T. S. and Grimer, R. J. (2006). The incidence of deep prosthetic infections in a specialist orthopaedic hospital: a 15-year

prospective survey. *J Bone Joint Surg Br*, 88(7), 943-948. doi:10.1302/0301-620X.88B7.17150

Prieto-Alhambra, D., Judge, A., Javaid, M. K., Cooper, C., Diez-Perez, A. and Arden, N. K. (2014). Incidence and risk factors for clinically diagnosed knee, hip and hand osteoarthritis: influences of age, gender and osteoarthritis affecting other joints. *Ann Rheum Dis*, 73(9), 1659-1664. doi:10.1136/annrheumdis-2013-203355

Rada, B. (2019). Neutrophil Extracellular Traps. *Methods Mol Biol*, 1982, 517-528. doi:10.1007/978-1-4939-9424-3_31

Ramamurthy, T., Ghosh, A., Pazhani, G. P. and Shinoda, S. (2014). Current Perspectives on Viable but Non-Culturable (VBNC) Pathogenic Bacteria. *Front Public Health*, 2, 103. doi:10.3389/fpubh.2014.00103

Rausch Osthoff, A. K., Niedermann, K., Braun, J., Adams, J., Brodin, N., Dagfinrud, H., Duruoz, T., Esbensen, B. A., Gunther, K. P., Hurkmans, E., Juhl, C. B., Kennedy, N., Kiltz, U., Knittle, K., Nurmohamed, M., Pais, S., Severijns, G., Swinnen, T. W., Pitsillidou, I. A., Warburton, L., Yankov, Z. and Vliet Vlieland, T. P. M. (2018). 2018 EULAR recommendations for physical activity in people with inflammatory arthritis and osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*, 77(9), 1251-1260. doi:10.1136/annrheumdis-2018-213585

Reijman, M., Hazes, J. M., Koes, B. W., Verhagen, A. P. and Bierma-Zeinstra, S. M. (2004). Validity, reliability, and applicability of seven definitions of hip osteoarthritis used in epidemiological studies: a systematic appraisal. *Ann Rheum Dis*, 63(3), 226-232. doi:10.1136/ard.2003.010348

Reyes, C., Leyland, K. M., Peat, G., Cooper, C., Arden, N. K. and Prieto-Alhambra, D. (2016). Association Between Overweight and Obesity and Risk of Clinically Diagnosed Knee, Hip, and Hand Osteoarthritis: A Population-Based Cohort Study. *Arthritis Rheumatol*, 68(8), 1869-1875. doi:10.1002/art.39707

Rezapoor, M. and Parvizi, J. (2015). Prevention of Periprosthetic Joint Infection. *J Arthroplasty*, 30(6), 902-907. doi:10.1016/j.arth.2015.02.044

Ricci, J. A., Stewart, W. F., Chee, E., Leotta, C., Foley, K. and Hochberg, M. C. (2005). Pain exacerbation as a major source of lost productive time in US workers with arthritis. *Arthritis Rheum*, 53(5), 673-681. doi:10.1002/art.21453

Rossignol, M. (2004). Primary osteoarthritis and occupation in the Quebec national health and social survey. *Occup Environ Med*, 61(9), 729-735. doi:10.1136/oem.2003.010389

Rossignol, M., Leclerc, A., Allaert, F. A., Rozenberg, S., Valat, J. P., Avouac, B., Coste, P., Litvak, E. and Hilliquin, P. (2005). Primary osteoarthritis of hip, knee, and hand in relation to occupational exposure. *Occup Environ Med*, 62(11), 772-777. doi:10.1136/oem.2005.020057

Runhaar, J., Rozendaal, R. M., van Middelkoop, M., Bijlsma, H. J. W., Doherty, M., Dziedzic, K. S., Lohmander, L. S., McAlindon, T., Zhang, W. and Bierma Zeinstra, S. (2017). Subgroup analyses of the effectiveness of oral glucosamine for knee and hip osteoarthritis: a systematic review and individual patient data meta-analysis from the OA trial bank. *Ann Rheum Dis*, 76(11), 1862-1869. doi:10.1136/annrheumdis-2017-211149

Saitoh, T., Komano, J., Saitoh, Y., Misawa, T., Takahama, M., Kozaki, T., Uehata, T., Iwasaki, H., Omori, H., Yamaoka, S., Yamamoto, N. and Akira, S. (2012). Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. *Cell Host Microbe*, 12(1), 109-116. doi:10.1016/j.chom.2012.05.015

Schechter, M. C., Buac, K., Adekambi, T., Cagle, S., Celli, J., Ray, S. M., Mehta, C. C., Rada, B. and Rengarajan, J. (2017). Neutrophil extracellular trap (NET) levels in human plasma are associated with active TB. *PLoS One*, 12(8), e0182587. doi:10.1371/journal.pone.0182587

Schwartz, A. M., Farley, K. X., Guild, G. N. and Bradbury, T. L., Jr. (2020). Projections and Epidemiology of Revision Hip and Knee Arthroplasty in the United States to 2030. *J Arthroplasty*, 35(6S), S79-S85. doi:10.1016/j.arth.2020.02.030

