



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA MÉDICAS**

**A INFLUÊNCIA DE BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS NA**  
**DOENÇA ÓSSEA DE PAGET**

**MESTRADO**

**Fernanda Vicente da Costa Moresco**

Florianópolis  
2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA MÉDICAS

Fernanda Vicente da Costa Moresco

**A INFLUÊNCIA DE BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS NA  
DOENÇA ÓSSEA DE PAGET**

Dissertação submetida ao programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal de Santa Catarina como pré-requisito para obtenção do Grau de mestre em Ciências Médicas.

ORIENTADORA: Prof. Dra. Tania Silvia Fröde.

Florianópolis  
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Vicente da Costa Moresco, Fernanda  
A INFLUÊNCIA DE BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS NA  
DOENÇA ÓSSEA DE PAGET / Fernanda Vicente da Costa  
Moresco ; orientador, Tania Silvia Fröde, 2018.  
79 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde,  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas-Novo,  
Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Ciências Médicas-Novo. 2. Doença óssea de  
Paget. 3. Citocinas. 4. Mieloperoxidase. 5. Ácido  
zoledrônico. I. Silvia Fröde, Tania. II. Universidade  
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Médicas-Novo. III. Título.

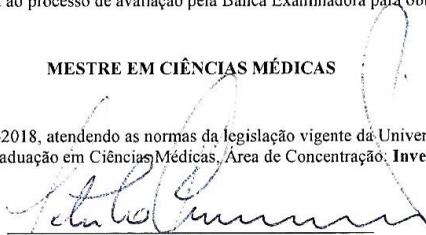
# FERNANDA VICENTE DA COSTA MORESCO

## A influência de biomarcadores inflamatórios na doença de Paget

Esta dissertação foi submetida ao processo de avaliação pela Banca Examinadora para obtenção do título de:

MESTRE EM CIÊNCIAS MÉDICAS

E aprovada em 09 de outubro 2018, atendendo as normas da legislação vigente da Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Área de Concentração: **Investigação Clínica**.

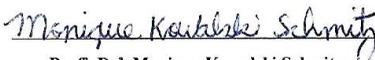


**Prof. Dr. Getúlio Rodrigues de Oliveira Filho**  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas

**Banca Examinadora:**



**Prof. Dr.ª Tânia Silvia Fröde**  
Presidente/Orientador



**Prof. Dr.ª Monique Kowalski Schmitz**  
Membro



**Prof. Dr. Fabrício de Souza Neves**  
Membro

Florianópolis, 2018



## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por todas as oportunidades de aprendizado durante a vida.

À minha família, pelo apoio e compreensão da ausência nos momentos de estudo.

À minha orientadora, Professora Tânia, pela dedicação e paciência na confecção desta pesquisa.

À colega Julia que ajudou com as análises laboratoriais, ao colega Gláucio que sugeriu o tema desta dissertação.



## RESUMO

A etiologia da doença óssea de Paget (DOP) ainda não está completamente elucidada. Os pacientes com DOP podem apresentar alterações nas concentrações de biomarcadores inflamatórios que podem estar relacionados à patogênese da doença. Este estudo foi realizado para avaliar a influência de citocinas pró [interleucinas (IL) IL-2, interferon-gama (IFN- $\gamma$ )], e anti-inflamatórias (IL-4, IL-10), enzimas [mieloperoxidase (MPO), adenosina-desaminase (ADA)], além dos metabólitos do óxido nítrico (NOx) em pacientes com DOP.

**Métodos:** As concentrações séricas da IL-2, IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$ , MPO, ADA e NOx foram realizadas em 53 pacientes com DOP e em 24 controles com osteoartrite. Com o objetivo de estudar a possível relação entre a atividade de doença e as concentrações dos biomarcadores inflamatórios, os pacientes com DOP foram distribuídos em grupos de doença ativa (n = 37) e inativa (n = 16) de acordo com a captação da cintilografia óssea. Neste estudo também foram analisados os mesmos biomarcadores inflamatórios em cinco pacientes com DOP que receberam tratamento com ácido zoledrônico (5 mg), antes e 3 meses após a infusão da medicação. A metodologia utilizada para análise dos biomarcadores foram testes colorimétricos (MPO, ADA e NOx) ou citometria de fluxo (citocinas). As diferenças estatísticas dos biomarcadores inflamatórios (IL-2, IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$ , MPO, ADA e NOx) entre os grupos (pacientes e controles) foram avaliadas pelo teste ANOVA, ou por teste t de Student, quando necessário. Correlações entre variáveis lineares foram analisadas por regressão linear. Mudanças nos biomarcadores inflamatórios, extensão de doença, doença ativa e inativa e o grupo tratado com ácido zoledrônico foram analisados utilizando análise de medidas repetidas. Para todas as análises, foi considerado um nível de significância de 5%.

**Resultados:** Pacientes com DOP apresentaram concentrações séricas elevadas de IL-2 (p = 0,029), e diminuídas de MPO (p < 0,0001), quando comparados ao grupo controle. Análises dos pacientes com doença ativa *versus* inativa revelaram somente concentrações elevadas de MPO nos pacientes com DOP inativa (p = 0,036). Em cinco pacientes que receberam ácido zoledrônico intravenoso foi observada uma redução nas concentrações de IL-2 após o tratamento (p = 0,014).

**Conclusão:** Este trabalho demonstrou que as concentrações elevadas de IL-2, e diminuídas de MPO, podem refletir a ativação do sistema imune e/ou da osteoclastogênese. Além disso, este trabalho sugere também que um dos prováveis mecanismos de ação do ácido zoledrônico possa

ser via redução nas concentrações de IL-2, e isto pode estar relacionado à redução da osteoclastogênese.

**Palavras-chave:** Doença óssea de Paget. Citocinas. Mieloperoxidase. Óxido nítrico. Adenosina desaminase. Ácido zoledrônico.

## ABSTRACT

The etiology of Paget disease of bone (PDB) is not fully elucidated. Patients with PDB could have alterations in levels of inflammatory biomarkers that might be related to the pathogenesis disease. This study was undertaken to evaluate the pro [interleukin (IL) IL-2, interferon-gamma (IFN- $\gamma$ )] and anti-inflammatory cytokines levels, (IL-4, IL-10), enzymes [myeloperoxidase (MPO), adenosine-deaminase (ADA)] beside nitric oxide metabolites (NOx) in patients with PDB.

**Methods:** Serum levels of IL-2, IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$ , MPO, ADA and NOx were measured in 53 patients with PDB and in 24 control subjects with osteoarthritis. To study the possible relation between disease activity and inflammatory biomarker levels, patients with PDB were distributed in active (n = 37) and inactive (n = 16) disease groups according to the bone scintigraphies results. We also compared the inflammatory biomarker levels in five patients with PDB treated with zoledronic acid 5 mg, before and three months after its administration. The colourimetric or cytometry methodologies were employed to analyze: MPO, ADA and NOx or cytokines, respectively. Differences in inflammatory biomarker levels (IL-2, IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$ , MPO, ADA, NOx) between groups (patients and controls) were analyzed using either analysis of variance (ANOVA) or the Student t test, when necessary. Correlations between linear variables were analyzed by linear regression. Changes in inflammatory biomarker levels, disease extension, active and inactive disease, and zoledronic acid treatment were analyzed using a repeated-measures analysis. For all analysis, it was considered an alpha-error of 5%.

**Results:** Patients with PDB presented higher serum levels of IL-2 ( $p = 0.029$ ) and lower levels of MPO compared to control group ( $p < 0.0001$ ). The analysis of patients with active *versus* inactive PDB showed only lower levels of MPO in patients with inactive PDB ( $p = 0.036$ ). In five patients who received zoledronic acid during the study period, we observed a decrease in IL-2 levels after treatment ( $p = 0.014$ ).