Segawa, H., Tsukayama, D. T., Kyle, R. F., Becker, D. A. and Gustilo, R. B. (1999). Infection after total knee arthroplasty. A retrospective study of the treatment of eighty-

one infections. *J Bone Joint Surg Am*, 81(10), 1434-1445. doi:10.2106/00004623-199910000-00008

Sigmund, I. K., Holinka, J., Gamper, J., Staats, K., Bohler, C., Kubista, B. and Windhager, R. (2017). Qualitative alpha-defensin test (Synovasure) for the diagnosis of periprosthetic infection in revision total joint arthroplasty. *Bone Joint J*, 99-B(1), 66-72. doi:10.1302/0301-620X.99B1.BJJ-2016-0295.R1

Silva, J. C., Rodrigues, N. C., Thompson-Souza, G. A., Muniz, V. S., Neves, J. S. and Figueiredo, R. T. (2020). Mac-1 triggers neutrophil DNA extracellular trap formation to *Aspergillus fumigatus* independently of PAD4 histone citrullination. *J Leukoc Biol*, 107(1), 69-83. doi:10.1002/JLB.4A0119-009RR

Sorensen, O. E. and Borregaard, N. (2016). Neutrophil extracellular traps - the dark side of neutrophils. *J Clin Invest*, 126(5), 1612-1620. doi:10.1172/JCI84538

Speziale, P. and Pietrocola, G. (2021). *Staphylococcus aureus* induces neutrophil extracellular traps (NETs) and neutralizes their bactericidal potential. *Comput Struct Biotechnol J*, 19, 3451-3457. doi:10.1016/j.csbj.2021.06.012

Tan, C., Aziz, M. and Wang, P. (2021). The vitals of NETs. *J Leukoc Biol*, 110(4), 797-808. doi:10.1002/JLB.3RU0620-375R

Tan, T. L., Kheir, M. M., Shohat, N., Tan, D. D., Kheir, M., Chen, C. and Parvizi, J. (2018). Culture-Negative Periprosthetic Joint Infection: An Update on What to Expect. *JB JS Open Access*, 3(3), e0060. doi:10.2106/JBJS.OA.17.00060

Tan, T. L., Kheir, M. M., Tan, D. D. and Parvizi, J. (2016). Polymicrobial Periprosthetic Joint Infections: Outcome of Treatment and Identification of Risk Factors. *J Bone Joint Surg Am*, 98(24), 2082-2088. doi:10.2106/JBJS.15.01450

Tande, A. J. and Patel, R. (2014). Prosthetic joint infection. *Clin Microbiol Rev*, 27(2), 302-345. doi:10.1128/CMR.00111-13

Thalin, C., Daleskog, M., Goransson, S. P., Schatzberg, D., Lasselin, J., Laska, A. C., Kallner, A., Helleday, T., Wallen, H. and Demers, M. (2017). Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the quantification of citrullinated histone H3

as a marker for neutrophil extracellular traps in human plasma. *Immunol Res*, 65(3), 706-712. doi:10.1007/s12026-017-8905-3

Thalin, C., Lundstrom, S., Seignez, C., Daleskog, M., Lundstrom, A., Henriksson, P., Helleday, T., Phillipson, M., Wallen, H. and Demers, M. (2018). Citrullinated histone H3 as a novel prognostic blood marker in patients with advanced cancer. *PLoS One*, 13(1), e0191231. doi:10.1371/journal.pone.0191231

Thiam, H. R., Wong, S. L., Wagner, D. D. and Waterman, C. M. (2020). Cellular Mechanisms of NETosis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 36, 191-218. doi:10.1146/annurev-cellbio-020520-111016

Thiele, K., Perka, C., Matziolis, G., Mayr, H. O., Sostheim, M. and Hube, R. (2015). Current failure mechanisms after knee arthroplasty have changed: polyethylene wear is less common in revision surgery. *J Bone Joint Surg Am*, 97(9), 715-720. doi:10.2106/JBJS.M.01534

Tilley, D. O., Abuabed, U., Zimny Arndt, U., Schmid, M., Florian, S., Jungblut, P. R., Brinkmann, V., Herzig, A. and Zychlinsky, A. (2022). Histone H3 clipping is a novel signature of human neutrophil extracellular traps. *Elife*, 11. doi:10.7554/eLife.68283

Tischler, E. H., Cavanaugh, P. K. and Parvizi, J. (2014). Leukocyte esterase strip test: matched for musculoskeletal infection society criteria. *J Bone Joint Surg Am*, 96(22), 1917-1920. doi:10.2106/JBJS.M.01591

Tonnis, D. (1976). [Letter: Congenital hip dysplasia: clinical and radiological diagnosis (author's transl)]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb*, 114(1), 98-99.

Towheed, T. E., Maxwell, L., Judd, M. G., Catton, M., Hochberg, M. C. and Wells, G. (2006). Acetaminophen for osteoarthritis. *Cochrane Database Syst Rev*, 2006(1), CD004257. doi:10.1002/14651858.CD004257.pub2

Trampuz, A., Hanssen, A. D., Osmon, D. R., Mandrekar, J., Steckelberg, J. M. and Patel, R. (2004). Synovial fluid leukocyte count and differential for the diagnosis of prosthetic knee infection. *Am J Med*, 117(8), 556-562. doi:10.1016/j.amjmed.2004.06.022

Tubb, C. C., Polkowksi, G. G. and Krause, B. (2020). Diagnosis and Prevention of Periprosthetic Joint Infections. *J Am Acad Orthop Surg*, 28(8), e340-e348.

doi:10.5435/JAAOS-D-19-00405

Turgeon, T. R., Phillips, W., Kantor, S. R. and Santore, R. F. (2005). The role of acetabular and femoral osteotomies in reconstructive surgery of the hip: 2005 and beyond. *Clin Orthop Relat Res*, 441, 188-199.

doi:10.1097/01.blo.0000193541.72443.73

Urban, C. F., Reichard, U., Brinkmann, V. and Zychlinsky, A. (2006). Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol*, 8(4), 668-676. doi:10.1111/j.1462-5822.2005.00659.x

van der Woude, J. A., Nair, S. C., Custers, R. J., van Laar, J. M., Kuchuck, N. O., Lafeber, F. P. and Welsing, P. M. (2016). Knee Joint Distraction Compared to Total Knee Arthroplasty for Treatment of End Stage Osteoarthritis: Simulating Long-Term Outcomes and Cost-Effectiveness. *PLoS One*, 11(5), e0155524.

doi:10.1371/journal.pone.0155524

van Doormaal, M. C. M., Meerhoff, G. A., Vliet Vlieland, T. P. M. and Peter, W. F. (2020). A clinical practice guideline for physical therapy in patients with hip or knee osteoarthritis. *Musculoskeletal Care*, 18(4), 575-595. doi:10.1002/msc.1492

Villa, J. M., Pannu, T. S., Theeb, I., Buttaro, M. A., Onativia, J. I., Carbo, L., Rienzi, D. H., Fregeiro, J. I., Kornilov, N. N., Bozhkova, S. A., Sandiford, N. A., PiuZZi, N. S., Higuera, C. A. and Kendoff, D. O. (2021). International Organism Profile of Periprosthetic Total Hip and Knee Infections. *J Arthroplasty*, 36(1), 274-278.

doi:10.1016/j.arth.2020.07.020

Vrgoc, G., Japjec, M., Gulan, G., Ravlic-Gulan, J., Marinovic, M. and Bandalovic, A. (2014). Periprosthetic infections after total hip and knee arthroplasty--a review. *Coll Antropol*, 38(4), 1259-1264.

Wenham, C. Y. and Conaghan, P. G. (2013). New horizons in osteoarthritis. *Age Ageing*, 42(3), 272-278. doi:10.1093/ageing/aft043

Wyatt, M. C., Beswick, A. D., Kunutsor, S. K., Wilson, M. J., Whitehouse, M. R. and Blom, A. W. (2016). The Alpha-Defensin Immunoassay and Leukocyte Esterase Colorimetric Strip Test for the Diagnosis of Periprosthetic Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Bone Joint Surg Am*, 98(12), 992-1000.

doi:10.2106/JBJS.15.01142

Xu, X., Wu, Y., Xu, S., Yin, Y., Ageno, W., De Stefano, V., Zhao, Q. and Qi, X. (2022). Clinical significance of neutrophil extracellular traps biomarkers in thrombosis. *Thromb J*, 20(1), 63. doi:10.1186/s12959-022-00421-y

Yan, C. H., Arciola, C. R., Soriano, A., Levin, L. S., Bauer, T. W. and Parvizi, J. (2018). Team Approach: The Management of Infection After Total Knee Replacement. *JBJS Rev*, 6(4), e9. doi:10.2106/JBJS.RVW.17.00058

Yipp, B. G. and Kubes, P. (2013). NETosis: how vital is it? *Blood*, 122(16), 2784-2794. doi:10.1182/blood-2013-04-457671

Yousefi, S., Mihalache, C., Kozlowski, E., Schmid, I. and Simon, H. U. (2009). Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ*, 16(11), 1438-1444. doi:10.1038/cdd.2009.96

Zahar, A., Lausmann, C., Cavalheiro, C., Dhamangaonkar, A. C., Bonanzinga, T., Gehrke, T. and Citak, M. (2018). How Reliable Is the Cell Count Analysis in the Diagnosis of Prosthetic Joint Infection? *J Arthroplasty*, 33(10), 3257-3262. doi:10.1016/j.arth.2018.05.018

Zardi, E. M. and Franceschi, F. (2020). Prosthetic joint infection. A relevant public health issue. *J Infect Public Health*, 13(12), 1888-1891. doi:10.1016/j.jiph.2020.09.006

Zawrotniak, M. and Rapala-Kozik, M. (2013). Neutrophil extracellular traps (NETs) - formation and implications. *Acta Biochim Pol*, 60(3), 277-284.