**Conclusion:** Our work demonstrated that both higher levels of IL-2 and lower levels of MPO in patients with PDB may reflect the activation of immune system and/or osteoclastogenesis process. In addition, we found that one of the mechanisms of zoledronic acid may be via decreasing IL-

2 levels in PDB, and this effect may be correlated with osteoclastogenesis.

**Key words:** Paget disease of bone. Cytokines. Myeloperoxidase. Nitric oxide. Adenosine-deaminase. Zoledronic acid.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Dosagem de interleucina-2 (IL-2) em indivíduos do grupo controle e em pacientes com doença óssea de Paget 40
- Figura 2** - Dosagem de interleucina-4 (IL-4) em indivíduos do grupo controle e em pacientes com doença óssea de Paget. 41
- Figura 3** - Dosagem de interleucina-10 (IL-10) em indivíduos do grupo controle e em pacientes com doença óssea de Paget 41
- Figura 4** - Dosagem de interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) em indivíduos do grupo controle e em pacientes com doença óssea de Paget 42
- Figura 5** - Dosagem de mieloperoxidase (MPO) em indivíduos do grupo controle e em pacientes com doença óssea de Paget. 42
- Figura 6** - Dosagem de adenosina desaminase (ADA) em indivíduos do grupo controle e em pacientes com doença óssea de Paget. 43
- Figura 7** - Dosagem de metabólitos do óxido nítrico (NO<sub>x</sub>) em indivíduos do grupo controle e em pacientes com doença óssea de Paget. 43



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Grupos de pacientes com doença óssea de Paget avaliados no estudo.	34
Tabela 2 -Dados demográficos dos pacientes com doença óssea de Paget e controles com osteoartrite.	39
Tabela 3 - Comparação dos biomarcadores inflamatórios séricos (IL-2, IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$ , MPO, ADA, NOx) nos pacientes com doença ativa e inativa na cintilografia óssea.	44
Tabela 4 - Comparação dos biomarcadores inflamatórios séricos (IL-2, IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$ , MPO, ADA, NOx) nos pacientes com doença óssea de Paget antes e três meses após o tratamento com ácido zoledrônico.	45



## LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RNA<sub>m</sub></b>	Ácido ribonucleico mensageiro
<b>CTLA-4</b>	Antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico
<b>AR</b>	Artrite reumatóide
<b>ABNT</b>	Associação Brasileira de Normas Técnicas
<b>ADA</b>	Adenosina desaminase
<b>CCS</b>	Centro de Ciências da Saúde
<b>CCL</b>	Citocina quimiotática de monócitos
<b>CEPSH</b>	Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
<b>MHC II</b>	Complexo de histocompatibilidade principal tipo II
<b>CBA</b>	<i>Cytometric bead array</i>
<b>DOP</b>	Doença Óssea de Paget
<b>GTPases</b>	Enzimas ligadoras de guanosina trifosfato
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
<b>TGF-β</b>	Fator de crescimento transformador-beta
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral
<b>TNF-α</b>	Fator de necrose tumoral alfa
<b>TNF-β</b>	Fator de necrose tumoral beta
<b>M-CSF</b>	Fator estimulador de colônias de monócitos
<b>NF-κB</b>	Fator nuclear kappa-B
<b>NUP205</b>	Gene da proteína do complexo de poros nucleares 205
<b>TNFRSF11a</b>	Gene membro da superfamília de receptor de TNF 11a
<b>TNFRSF11b</b>	Gene membro da superfamília de receptor de TNF 11b
<b>SQSTM1</b>	Gene que codifica o Sequestossomo-1
<b>HGCR</b>	Hospital Governador Celso Ramos
<b>IFN-γ</b>	Interferon-gama
<b>IL-1</b>	Interleucina-1
<b>IL-10</b>	Interleucina-10
<b>IL-2</b>	Interleucina-2
<b>IL-4</b>	Interleucina-4
<b>IL-6</b>	Interleucina-6
<b>JNK</b>	Jun N-terminal quinase
<b>LAPI</b>	Laboratório de Pesquisa em Imunologia
<b>PML</b>	Leucemia promielocítica
<b>RANKL</b>	Ligante do receptor ativador do NF-κB
<b>LT</b>	Linfócito T
<b>Th1</b>	Linfócito T helper 1
<b>Th2</b>	Linfócito T helper 2

<b>Treg</b>	Linfócito T regulatório
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>NOx</b>	Metabólitos do óxido nítrico
<b>MPO</b>	Mieloperoxidase
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	Nitrato
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Nitrito
<b>OA</b>	Osteoartrite
<b>OPG</b>	Osteoprotegerina
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NOS</b>	Óxido nítrico sintase
<b>eNOS</b>	Óxido-nítrico sintase endotelial
<b>iNOS</b>	Óxido-nítrico sintase induzida
<b>nNO</b>	Óxido-nítrico sintase neuronal
<b>PDB</b>	<i>Paget bone disease</i>
<b>PTH</b>	Paratormônio
<b>SNP</b>	Polimorfismo de nucleotídeo único
<b>MIP</b>	Proteína inflamatória de macrófagos
<b>p62</b>	Proteína ligadora de ubiquitina p62
<b>p38-MAPK</b>	Proteína quinase ativada p38
<b>ERK</b>	Quinase reguladora do sinal extracelular
<b>PCR</b>	Reação em cadeia de polimerase
<b>RANK</b>	Receptor ativador do NF-κB
<b>STAT-6</b>	Sinal transdutor e ativador da transcrição-6
<b>SPSS</b>	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
<b>Tc-99 MDP</b>	Tecnécio-99 metileno difosfato
<b>TCLE</b>	Termo de Consentimento livre e esclarecido
<b>ATP</b>	Trifosfato de adenosina
<b>UFSC</b>	Universidade Federal de Santa Catarina
<b>HIV</b>	Vírus da imunodeficiência humana

## SUMARIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>20</b>
1.1 A DOENÇA ÓSSEA DE PAGET.....	21
1.2 OSTEOMETABOLISMO E O SISTEMA IMUNE.....	23
1.3 BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS .....	25
<b>2 HIPÓTESES DO ESTUDO</b> .....	<b>29</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>31</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	31
<b>4 CASUÍSTICA E MÉTODOS</b> .....	<b>33</b>
4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	33
4.2 PACIENTES E CONTROLES .....	33
4.3 CRITÉRIOS DE CATEGORIZAÇÃO DOS PACIENTES E CONTROLES .....	34
4.3.1 Critérios de inclusão de pacientes.....	34
4.3.2 Critérios de inclusão de controles.....	34
4.3.3 Critérios de exclusão de pacientes e controles.....	34
4.4 ESTADIAMENTO.....	35
4.5 PROCEDIMENTOS.....	35
4.5.1 Procedimentos para a coleta de dados clínicos .....	35
4.5.2 Análises laboratoriais séricas .....	35
4.5.2.1 Dosagem de citocinas.....	36
4.5.2.2 Dosagem de mieloperoxidase e adenosina desaminase .....	36
4.5.2.3 DOSAGEM DE METABÓLITOS DO ÓXIDO NÍTRICO .....	37
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	37
4.7 CONFLITO DE INTERESSES .....	38
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>39</b>
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>47</b>
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	<b>53</b>
<b>8 REFERENCIAS</b> .....	<b>55</b>
<b>NORMAS ADOTADAS</b> .....	<b>65</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>67</b>



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 A DOENÇA ÓSSEA DE PAGET

A doença óssea de Paget (DOP), descrita pela primeira vez em 1877 por James Paget (PAGET, 1877) é a segunda doença osteometabólica mais comum (ALONSO e col., 2017). Esta é caracterizada por uma desordem crônica no remodelamento ósseo e pode apresentar-se de maneira focal ou multifocal (ALONSO e col., 2017). Os osteoclastos encontram-se aumentados em número e tamanho, e acredita-se que seja a célula primariamente responsável pela doença. O remodelamento ósseo encontra-se desorganizado e o osso formado é predisposto a deformidades e fraturas ósseas (GALSON e ROODMAN, 2014).