Zharkova, O., Tay, S. H., Lee, H. Y., Shubhita, T., Ong, W. Y., Lateef, A., MacAry, P. A., Lim, L. H. K., Connolly, J. E. and Fairhurst, A. M. (2019). A Flow Cytometry-Based Assay for High-Throughput Detection and Quantification of Neutrophil

Extracellular Traps in Mixed Cell Populations. *Cytometry A*, 95(3), 268-278.
doi:10.1002/cyto.a.23672

Zheng, Q. Y., Li, R., Ni, M., Ren, P., Ji, Q. B., Sun, J. Y., Li, J. C., Chen, J. Y. and Zhang, G. Q. (2021). What Is the Optimal Timing for Reading the Leukocyte Esterase Strip for the Diagnosis of Periprosthetic Joint Infection? *Clin Orthop Relat Res*, 479(6), 1323-1330. doi:10.1097/CORR.0000000000001609

Zhu, S., Yu, Y., Ren, Y., Xu, L., Wang, H., Ling, X., Jin, L., Hu, Y., Zhang, H., Miao, C. and Guo, K. (2021). The emerging roles of neutrophil extracellular traps in wound healing. *Cell Death Dis*, 12(11), 984. doi:10.1038/s41419-021-04294-3

Zhu, X., Sang, L., Wu, D., Rong, J. and Jiang, L. (2018). Effectiveness and safety of glucosamine and chondroitin for the treatment of osteoarthritis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Orthop Surg Res*, 13(1), 170. doi:10.1186/s13018-018-0871-5

Zilkens, C., Miese, F., Kim, Y. J., Hosalkar, H., Antoch, G., Krauspe, R. and Bittersohl, B. (2012). Three-dimensional delayed gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging of hip joint cartilage at 3T: a prospective controlled study. *Eur J Radiol*, 81(11), 3420-3425. doi:10.1016/j.ejrad.2012.04.008

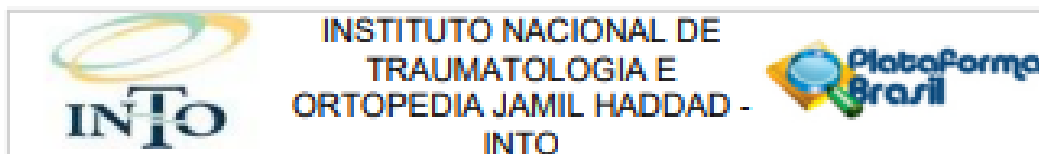
Zimmerli, W. (2014). Clinical presentation and treatment of orthopaedic implant-associated infection. *J Intern Med*, 276(2), 111-119. doi:10.1111/joim.12233

Zimmerli, W. and Sendi, P. (2017). Orthopaedic biofilm infections. *APMIS*, 125(4), 353-364. doi:10.1111/apm.12687

Zimmerli, W., Trampuz, A. and Ochsner, P. E. (2004). Prosthetic-joint infections. *N Engl J Med*, 351(16), 1645-1654. doi:10.1056/NEJMra040181

Zoller, S. D., Hegde, V., Burke, Z. D. C., Park, H. Y., Ishmael, C. R., Blumstein, G. W., Sheppard, W., Hamad, C., Loftin, A. H., Johansen, D. O., Smith, R. A., Sprague, M. M., Hori, K. R., Clarkson, S. J., Borthwell, R., Simon, S. I., Miller, J. F., Nelson, S. D. and Bernthal, N. M. (2020). Evading the host response: Staphylococcus "hiding" in cortical bone canalicular system causes increased bacterial burden. *Bone Res*, 8(1), 43. doi:10.1038/s41413-020-00118-w

ANEXO A. Parecer de aprovação do CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização do processo de ativação de neutrófilos e liberação de redes extracelulares de neutrófilos no líquido sinovial de pacientes com infecção periprotética pós artroplastia de quadril.

Pesquisador: Ana Carolina Leal de Oliveira

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 21100519.1.0000.5273

Instituição Proponente: Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia / INTO / SAS/ MS - RJ

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.687.649

Apresentação do Projeto:

O trabalho é extremamente interessante e a apresentação geral é adequada.

INTRODUÇÃO/REVISÃO DA LITERATURA:

A artroplastia total de quadril (ATQ) é um dos procedimentos cirúrgicos que apresenta o maior índice de sucesso na melhora funcional e satisfação do paciente, quando comparada a todos os procedimentos existentes na medicina atual, sendo por isso considerada a "cirurgia do século" (1). A cirurgia consiste na substituição total da articulação coxo-femoral, formada pela cabeça femoral e cavidade acetabular, por uma prótese (2). É uma das cirurgias eletivas mais comumente realizadas nos Estados Unidos da América (EUA), apresentando bons resultados em relação ao alívio dos sintomas causados pela osteoartrite do quadril (3). No Reino Unido e nos EUA, cerca de 800.000 artroplastias são realizadas anualmente, com estimativa de aumento para acima de 4 milhões até 2030 (4). As projeções para o futuro mostram demanda crescente pela cirurgia primária e pelas cirurgias de revisão de ATQ. Este aumento está relacionado a fatores como: a seleção dos pacientes, o aumento de procedimentos realizados em pacientes jovens ativos e a crescente sobrevivência das cirurgias de revisão dos implantes (5). Estima-se que de 2005 a 2030, nos Estados Unidos, haverá crescimento de 174% na demanda por esse procedimento, chegando a 572.000 ATQs primárias, e crescimento de 137% nas ATQs de revisão (6).

As ATQs podem falhar por diversos motivos, frequentemente levando a necessidade de cirurgias

Endereço: Avenida Brasil, nº 530

Bairro: São Cristóvão

CEP: 20.540-070

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização do processo de ativação de neutrófilos e liberação de redes extracelulares de neutrófilos no líquido sinovial de pacientes com infecção periprotética pós artroplastia de quadril.