A DOP costuma aparecer após os 40 anos de idade e afeta ligeiramente mais os homens do que as mulheres (ALONSO e col., 2017). A distribuição geográfica da doença é desigual, sendo mais comum no oeste da Europa, na Austrália, na Nova Zelândia, nos Estados Unidos, e rara na Ásia, com prevalência de 5,4% no Reino Unido e 0,00028% no Japão (GUDINO e col., 2013). Na América do Sul são descritos focos da doença no Chile e na Argentina (ACOTTO e MAUTALEN, 2001; MAUTALEN e col., 2001). Em Recife, a doença foi encontrada em 53 de 7.752 pacientes atendidos no Centro de Osteoporose do Departamento de Endocrinologia e Diabetes de Pernambuco, resultando numa prevalência local de 6,8 por 1.000 pacientes atendidos na instituição (REIS e col., 2012). Florianópolis é composta principalmente por descendentes europeus e destaca-se por um grande número de casos descritos da doença (CASTRO e col., 2014).

Os fatores genéticos são importantes e contribuem para o desenvolvimento da DOP pois entre 15-40% dos indivíduos com a doença tem um familiar de primeiro grau também acometido (MORALES-PIGA e col., 1995). O principal fator genético implicado na etiologia da DOP é a mutação do gene do Sequestossomo 1 (SQSTM1), descrita em até 40% dos casos familiares e em 10% dos casos esporádicos de DOP (HOCKING e col., 2002; LAURIN e col. 2002; GALSON e ROODMAN, 2014; CUNDY, 2017). O SQSTM1 codifica a proteína ligadora de ubiquitina, também conhecida por p62, que desempenha várias funções celulares, como por exemplo: a participação no estresse oxidativo induzido pela ativação de fatores de

transcrição, como por exemplo, do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) e consequente liberação de citocinas. Este fator de transcrição é importante no processo da osteoclastogênese, na reação bioquímica de ubiquitinação de proteínas que posteriormente serão degradadas, e na formação do autofagossomo e apoptose celular (GALSON e ROODMAN, 2014). O mecanismo responsável pelo início da DOP ainda não está totalmente esclarecido. Há evidências que a alteração no domínio de ligação à ubiquitina da p62 prejudique a função dos osteoclastos, além de aumentar a ativação da via de sinalização celular do NF- $\kappa$ B. Esta via ativa a diferenciação das células precursoras de osteoclastos e a reabsorção óssea (REA e col., 2013; GOODE e col., 2016).

Além do SQSTM1, outras alterações genéticas fora do domínio de ligação da ubiquitina da p62 também foram associadas à DOP, dentre eles citam-se: 1) mutações no gene do fator estimulador de colônia de monócito (M-CSF) que estimula a diferenciação de células precursoras do osteoclasto; gene da optineurina, envolvido na regulação do NF- $\kappa$ B; 2) gene membro da superfamília do receptor do TNF 11a (TNFRSF11A) que codifica o receptor ativador do NF- $\kappa$ B (RANK); 3) gene membro da superfamília do receptor do TNF 11b (TNFRSF11B), que codifica a osteoprotegerina (OPG), importante inibidor da osteoclastogênese; 4) gene da proteína do complexo de poros nucleares 205 (NUP205), uma das principais proteínas que participa na regulação do transporte entre o citoplasma e o núcleo; 5) gene da leucemia promielocítica (PML) envolvido no sinal para a produção e liberação do fator de crescimento transformador-beta (TGF- $\beta$ ) e 6) os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) de alguns destes genes (CHUNG e col., 2010; ALBAGHA e col., 2010; ALONSO e col., 2017).

Alguns fatores ambientais foram descritos como desencadeadores da DOP. Dentre eles, podemos citar a alimentação pobre em cálcio na infância, a deficiência de vitamina D, a exposição a toxinas ambientais como a poluição do ar, viver em zona rural, o contato com animais como o gado, a sobrecarga mecânica do osso afetado e as infecções virais crônicas, como as paramixovirose causadas pelos vírus do sarampo, da cinomose canina e do vírus sincicial respiratório (ALONSO e col., 2017).

A infecção viral persistente parece ser a principal causa ambiental associada à patogênese da DOP, no entanto há controvérsias. Estudos utilizando diferentes metodologias para a detecção do ácido

ribonucleico (RNA) viral reportaram a presença dos vírus sincicial respiratório, do sarampo e do vírus da cinomose canina nas inclusões citoplasmáticas de osteoclastos pagéticos (REBEL e col., 1980; Mills, 1984, GORDON e col., 1992). Por outro lado, outro estudo empregando diferentes técnicas de pesquisa do vírus não obteve os mesmos resultados (HELFRICH e col., 2000). Além disso, recentemente foi demonstrado que os osteoclastos com inclusões do vírus do sarampo foram capazes de interferir no aumento do metabolismo ósseo através do aumento nas concentrações da IL-6, que estimula receptores celulares de acoplamento: Eph em osteoblastos, e Ephrin em osteoclastos. (TERAMACHI e col., 2016). Também já foi sugerido que essas inclusões virais poderiam ser acúmulos de proteínas resultantes do funcionamento anormal do sistema de autofagia celular, à semelhança do que ocorre em doenças neurológicas, como na Doença de Huntington (SIERADZAN e col., 1999).

Aproximadamente 25% dos pacientes com a DOP são totalmente assintomáticos. A grande maioria dos pacientes é diagnosticada incidentalmente por meio de alteração nas concentrações séricas de fosfatase alcalina ou de radiografias solicitadas por dor óssea, o principal sintoma. A doença acomete mais frequentemente o esqueleto axial: a pelve é o osso mais acometido, seguido da coluna, fêmur e tíbia, e pode estar limitada a um único osso (forma monostótica) ou a vários ossos (forma poliostótica). As complicações da doença, e também alguns de seus sintomas, são decorrentes do local do crescimento ósseo e podem causar osteoartrite, surdez, compressões nervosas, além de fraturas decorrentes da fragilidade óssea, deformidades ósseas, hipervascularização óssea, hipercalcemia e hipercalciúria em pacientes imobilizados e/ou acamados e transformação sarcomatosa (ALONSO e col., 2017; CUNDY, 2017).

## 1.2 OSTEOMETABOLISMO E O SISTEMA IMUNE

O remodelamento ósseo que ocorre normalmente durante a vida objetiva prevenir o acúmulo de microdanos e manter a qualidade do esqueleto. As células que participam deste processo são os osteoclastos, que se originam a partir de monócitos na medula óssea, e os osteoblastos, cuja origem são as células mesenquimais pluripotentes (KATSIMBRI, 2017). As funções destas células estão interligadas de maneira que os osteoclastos removem o osso, migram para longe do

sítio de remodelamento e sofrem apoptose. Os osteoblastos, então, iniciam a deposição do osteóide, e posteriormente algumas destas células permanecem no local e diferenciam-se em osteócitos (VAN'T HOF e RALSTON, 2001; KATSIMBRI, 2017). Os osteócitos conectam-se entre si e com as células ósseas do periósteo através de longos canais citoplasmáticos, e desempenham papel mecanosensor com estimulação da remodelação óssea para reparação de microdanos, além da função endócrina com efeito estimulatório ou inibitório sobre a ação do osteoblasto (VAN'T HOF e RALSTON, 2001; KATSIMBRI, 2017).

A participação do sistema imune no tecido ósseo tem sido bastante estudada nos últimos anos e ficou mais clara após a descoberta do RANK e, principalmente, do seu ligante (RANKL). O RANKL é produzido por osteoblastos, por células da medula óssea e por linfócitos T (LT) ativados, e faz parte da superfamília do fator de necrose tumoral (TNF). A osteoprotegerina (OPG) é um receptor codificador solúvel do RANK, produzida por células hematopoiéticas, linfócitos B e por osteoblastos. A OPG juntamente com o RANKL e o RANK, regula o osteometabolismo. Assim, o RANKL liga-se ao seu receptor RANK, expresso nos osteoclastos e seus precursores, e inicia a diferenciação celular em direção ao osteoclasto ativo, responsável pela reabsorção óssea. A OPG liga-se ao mesmo receptor para inibir este processo (PACIFICI, 2010).

O remodelamento ósseo normal é regulado por hormônios e mediadores liberados em nível local, dentre eles citam-se: paratormônio (PTH), 1,25-hidroxi-vitamina D3, hormônios sexuais (androgênio e estrogênio), calcitonina, óxido nítrico (NO), prostaglandinas, fatores de crescimento e citocinas inflamatórias como o TNF-alfa (TNF- $\alpha$ ). (VAN'T HOF e RALSTON, 2001; KATSIMBRI, 2017). Esta citocina promove um desequilíbrio no osteometabolismo em favor da osteoclastogênese pois ativa a via de sinalização do RANKL e do M-CSF (PACIFICI, 2010).

Além disso, outros biomarcadores inflamatórios que participam do osteometabolismo, na homeostase e na inflamação, tem sido estudados em modelos *in vitro* e *in vivo*.

### 1.3 BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS

O estudo dos biomarcadores inflamatórios, como citocinas e enzimas, pode ajudar na elucidação da fisiopatologia da DOP. O RANKL representa a relação intrínseca entre o metabolismo ósseo e o sistema imune, pois esta proteína liberada pelo LT atua na ativação da osteoclastogênese. Além disso, o osteoclasto interage com LT através do receptor do Complexo de Histocompatibilidade Principal tipo II (MHC II). A comunicação do osteoclasto através do seu receptor co-estimulatório CD80/86 com o receptor antígeno-4 associado ao linfócito T citotóxico (CTLA-4) do linfócito T regulatório (Treg) pode inibir o processo de reabsorção óssea, além de promover a apoptose do osteoclasto (CURFS e col., 1997; ZAISS e col., 2007; GRASSI e col., 2011; BOZEC e col., 2014). Outrossim, o osteoclasto é capaz de inibir o LT através da liberação de quimiocinas, como as citocinas quimiotáticas de monócitos (CCL) e proteínas inflamatórias dos macrófagos (MIP) (GRASSI e col., 2011).

As citocinas são mediadores importantes para manter a homeostasia celular e exercem seu papel por uma cascata coordenada de ativação de vias de sinalização e interação com diversos receptores celulares. Uma célula raramente é exposta a somente uma citocina, mas a uma combinação delas, resultando num efeito inibitório, estimulatório ou de sinergismo (GABAY e KURSHNER, 1999).

A interleucina (IL) -2 é produzida por linfócitos T helper 1 (Th1) e promove o crescimento e a diferenciação de linfócitos B e T, a sobrevivência e o desenvolvimento de Treg, além de induzir a proliferação de linfócitos T helper 2 (Th2) para produção de IL-4, entre outras funções (CURFS e col., 1997). No metabolismo ósseo, as evidências apontam que a IL-2 pode contribuir para a ativação da osteoclastogênese (RIES e col., 1989; BOZEC e ZAISS, 2017).

A IL-4, produzida por Th2, possui diferentes efeitos: 1) suprime a atividade pró-inflamatória do monócito ao diminuir a produção de IL-1 e TNF- $\alpha$ , 2) inibe diretamente a diferenciação dos precursores do osteoclasto por inibição da expressão do RANK, RANKL, e das vias de sinalização intracelulares, entre elas a do NF-kB, e 3) promove o aumento da OPG por uma via dependente de sinais transdutores e ativadores do fator de transcrição de linfócitos (STAT), como o STAT-6 (CURFS e col., 1997; PALMQVIST e col., 2006; PACIFICI, 2010; ZHAO e IVASHKIV, 2011). Esta citocina também inibe indiretamente a osteoclastogênese através da ativação de LT por um mecanismo ainda desconhecido (MIROSAVLJEVIC e col., 2003).

A IL-10 é uma potente citocina anti-inflamatória produzida pelos linfócitos B e T, células dendríticas, linfócitos-gama-delta, células natural-killer, mastócitos, neutrófilos, eosinófilos e queratinócitos. Esta citocina possui várias funções: suprime a inflamação e a autoimunidade por ação direta ou indireta na ativação da imunidade inata e adaptativa, além de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, a apresentação de antígenos e a proliferação celular (SAXENA e col., 2015). A IL-10 é capaz de inibir diretamente a proliferação de LT por suprimir a produção de IL-2. Por outro lado, sua ação na resposta imune humoral é estimular a proliferação e a diferenciação de linfócitos B e a produção de anticorpos (SAXENA e col., 2015). No tecido ósseo, em estudos *in vivo* em ratos e *in vitro* com osteoclastos derivados de monócitos humanos, a IL-10 inibiu a osteoclastogênese através da supressão do RANKL e do aumento na expressão da OPG (SASAKI e col., 2000; PARK-MIN e col., 2009). Entretanto, um estudo realizado em pacientes que evoluíram com rejeição à prótese de quadril sugeriu a participação desta citocina na ativação da osteoclastogênese (WANG e col., 2010).

O interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) ainda tem papel controverso no metabolismo ósseo, embora sua importância na defesa do organismo contra patógenos intracelulares já seja bem documentada (SCHOENBORN e WILSON, 2007; TAKAYANAGI e col., 2000; GAO e col., 2007). Experimentos *in vitro* demonstraram que o IFN- $\gamma$  inibiu a reabsorção óssea (TAKAYANAGI e col., 2000). Porém um estudo *in vivo*, em animais e em humanos, reportou a estimulação da reabsorção óssea por esta citocina, assim como já foi observada a normalização da osteoclastogênese após a administração endovenosa de IFN- $\gamma$  em pacientes com osteopetrose, uma doença que afeta o osteoclasto e prejudica a reabsorção óssea normal (KEY e col., 1995; PACIFICI, 2010).

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima que contém a partícula heme, de propriedades pró-oxidativas, que atua no processo inflamatório e na defesa do organismo contra patógenos. (VEEN e col., 2009). Esta enzima é produzida por promielócitos e prómonócitos durante o processo de mielopoiese na medula óssea, e pode ser encontrada em neutrófilos e em menor quantidade nos monócitos (VEEN e col., 2009). A MPO que é liberada em locais onde ocorre a lesão tecidual promove a migração e a infiltração de leucócitos no local da reação inflamatória, induz a atividade citotóxica celular, além de promover a atividade fagocitária de macrófagos com liberação de citocinas do tipo TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (VEEN e col., 2009). Também já foi documentada a participação da MPO na biossíntese da matriz

extracelular, em fibroblastos, na angiogênese e também na função dos osteoblastos e osteoclastos favorecendo a neoformação óssea (DENICHILO e col., 2015; PANAGOPOULOS e col., 2015; DENICHILO e col., 2016; PANAGOPOULOS e col., 2017).

A adenosina é um outro mediador produzido a partir da hidrólise do nucleotídeo adenina no ambiente intra e extracelular, e tem suas concentrações reguladas pela ação da enzima adenosina desaminase (ADA), que a degrada em inosina. A adenosina tem ação local através da ativação de seus receptores inibitórios ( $A_1$  e  $A_3$ ) ou estimulatórios ( $A_{2A}$  e  $A_{2B}$ ) na regulação da condução cardíaca, da pressão arterial e da motilidade intestinal (STRAZZULLA e CRONSTEIN, 2016). Em 1995, foi observado, em experimentos *in vitro*, que o trifosfato de adenosina (ATP) e a adenosina estimularam a proliferação de osteoblastos murinos no processo de reparo de fratura óssea, embora a opinião dos autores seja de que o ATP tenha sido o responsável pelos achados (SHIMEGI, 1995). Atualmente, sabe-se que os receptores da adenosina estão presentes também nos osteoclastos e nas suas células precursoras, porém suas funções não estão completamente elucidadas (STRAZZULLA e CRONSTEIN, 2016; MEDIERO e CRONSTEIN, 2013). Em condições de estresse metabólico e morte ou apoptose celular, uma grande quantidade de nucleotídeos, incluindo a adenosina, é liberada no meio extracelular, gerando seu acúmulo e ativação de seus receptores (MEDIERO e CRONSTEIN, 2013).