Pesquisador: Ana Carolina Leal de Oliveira

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 21100519.1.0000.5273

Instituição Proponente: Instituto Nacional de Traumatologia - Ortopedia / INTO / SAS/ MS - RJ

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.687.649

Apresentação do Projeto:

O trabalho é extremamente interessante e a apresentação geral é adequada.

INTRODUÇÃO/REVISÃO DA LITERATURA:

A artroplastia total de quadril (ATQ) é um dos procedimentos cirúrgicos que apresenta o maior índice de sucesso na melhora funcional e satisfação do paciente, quando comparada a todos os procedimentos existentes na medicina atual, sendo por isso considerada a “cirurgia do século” (1). A cirurgia consiste na substituição total da articulação coxo-femoral, formada pela cabeça femoral e cavidade acetabular, por uma prótese (2). É umas das cirurgias eletivas mais comumente realizadas nos Estados Unidos da América (EUA), apresentando bons resultados em relação ao alívio dos sintomas causados pela osteoartrite do quadril (3). No Reino Unido e nos EUA, cerca de 800.000 artroplastias são realizadas anualmente, com estimativa de aumento para acima de 4 milhões até 2030 (4). As projeções para o futuro mostram demanda crescente pela cirurgia primária e pelas cirurgias de revisão de ATQ. Este aumento está relacionado a fatores como: a seleção dos pacientes, o aumento de procedimentos realizados em pacientes jovens ativos e a crescente sobrevida das cirurgias de revisão dos implantes (5). Estima-se que de 2005 a 2030, nos Estados Unidos, haverá crescimento de 174% na demanda por esse procedimento, chegando a 572.000 ATQs primárias, e crescimento de 137% nas ATQs de revisão (6).

As ATQs podem falhar por diversos motivos, frequentemente levando a necessidade de cirurgias

Endereço: Avenida Brasil, nº 500

Bairro: São Cristóvão

CEP: 20.940-070

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2134-5000

Fax: (21)2134-5228

E-mail: cep.into@into.saude.gov.br



INSTITUTO NACIONAL DE
TRAUMATOLOGIA E
ORTOPEDIA JAMIL HADDAD -
INTO



Continuação do Parecer: 3.687.649

de revisão. Recentemente, observou-se que apesar dos avanços, tanto na técnica cirúrgica quanto no design das próteses, as taxas de cirurgias de revisão pós ATQ se mantiveram constantes (7). Estudos mostram que os principais motivos para cirurgias de revisão são a instabilidade (luxação recorrente, correspondendo a 22% dos casos de revisão), soltura asséptica (20%) e infecções (15%) (5,8).

A infecção articular periprotética (IAP) da ATQ é uma das complicações mais graves deste procedimento, podendo ocorrer em qualquer momento após a colocação da prótese. Estima-se que 1% a 3% dos pacientes que se submetem a ATQ desenvolverão IAP (9–11). A revisão da artroplastia apresenta incidência ainda maior de infecção periprotética, de 3,2% a 11,3% (12).

À medida que são realizados um maior número de artroplastias primárias, há um aumento no número de complicações deste procedimento. É relatado que a IAP representa, atualmente, 14,8% das cirurgias de revisões de ATQ, com projeção de aumento nos próximos anos (4).

A presença de IAP requer a adoção de medidas terapêuticas específicas, que vão desde o desbridamento de tecido e retenção do implante até a revisão da ATQ. Dessa forma, o diagnóstico preciso desta condição é de extrema importância uma vez que influencia diretamente na escolha da conduta terapêutica mais adequada (13).

O diagnóstico de IAP pode ser desafiador nos casos em que o paciente não apresenta fístula ativa no local de cirurgia prévia nem sinais clínicos evidentes, como acontece na maior parte das infecções agudas. As manifestações clínicas são bastante variáveis, dependendo da virulência do patógeno, mecanismo de infecção e resposta imune do paciente (14–18). Além disso, a presença de biofilmes bacterianos, um achado comum neste tipo de infecção crônica, também está associada à maior dificuldade no diagnóstico e tratamento (19,20).

Ainda não existe um método diagnóstico padrão ouro que tenha especificidade e sensibilidade suficientes para ser usado isoladamente para o diagnóstico da IAP. O cirurgião ortopédico utiliza um conjunto de parâmetros clínicos, de imagem e laboratoriais para definição desse diagnóstico (14).

A Sociedade internacional de infecção musculoesquelética (MSIS), elaborou um algoritmo com o intuito de fornecer uma definição universal que auxiliasse no diagnóstico da IAP. Tal instrumento é periodicamente revisado à luz dos novos testes clínicos disponíveis e dos resultados de performance reportados em diferentes estudos. Na última revisão, realizada em 2018, foram estabelecidos os seguintes critérios: critérios maiores: presença de fístula ou crescimento bacteriano em duas ou mais culturas microbiológica de líquido sinovial ou tecido periprotético e os critérios menores incluem avaliação de PCR e VHS e D-dímero no plasma, a análise de PCR, alfa

Endereço: Avenida Brasil, nº 500

Bairro: São Cristóvão

CEP: 20.940-070

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2134-5000

Fax: (21)2134-5228

E-mail: cep.into@into.saude.gov.br



INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA JAMIL HADDAD - INTO



Continuação do Parecer: 3.687.649

defensina, esterase leucocitária e contagem de células brancas e polimorfonucleares no líquido sinovial, além da presença de purulência intra-operatória, avaliação histopatológica da membrana periprotética e resultado positivo em uma cultura microbiológica (21)

No primeiro encontro com o paciente, normalmente nos baseamos em fatores de risco, descobertas clínicas e marcadores séricos simples para nos guiar. Na avaliação inicial, queremos que os testes sejam mais sensíveis possíveis, pois diagnosticar erroneamente uma infecção como asséptica poderia levar a resultados devastadores.