No osteoblasto, os receptores de adenosina ainda não tem função bem estabelecida. O receptor  $A_1$  parece ter uma função na estimulação da diferenciação de adipócitos, mas não nos osteoblastos, apesar da comum origem mesenquimal dessas células. Já a estimulação dos receptores  $A_{2A}$  e  $A_3$  pode resultar na proliferação e no aumento da função dos osteoblastos, respectivamente (MEDIERO e CRONSTEIN, 2013; STRAZZULLA e CRONSTEIN, 2016). No osteoclasto, o receptor  $A_1$  está ativado de maneira constitutiva e participa na ativação da via de sinalização do NF- $\kappa$ B induzido pelo RANK, fundamental na ativação da osteoclastogênese. Já o receptor  $A_{2A}$  inibe esta via de sinalização, pois aumenta a expressão da OPG pelos osteoblastos, e reduz a expressão do RANK. Em relação aos outros receptores, pouco se sabe sobre o seu desempenho na diferenciação dos osteoclastos (STRAZZULLA e CRONSTEIN, 2016).

O óxido nítrico (NO) é mais um dos importantes mediadores inflamatórios. É gerado pela ativação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) e possui três isoformas: a endotelial (eNOS), a neuronal (nNOS) e a induzida (iNOS). A eNOS e a nNOS são expressas de forma constitutiva e produzem o NO em baixas concentrações. Já a iNOS é ativada por vários estímulos, como as citocinas pró-inflamatórias (IL-1, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ), e é inibida por glicocorticóides, citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ ) e pela OPG (VAN'T HOF e RALSTON, 2001; ZHENG e col., 2006). A eNOS é expressa nas células estromais da medula óssea, osteoblastos, osteoclastos e osteócitos, enquanto que a nNOS é expressa no periósteo e nos osteócitos. A iNOS, encontrada no osso fetal e no adulto, é estimulada por citocinas pró-inflamatórias e endotoxinas (VAN'T HOF e RALSTON, 2001; SAURA e col., 2010, KLEIN-NULEND e col., 2014). Apesar da controversa ação do NO no metabolismo ósseo, recentemente foi demonstrada sua ação favorecendo a formação óssea (VAN'T HOF e RALSTON, 2001). Foi desenvolvida uma molécula doadora de NO ligada a um radical derivado da vitamina B12, chamada cobinamida nitrosilada. O estudo, realizado em ratas com osteoporose pós-ovariectomia, demonstrou uma resposta que favorece a formação óssea pois aumentou a atividade do osteoblasto e inibiu a diferenciação do osteoclasto, sendo considerada um agente promissor no tratamento da osteoporose (KALYANARAMAN e col., 2016).

## 2 HIPÓTESES DO ESTUDO

H0: Não há diferenças estatisticamente significativas na concentração sérica dos biomarcadores inflamatórios (IL-2 -IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$ , MPO, ADA e NOx) entre: 1) o grupo de pacientes com doença óssea de Paget *versus* grupo controle (pacientes com osteoartrite, 2) grupo de pacientes com doença ativa *versus* inativa, e 3) grupo de pacientes com DOP avaliados antes e 3 meses após o tratamento com ácido zoledrônico (5 mg).

H1: Há diferenças estatisticamente significativas na concentração sérica dos biomarcadores inflamatórios (IL-2 -IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$ , MPO, ADA e NOx) entre: 1) o grupo de pacientes com doença óssea de Paget *versus* grupo controle (pacientes com osteoartrite, 2) grupo de pacientes com doença ativa *versus* inativa, e 3) grupo de pacientes com DOP avaliados antes e 3 meses após o tratamento com ácido zoledrônico (5 mg).



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Medir a concentração sérica dos biomarcadores inflamatórios (IL-2, IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$ , MPO, ADA e NOx) em pacientes com doença óssea de Paget (DOP).

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Medir a concentração sérica dos biomarcadores inflamatórios: IL-2, IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$ , MPO, ADA NOx em pacientes com DOP comparando-se com grupo controle;

2) Medir a concentração sérica dos biomarcadores inflamatórios: IL-2, IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$ , MPO, ADA e NOx em pacientes com DOP com doença ativa *versus* doença inativa;

3) Medir a concentração sérica dos biomarcadores inflamatórios: IL-2, IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$ , MPO, ADA NOx em pacientes com DOP antes e 3 meses após o tratamento com ácido zoledrônico.



## 4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

O estudo foi projetado de acordo com as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos (resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CEPSH-UFSC) sob o número 51747315.3.0000.0121 (anexo 1). Todos os participantes do estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (anexo 2).

### 4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Estudo observacional, analítico e transversal.

### 4.2 PACIENTES E CONTROLES

Neste estudo foram analisados os pacientes com DOP ( $n = 73$ ) em seguimento no ambulatório de doenças osteometabólicas do Hospital Governador Celso Ramos (HGCR). Foram excluídos 20 pacientes, resultando numa amostra de 53 pacientes com DOP. Os pacientes com osteoartrite (OA) que compuseram o grupo controle ( $n = 24$ ) foram alocados a partir do ambulatório do mesmo hospital.

Os pacientes foram distribuídos em grupos de acordo com a atividade da doença em: ativos ( $n = 23$ ) e inativos ( $n = 16$ ). A atividade da DOP foi analisada através de cintilografia óssea com tecnécio-99 metileno-difosfato (Tc-99 MDP). Neste estudo foram considerados com doença ativa os pacientes cuja cintilografia óssea apresentou hipercaptação sugestiva de DOP. Os pacientes com captação residual na cintilografia óssea foram considerados como tendo a doença ativa ( $n = 14$ ). O diagnóstico diferencial foi realizado através de exames de imagens adicionais (radiografias e/ou tomografia computadorizada) (tabela 1).

Cinco pacientes com doença ativa que receberam tratamento com ácido zoledrônico (5 mg) por via endovenosa durante o período do estudo, tiveram seu sangue coletado antes e três meses após o tratamento (tabela 1). Este período foi escolhido para evitar reações de fase aguda da medicação (ROELOFS e col., 2010).

Tabela 1 - Grupos de pacientes com doença óssea de Paget avaliados no estudo.

<b>Grupos</b>	<b>Crítérios</b>	<b>n</b>
<b>Pacientes com doença ativa</b>	Hiper captação ou captação residual do radioisótopo à cintilografia óssea	37
<b>Pacientes com doença inativa</b>	Ausência de captação do radioisótopo à cintilografia óssea	16
<b>Pacientes tratados com ácido zoledrônico</b>	Pacientes com doença ativa que receberam tratamento durante o período do estudo	5

### 4.3 CRITÉRIOS DE CATEGORIZAÇÃO DOS PACIENTES E CONTROLES

#### 4.3.1 Critérios de inclusão de pacientes

Pacientes com DOP diagnosticada por alterações radiológicas típicas da doença, que incluem: aumento da densidade óssea, aumento do volume ósseo, deformidade óssea, espessamento da cortical óssea, aumento do trabeculado ósseo (COOPER e col., 2006), maiores de 18 anos, que permitiram a utilização de seus dados para as atividades de pesquisa após a leitura e assinatura do TCLE.

#### 4.3.2 Critérios de inclusão de controles

Indivíduos com OA diagnosticado por sintomas de dor e alterações típicas em exames de imagem, incluindo esclerose óssea subcondral, osteófitos, cistos periarticulares e estreitamento assimétrico do espaço articular (DIEPPE e col., 1998), maiores de 18 anos e que permitiram a utilização de seus dados para as atividades de pesquisa após a leitura e assinatura do TCLE.

#### 4.3.3 Critérios de exclusão de pacientes e controles

Foram excluídos do estudo:

- Pacientes incapazes de compreender os termos do TCLE;
- Portadores de doenças infecciosas bacterianas, virais e/ou fúngicas em atividade;
- Portadores de infecções virais crônicas, incluindo infecções por hepatite B, hepatite C e vírus da imunodeficiência humana (HIV);
- Portadores de doenças neoplásicas;
- Portadores de doenças inflamatórias sistêmicas;

- Portadores de OA erosiva;
- Pacientes que utilizaram medicamentos imunossupressores, anticorpos monoclonais ou imunoglobulina endovenosa nos últimos três meses;
- Pacientes em uso de corticoterapia ou anti-inflamatórios não-esteroidais nos últimos 30 dias;
- Pacientes que utilizaram rituximabe ou imunoglobulina anti-timocítica nos últimos 12 meses;
- Portadores de outras doenças ósseas metabólicas e/ou doenças que alterem o metabolismo ósseo, incluindo hiperparatiroidismo, hipotiroidismo, insuficiência de vitamina D, insuficiência renal crônica, acidose metabólica e alteração nas concentrações séricas de cálcio, fósforo e magnésio.
- Portadores de diabetes mellitus ou de síndrome plurimetabólica.

#### 4.4 ESTADIAMENTO

A extensão do acometimento foi determinada pela análise das imagens digitalizadas de cintilografia ósseas utilizando o índice descrito por Meunier e col. (1987), e através de radiografias. Todos os achados das cintilografias ósseas foram confirmados por radiografias e, caso necessário, por tomografia computadorizada (resultados não mostrados).

#### 4.5 PROCEDIMENTOS

##### 4.5.1 Procedimentos para a coleta de dados clínicos

Os dados relativos a sintomas pregressos e atuais, duração da doença, complicações, comorbidades, medicamentos utilizados atual e previamente, ascendência e história familiar foram colhidos através de questionário e da análise do prontuário (anexo 3).

##### 4.5.2 Análises laboratoriais séricas

Neste protocolo foram coletados 10 ml de sangue total sem anticoagulante dos pacientes com DOP e dos indivíduos do grupo controle. As amostras de sangue foram centrifugadas a 2500 rotações por minuto (rpm) durante dez minutos, separou-se o soro, e as amostras foram armazenadas em freezer com temperatura  $-80^{\circ}\text{C}$ , para posterior

análise das concentrações séricas dos seguintes biomarcadores da inflamação: IL-2, IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$ , MPO, ADA e NOx.

#### 4.5.2.1 Dosagem de citocinas

As amostras de sangue dos pacientes com DOP e dos controles com OA foram utilizadas para as dosagens séricas das citocinas: IL-2, IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$  no Laboratório de Pesquisa em Imunologia (LAPI) / Centro de Ciências da Saúde (CCS) / UFSC. Neste protocolo foi utilizada a técnica de citometria de fluxo, conhecida por *Cytometric bead array* (CBA) em Citômetro de Fluxo BD FACSVers<sup>®</sup> (BD Biosciences, São Jose, CA, EUA) e utilizou-se o kit comercial CBA *Human Th1/Th2 Cytokine Kit*. O CBA emprega uma série de partículas com intensidades distintas de fluorescência para detectar simultaneamente múltiplos elementos solúveis. Estas determinações foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante. Os dados foram analisados com o programa FCAP Array<sup>TM</sup>. Curvas-padrão com concentrações conhecidas das citocinas tiveram suas densidades óticas determinadas, o que permitiu a quantificação dos valores desconhecidos com o auxílio da equação da reta.

Os limites de detecção das citocinas mensuradas foram: 2,60 pg/ml para IL-2, 4,90 pg/ml para IL-4, 4,50 pg/ml para IL-10 e 3,70 pg/ml para IFN- $\gamma$ . Os resultados foram expressos em pg/ml.

#### 4.5.2.2 Dosagem de mieloperoxidase e adenosina desaminase

As amostras de sangue de pacientes com DOP e do grupo controle foram utilizadas para as dosagens séricas das enzimas MPO e ADA no LAPI/CCS/UFSC, de acordo com as metodologias descritas por Rao e col. (1993) e Giusti e Galanti (1984). Curva-padrão com concentrações conhecidas de neutrófilos humanos para MPO, e de um padrão específico para ADA, tiveram suas densidades óticas determinadas por meio de ensaios colorimétricos, analisados em leitor de placas ELISA, em comprimentos de onda de 450 nm para a MPO e de 630 nm para a ADA (Organon Technica, Roseland, New Jersey, USA). Os resultados foram obtidos por meio de interpolação de uma curva-padrão: para a MPO, a partir de um padrão de concentração de neutrófilos humanos (0.7–140mU/ml), e para a ADA, foi utilizado a média de triplicata dos resultados de uma solução padrão com sulfato de

amônio 20U/L. Os resultados foram expressos em mU/ml para a MPO, e U/L para a ADA.

#### 4.5.2.3 Dosagem de metabólitos do óxido nítrico

As amostras de sangue dos pacientes com DOP e dos controles com osteoartrite foram utilizadas para a dosagem sérica dos metabólitos do NO [nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e nitrato ( $\text{NO}_3^-$ )], no LAPI/CCS/UFSC, de acordo com o método descrito por Griess (GREEN e col., 1982).

As concentrações de  $\text{NO}_2^-$  e  $\text{NO}_3^-$  foram realizadas por análise colorimétrica em placa de ELISA, em comprimento de onda de 540 nm, (Organon Tecknika, Roseland, NJ, USA), o que permitiu a quantificação dos valores desconhecidos com o auxílio da equação da reta utilizando-se como curva padrão diferentes concentrações de nitrito de sódio (0–150  $\mu\text{M}$ ). Os resultados foram expressos em  $\mu\text{M}$ .

## 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis nominais foram expressas por frequência.

As variáveis simétricas quantitativas foram expressas por média (desvio-padrão da média), e as variáveis categóricas por percentuais.

O teste de Shapiro-Wilks foi utilizado para avaliar a normalidade dos dados.

As diferenças estatísticas dos biomarcadores inflamatórios (IL-2, IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$ , MPO, ADA e NOx) entre os grupos (pacientes e controles) foram avaliadas pelo teste ANOVA de uma via, ou por teste t de Student, quando necessário.

Correlações entre variáveis lineares foram analisadas por regressão linear.

Mudanças nas concentrações dos biomarcadores inflamatórios, extensão de doença, doença ativa e inativa e no grupo tratado com ácido zoledrônico foram analisados utilizando modelo linear genérico para medidas repetidas.

A análise estatística foi realizada com o programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS 18.0). Para todas as análises, foi considerado significância estatística de 5%.

#### 4.7 CONFLITO DE INTERESSES

A coordenadora bem como a equipe do projeto de pesquisa declaram não haver conflito de interesse.

## 5 RESULTADOS

Neste estudo foram incluídos 53 pacientes, 71,7% (38) mulheres, com média de idade de  $66,9 \pm 8,5$  anos, e 24 controles, 83,3% (20) mulheres, com média de idade de  $62,4 \pm 6,9$  anos. As características demográficas entre os grupos de pacientes e os controles foi similar. Cinquenta e um (96,2%) pacientes eram brancos e 37 (69,8%) apresentaram doença ativa ou residual na cintilografia óssea (Tabela 2).

Tabela 2 - Dados demográficos dos pacientes com doença óssea de Paget e controles com osteoartrite.