Curiosamente, mesmo que o teste sorológico (como uma ferramenta de triagem) seja negativo, o risco de IAP é de 2,5%. Isso enfatiza a importância de um pré-teste de probabilidade, pacientes com alta suspeita clínica baseada no tempo da última cirurgia (<2 anos), número de cirurgias na articulação e achados clínicos positivos, como eritema, taquicardia e redução da amplitude de movimento deve ser investigada para aumentar a sensibilidade neste estágio (22–25). A aspiração sinovial é o próximo passo na investigação. Nos últimos anos numerosos marcadores demonstraram ser altamente sensíveis e específico (26–33). O fato de os pacientes serem submetidos a testes de fluidos já são identificados como tendo um alto risco para IAP, a adição das vantagens de mais conhecimento sobre a análise do fluido sinovial ganhou mais importância nos últimos anos, permitiu ao médico ter acesso a testes com bom desempenho com altas sensibilidade (100%) e especificidade (100%). A maioria dos pacientes será diagnosticada neste estágio.

Quando um diagnóstico definitivo não é feito até esse ponto, os achados intraoperatórios devem ser usados para auxiliar no diagnóstico. Pacientes não diagnosticados como infectados ou assépticos neste momento são geralmente pacientes com punção seca ou uma infecção de baixa virulência na qual o diagnóstico é difícil. Portanto, esta fase detém uma sensibilidade e especificidade relativamente baixa e em 15% dos pacientes que chegam a esse estágio, o diagnóstico não pode ser feito. Estes pacientes são frequentemente encontrados na prática clínica e representam um real desafio diagnóstico. O foco nesse grupo único de pacientes promove a conscientização tanto na prática clínica quanto exige mais pesquisas e novas tecnologias para reduzir o número de pacientes nessa área cinzenta em uma tentativa de melhorar a sensibilidade e especificidade nesses pacientes limítrofes.

De uma forma geral, os testes diagnósticos disponíveis atualmente avaliam dois aspectos principais da infecção: a presença de bactérias e a resposta imunológica deflagrada para combater o patógeno. Em relação a avaliação da resposta imunológica, a importância dos neutrófilos é evidenciado uma vez que a maioria dos testes se baseia na sua quantificação (contagem de PMN

Endereço: Avenida Brasil, nº 500

Bairro: São Cristóvão

CEP: 20.940-070

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2134-5000

Fax: (21)2134-5228

E-mail: cep.into@into.saude.gov.br



Continuação do Parecer: 3.687.649

no líquido sinovial, avaliação histopatológica da membrana periprotética) ou na mensuração de moléculas produzidas por estas células (alfa defensina e esterase leucocitária). Além disso, grande número de artigos recentemente publicado avaliaram o potencial diagnóstico de moléculas produzidas por neutrófilos nas IAPs (34).

Os neutrófilos dispõem de um enorme arsenal de combate a microrganismos, envolvendo a produção de espécies reativas de oxigênio e produção de peptídeos antimicrobianos. Em 2004, Brinkman e colaboradores descreveram um novo mecanismo elicidado por estas células no combate a patógenos, as redes extracelulares de neutrófilos, também chamadas de NETs (do inglês, Neutrophil Extracellular Traps) (35). As NETs são estruturas extracelulares de DNA e histonas liberadas pelos neutrófilos através de um mecanismo ativo e altamente regulado chamado de NETose. Estas redes extracelulares de DNA contêm, além das histonas, diversas enzimas antimicrobianas, como as enzimas mieloperoxidase (MPO), elastase e catepsina G. As NETs são capazes de "prender patógenos", capturando-os e promovendo sua eliminação (35,36) (FIGURA 1).

Figura 1: Figura esquemática de liberação das redes extracelulares de neutrófilos.

Diversos estudos descreveram o papel das NETS no contexto de doenças infecciosas, autoimunes e até mesmo no câncer (37). Em pacientes com tuberculose, inflamações crônicas das vias aéreas, pacientes com trombose e em alguns tipos de cânceres são reportados aumentos destas estruturas no plasma. Além disso, estudos recentes indicam que estas estruturas também participam da resposta imune gerada contra bactérias formadoras de biofilme, o que é de grande interesse no contexto das infecções periprotéticas (38,39).

No campo da ortopedia, há apenas um estudo, avaliando a liberação de NETs no líquido sinovial de pacientes com artrite séptica (40). Este estudo avaliou 42 pacientes, 9 deles com diagnóstico de artrite séptica, sendo reportado aumento significativo destas estruturas no líquido sinovial dos pacientes com artrite infecciosa quando comparado com pacientes com artrite asséptica (3.286 ± 386 vs 1.040 ± 208). Neste trabalho, a liberação de NETs foi avaliada através da quantificação de cell free DNA e MPO.