	<b>Controles (n = 24)</b>	<b>Pacientes (n = 53)</b>	<b>P</b>
<b>Idade</b>			
Média $\pm$ desvio padrão (anos)	$62,4 \pm 6,9$	$66,9 \pm 8,5$	0,351
<b>Sexo: (n)</b>			
Mulheres	83,3% (20)	71,7% (38)	0,273
Homens	16,7% (4)	28,3% (15)	
<b>Cor: (n)</b>			
Branco	-	96,2% (51)	-
Negro	-	1,9% (1)	-
Amarelo	-	0	-
Pardo	-	1,9% (1)	-
<b>Tempo de diagnóstico</b>			
média $\pm$ desvio padrão (anos)	-	$9,7 \pm 13,7$	-
<b>Atividade na cintilografia óssea</b>			
Inativos	-	30,2% (16)	-
Ativos	-	69,8% (37)	-
<b>Forma</b>			
Monostótica	-	32,1% (17)	-
Polioestótica	-	67,9% (36)	-

Os dados foram expressos por média (desvio padrão da média) e percentuais. As variáveis nominais foram expressas por frequência.  $P < 0,05$ .

Os pacientes com DOP apresentaram maiores concentrações de IL-2 ( $p = 0,029$ ), e menores de MPO ( $p < 0,0001$ ), quando comparados ao grupo controle (Figuras 1 e 5). Diferenças nas concentrações de IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$ , ADA e NOx (Figuras 2, 3, 4, 6 e 7) não apresentaram significância estatística entre os grupos estudados ( $p > 0,05$ ). Não foram encontradas correlações entre as concentrações de IL-2 ou MPO e extensão de doença ( $p > 0,05$ ).

Figura 1 - Dosagem de interleucina-2 (IL-2) em indivíduos do grupo controle ( $n = 24$ ) e em pacientes com doença óssea de Paget ( $n = 53$ ). Cada ponto representa o resultado de um paciente. As linhas representam a média e o desvio-padrão. (ANOVA).

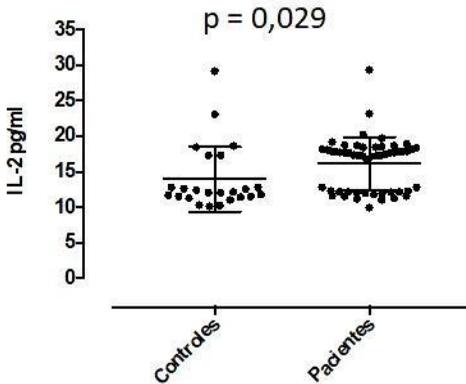


Figura 2 - Dosagem de interleucina-4 (IL-4) em indivíduos do grupo controle (n = 24) e em pacientes com doença óssea de Paget (n = 53). Cada ponto representa o resultado de um paciente. As linhas representam a média e o desvio-padrão. (ANOVA).

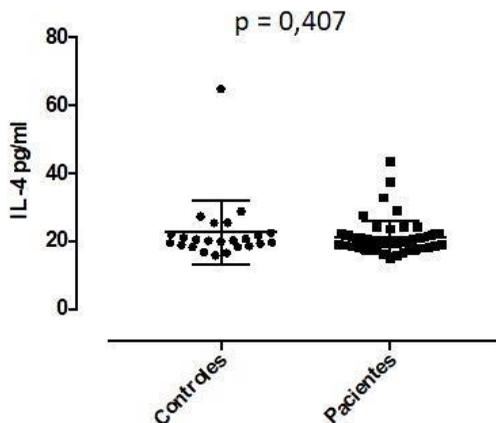


Figura 3 - Dosagem de interleucina-10 (IL-10) em indivíduos do grupo controle (n = 24) e em pacientes com doença óssea de Paget (n = 53). Cada ponto representa o resultado de um paciente. As linhas representam a média e o desvio-padrão. (ANOVA).

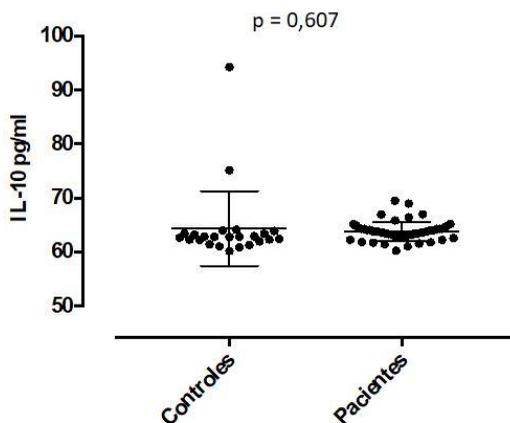


Figura 4 - Dosagem de interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) em indivíduos do grupo controle (n = 24) e em pacientes com doença óssea de Paget (n = 53). Cada ponto representa o resultado de um paciente. As linhas representam a média e o desvio-padrão. (ANOVA).

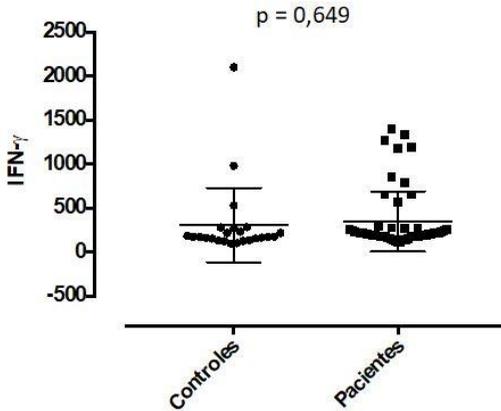


Figura 5 - Dosagem de mieloperoxidase (MPO) em indivíduos do grupo controle (n = 24) e em pacientes com doença óssea de Paget (n = 53). Cada ponto representa o resultado de um paciente. As linhas representam a média e o desvio-padrão. (ANOVA).

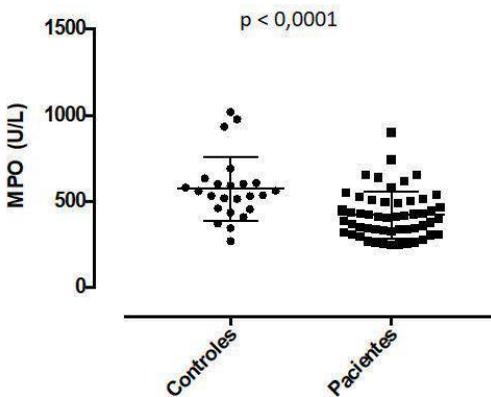


Figura 6 - Dosagem de adenosina desaminase (ADA) em indivíduos do grupo controle (n = 24) e em pacientes com doença óssea de Paget (n = 53). Cada ponto representa o resultado de um paciente. As linhas representam a média e o desvio-padrão. (ANOVA).

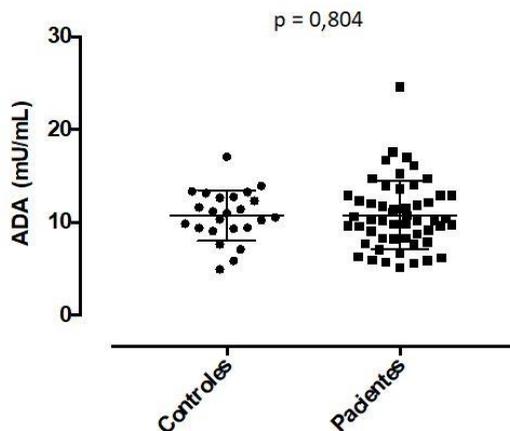
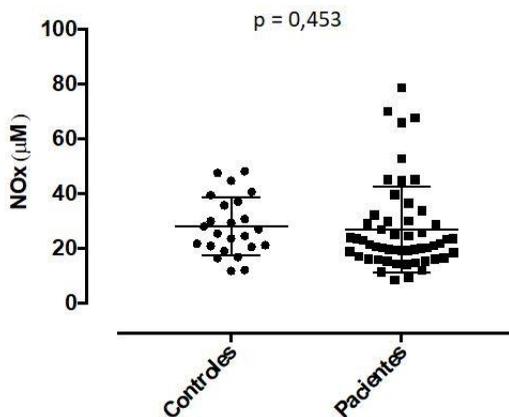


Figura 7 - Dosagem de metabólitos do óxido nítrico (NOx) em indivíduos do grupo controle (n = 24) e em pacientes com doença óssea de Paget (n = 53). Cada ponto representa o resultado de um paciente. As linhas representam a média e o desvio-padrão da média. (ANOVA).