Um estudo prévio do nosso grupo, avaliou o potencial das NETs no diagnóstico da IAP pós ATQ. Foi observado aumento expressivo das NETs no líquido sinovial (LS) dos pacientes com IAP ($57,787 \text{ ng/mL} \pm 15,057$) em relação ao grupo não infectado ($3,969 \text{ ng/mL} \pm 1,134$, $p < 0,001$). Além disso, após comparação entre a quantificação de NETs e os critérios diagnósticos propostos pela MSIS, encontramos valor de área sobre a curva ROC (receiver operating curve) de 0,948 (IC 95% de

Endereço: Avenida Brasil, nº 500

Bairro: São Cristóvão

CEP: 20.940-070

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2134-5000

Fax: (21)2134-5228

E-mail: cep.into@into.saude.gov.br



Continuação do Parecer: 3.687.649

0,8643 a 1,033). Os valores de sensibilidade e especificidade foram 75% e 100%, respectivamente (artigo em preparação).

No ramo da oncologia, a quantificação das NETs vem sendo estudada como método diagnóstico, na avaliação da agressividade tumoral e como preditor do desenvolvimento de eventos tromboembólicos. Para isso, foram desenvolvidos e avaliados diferentes métodos para investigar o processo de NETose e consequente liberação destas estruturas. Importante salientar que, apesar de serem estruturas em formas de DNA, a simples quantificação desta macromolécula não é suficiente para confirmar o processo de NETose, já que este DNA pode ser oriundo de outras células ou até mesmo de bactérias. Por serem estruturas complexas, as NETs podem ser avaliadas de diversas formas, seja pela quantificação de cell free DNA associado à quantificação de enzimas específicas de neutrófilos (como mieloperoxidase (MPO) e elastase de neutrófilo (NE)), histonas citrulinadas (H3cit), complexo de DNA + histona, complexo DNA + MPO, complexo DNA + NE, entre outros. Contudo, cada método tem suas limitações e vantagens, apresentando diferentes graus de dificuldade na sua execução e diferentes sensibilidades (41).

Nesse sentido, acreditamos que o estudo mais aprofundado da resposta deflagrada por neutrófilos no contexto da IAP, principalmente o processo de liberação das NETs, permitirá uma maior compreensão das particularidades da resposta imune no contexto da IAP, permitindo a identificação de novos marcadores que permitam o diagnóstico e o acompanhamento da evolução desta doença.

2. PRINCIPAIS PROBLEMAS E JUSTIFICATIVA:

A infecção periprotética é uma das consequências mais devastadoras pós artroplastia do quadril. Seu diagnóstico e tratamento ainda são alvo de debate na comunidade médica e científica. Poucos estudos avaliam a resposta imune deflagrada na articulação infectada. Acreditamos que um estudo detalhado desta resposta pode fornecer informações importantes sobre esta doença, revelando potenciais biomarcadores para o correto diagnóstico deste tipo de infecção.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO GERAL - Caracterizar a resposta imune deflagrada por neutrófilos no ambiente articular de pacientes com infecção periprotética pós ATQ, visando a identificação de potenciais

Endereço: Avenida Brasil, nº 500

Bairro: São Cristóvão

CEP: 20.940-070

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2134-5000

Fax: (21)2134-5228

E-mail: cep.into@into.saude.gov.br



Continuação do Parecer: 3.687.649

biomarcadores da IAP.

- ESPECÍFICOS - Descrever as características clínicas e pessoais dos pacientes submetidos à cirurgia de revisão de ATQ.
- Determinar a quantidade de cell free DNA no plasma e no líquido sinovial de pacientes submetidos a cirurgia de revisão de artroplastia de quadril com e sem IAP.
- Determinar, por PCR semi-quantitativo a concentração de DNA de origem humana e de origem bacteriana no líquido sinovial de paciente com infecção periprotética.
- Determinar o perfil imunofenotípico dos neutrófilos do líquido sinovial e do sangue de pacientes com submetidos a cirurgia de revisão de artroplastia de quadril com e sem IAP.
- Avaliar a presença de marcadores do processo de NETose no líquido sinovial e no plasma de pacientes com IAP.
- Determinar o desempenho dos diferentes marcadores do processo de NETose no diagnóstico da IAP.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos adicionais pois o procedimento, segundo os autores, será etapa do procedimento terapêutico já realizado de rotina, como trecho abaixo, ipsi literis

"A coleta de líquido sinovial e dos fragmentos de membrana periprotética e de fragmentos ósseos faz parte da rotina do hospital para o diagnóstico de infecção periprotética. Dessa forma, para este estudo, utilizaremos uma parte do líquido sinovial, rotineiramente coletado, para nossas análises. "

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O referente trabalho é extremamente interessante e de relevância acadêmica

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Estão presentes os termos de apresentação obrigatória

Endereço: Avenida Brasil, nº 500

Bairro: São Cristóvão

CEP: 20.940-070

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2134-5000

Fax: (21)2134-5228

E-mail: cep.into@into.saude.gov.br



INSTITUTO NACIONAL DE
TRAUMATOLOGIA E
ORTOPEDIA JAMIL HADDAD -
INTO



Continuação do Parecer: 3.687.649

Recomendações:

Conforme conclusões

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências

Considerações Finais a critério do CEP:

Senhor pesquisador, de acordo com o constante da Resolução CNS nº 466 de 2012, faz-se necessário apresentar ao CEP/INTO, através da Plataforma Brasil, a cada 06 (seis) meses o relatório de acompanhamento de sua pesquisa. Além disso, após a conclusão da pesquisa, deverá ser submetido na Plataforma Brasil, através da Notificação, o Relatório Final e a pesquisa concluída para apreciação do CEP/INTO.

Informamos que qualquer alteração realizada no protocolo de pesquisa aprovado deverá ser submetida à apreciação do CEP/INTO através do envio de uma emenda utilizando a Plataforma Brasil.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|---|---|------------------------|-------------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1430501.pdf | 22/10/2019 14:12:12 | | Aceito |
| Recurso Anexado pelo Pesquisador | resposta_CEP.docx | 22/10/2019 14:11:37 | Ana Carolina Leal de Oliveira | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE_osamu_mod.docx | 22/10/2019 14:09:56 | Ana Carolina Leal de Oliveira | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | projeto_cep_resposta.docx | 22/10/2019 14:09:41 | Ana Carolina Leal de Oliveira | Aceito |
| Folha de Rosto | Folha_de_rosto_Ana.pdf | 16/09/2019 16:24:51 | Ana Carolina Leal de Oliveira | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores | termo_de_responsabilidade.pdf | 16/09/2019 14:29:24 | Ana Carolina Leal de Oliveira | Aceito |

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Avenida Brasil, nº 500

Bairro: São Cristóvão

CEP: 20.940-070

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2134-5000

Fax: (21)2134-5228

E-mail: cep.into@into.saude.gov.br



INSTITUTO NACIONAL DE
TRAUMATOLOGIA E
ORTOPEDIA JAMIL HADDAD -
INTO



Continuação do Parecer: 3.687.649

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 06 de Novembro de 2019

Assinado por:
Marisa Peter Silva
(Coordenador(a))

Endereço: Avenida Brasil, nº 500

Bairro: São Cristóvão

CEP: 20.940-070

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2134-5000

Fax: (21)2134-5228

E-mail: cep.into@into.saude.gov.br

ANEXO B. Termo de Consentimento Livre Esclarecido



MINISTÉRIO DA SAÚDE
SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA JAMIL HADDAD

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(De acordo com as normas da Resolução do CNS nº 466 de 12/12/2012)

Você está sendo convidado para participar da pesquisa "Caracterização do processo de ativação de neutrófilos e liberação de redes extracelulares de neutrófilos no líquido sinovial de pacientes com infecção periprotética pós artroplastia de quadril."

Você foi selecionado por ter feito uma cirurgia de artroplastia do quadril que agora necessita de uma cirurgia de revisão e sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição. O seu tratamento será o mesmo, esteja você participando ou não deste estudo.

O objetivo deste estudo é estudar a resposta imune gerada na infecção periprotética.

Sua participação nesta pesquisa consistirá em permitir que os pesquisadores coletem informações clínicas, laboratoriais e antropométricas do seu prontuário, além de permitir que uma amostra do líquido que banha a sua articulação, que é normalmente coletada para a realização de exames, seja destinada à pesquisa.

O líquido da articulação será encaminhado para o laboratório de pesquisa no INTO, onde este projeto será realizado. Este estudo não vai interferir com o seu tratamento e o fato de você concordar em participar não traz nenhum risco adicional para você. Os riscos são os mesmos do procedimento cirúrgico a que você será submetido. Os benefícios relacionados com a sua participação são contribuir para o conhecimento sobre a infecção periprotética ajudando, assim, outros pacientes que necessitam da cirurgia de revisão da artroplastia.

As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados da pesquisa serão divulgados de forma a não possibilitar sua identificação. Você será identificado, na pesquisa, apenas por um número de acordo com a ordem de inclusão no estudo e seu nome permanecerá em total sigilo.

Este Termo foi redigido em três vias, sendo uma para o participante, outra para o pesquisador e uma para ser anexada ao prontuário do participante, onde consta o telefone e o endereço do pesquisador principal e do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP. Você poderá esclarecer suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento através dos números dos telefones ou endereço de e-mail disponível neste Termo.

Rio de Janeiro, _____ de _____ de _____

Pesquisador responsável: Osamu Sandes Kimura

Contato com o pesquisador responsável:

Endereço: Avenida Brasil, 500
e-mail: aloliveira@into.saude.gov.br

Telefone: 21345000

Responsável pela aplicação do termo

Folha 1 de 2



MINISTÉRIO DA SAÚDE
SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA JAMIL HADDAD

Em caso de dúvida quanto à condução ética do estudo, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do INTO/MS.

Endereço: Avenida Brasil nº 500, 9º andar – sala nº 4 – São Cristóvão – Rio de Janeiro – RJ
CEP: 20940-070 Tel.: (21) 2134-5000/(21) 2134-5061 e-mail: cep.into@into.saude.gov.br

Declaro que entendi os objetivos e condições de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

Participante da pesquisa:

Prontuário:

Assinatura do participante da pesquisa