Para melhor avaliar a possível interferência dos biomarcadores inflamatórios na DOP, os pacientes foram distribuídos em dois grupos de acordo com a atividade da doença: ativa *versus* inativa. Os pacientes com DOP inativa apresentaram concentrações séricas elevadas de MPO ( $p = 0,036$ ) comparados àqueles com doença ativa, e os outros biomarcadores inflamatórios não apresentaram diferença estatística (Tabela 3).

As concentrações de fosfatase alcalina óssea foram maiores nos pacientes com DOP ativa *versus* inativa ( $p = 0,017$ ), assim como suas maiores concentrações correlacionaram-se com a maior extensão da doença ( $r = 0,015$ ,  $p < 0,0001$ ). (CASTRO e col., 2014).

Tabela 3 - Comparação dos biomarcadores inflamatórios séricos (IL-2, IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$ , MPO, ADA, NOx) nos pacientes com doença óssea de Paget ativa *versus* inativa.

Captação de Tc-99 na cintilografia óssea dos pacientes com DOP			
Biomarcadores	Doença inativa (n = 16) Média (DP)	Doença ativa (n = 37) Média (DP)	P
IL-2 (pg/ml)	15,56 (3,28)	16,42 (3,90)	0,445
IL-4(pg/ml)	20,11 (2,13)	21,78 (5,73)	0,264
IL-10 (pg/ml)	63,67 (1,51)	63,91 (1,82)	0,648
IFN- $\gamma$ (pg/ml)	264,73 (185,15)	382,13 (386,55)	0,254
MPO (mU/ml)	480,47 (175,61)	395,05 (109,37)	<b>0,036</b>
ADA (U/L)	11,32 (2,72)	10,56 (4,05)	0,497
NOx ( $\mu$ M)	32,58 (18,95)	24,30 (13,72)	0,079

Resultados são apresentados em média e desvio-padrão. DOP: doença óssea de Paget, Tc-99: tecnécio-99: cintilografia, IL-2: interleucina-2, IL-4: interleucina -4, IL-10: interleucina -10, IFN-  $\gamma$ : interferon-gama, MPO: mieloperoxidase, ADA: adenosina desaminase, NOx: metabolitos do óxido nítrico. (Análise de medidas repetidas).  $P < 0,05$ .

Em cinco pacientes com DOP ativa que receberam tratamento com ácido zoledrônico, as concentrações dos biomarcadores inflamatórios foram mensuradas antes e três meses após o tratamento (tabela 4). Somente as concentrações de IL-2 foram significativamente reduzidas após o tratamento ( $p = 0,014$ ).

Tabela 4: Comparação dos biomarcadores inflamatórios séricos (IL-2, IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$ , MPO, ADA, NOx) nos pacientes com doença óssea de Paget antes e três meses após o tratamento com ácido zoledrônico.

<b>Biomarcadores</b>	<b>Antes do tratamento</b> Média (DP)	<b>Depois do tratamento</b> Média (DP)	<b>P</b>
IL-2 (pg/ml)	17.07 (2.82)	11.71 (0.8)	<b>0,014</b>
IL-4(pg/ml)	21.08 (2.33)	20.31 (1.5)	0.612
IL-10 (pg/ml)	62.86 (0.71)	62.18 (0.79)	0.161
IFN- $\gamma$ (pg/ml)	194.80 (35.92)	166.99 (23.78)	0.131
MPO (mU/ml)	386.65 (159.55)	470.25 (116.62)	0.413
ADA (U/L)	10.26 (3.83)	13.30 (4.22)	0.078
NOx ( $\mu$ M)	16.88 (2.68)	19.98 (17.19)	0.721

Resultados são apresentados em média e desvio-padrão. DOP: doença óssea de Paget, Tc-99: tecnécio-99: cintilografia, IL-2: interleucina-2, IL-4: interleucina -4, IL-10: interleucina -10, IFN-  $\gamma$ : interferon-gama, MPO: mieloperoxidase, ADA: adenosina desaminase, NOx: metabolitos do óxido nítrico. (Análise de medidas repetidas).  $P < 0,05$ .



## 6 DISCUSSÃO

A etiologia da DOP ainda não está completamente elucidada. Nos últimos anos foram descobertas várias mutações genéticas e de SNPs em diversos genes que podem estar associados à etiologia da DOP, porém os estudos de dosagens de biomarcadores inflamatórios nos pacientes com esta doença são escassos (CHUNG e col., 2010; ALBAGHA e col., 2011; ALONSO e col., 2017).

Nosso estudo representa uma continuidade do trabalho previamente publicado em 2014 por Castro e col., e neste presente trabalho nós analisamos outros biomarcadores inflamatórios que poderiam influenciar ou não o metabolismo ósseo, já que este encontra-se aumentado na DOP (VALLET e RALSTON, 2016).

Nossa amostra de pacientes com DOP foi composta principalmente por mulheres brancas da sétima década de vida, semelhante à descrita por Reis e col. (2012), em Recife. Além disso, Reis e col. (2012) descreveram uma prevalência de praticamente 1:1 entre homens e mulheres. Nossa distribuição entre os sexos foi maior entre as mulheres, inversa à maior parte dos estudos onde é descrito uma predominância ligeiramente maior nos indivíduos do sexo masculino, conforme mencionado na metanálise sistemática publicada por Corral-Gudino e col. (2013).

Até a presente data, os estudos com biomarcadores inflamatórios na DOP são escassos e a maior parte deles consistiu numa casuística pequena. Já foram descritas alterações nas concentrações séricas de algumas citocinas nos pacientes com DOP. Em 1989, Pioli e col., utilizando experimentos *in vitro*, compararam as concentrações da IL-1 em células mononucleares do sangue periférico e da medula óssea, com e sem estimulação por lipopolissacarídeo (LPS) de seis indivíduos com DOP e seis controles saudáveis. Os resultados mostraram concentrações elevadas de IL-1 em ambos os grupos após estímulo com LPS, porém houve uma produção basal maior, sem estímulo, nos monócitos da medula óssea de pacientes pagéticos sugerindo que a IL-1 possa ter um papel no metabolismo ósseo na DOP. Mills e Frausto, em 1997, encontraram concentrações elevadas de IL-6 e fator de necrose tumoral-beta (TNF- $\beta$ ) em amostras de tecido ósseo de pacientes com DOP, comparados aos indivíduos saudáveis e isso poderia ser um reflexo da reabsorção óssea. Em 2002, foram descritas concentrações elevadas de IL-6 e de M-CSF no soro de pacientes com DOP

comparados aos indivíduos controles saudáveis. Além do mais, este soro foi capaz de estimular a formação de osteoclastos e a reabsorção lacunar óssea quando foi adicionado em culturas de monócitos não estimulados (NEALE e col., 2002).

Mais tarde, em 2007, foi demonstrado um aumento significativo na expressão do RNA mensageiro (RNAm) para a formação protéica de interferon-alfa, interferon-beta e IFN- $\gamma$ , além de outros genes, em monócitos e linfócitos de pacientes com DOP comparados ao grupo controle. Adicionalmente, observou-se maiores concentrações séricas de IFN- $\gamma$  nos pacientes com DOP *versus* grupo controle. Em 20 dos 35 pacientes com DOP analisados, as concentrações séricas IFN- $\gamma$  e a expressão do RNAm tendem a estar elevados, mas sem significância estatística (NAGY e col., 2008). Outros grupos têm estudado o IFN- $\gamma$  fora do contexto de DOP, com resultados ora de ativação, ora de inibição da osteoclastogênese (TAKAYANAGI e col., 2000; GAO e col., 2007). Um trabalho mais recente (CASTRO e col., 2014) observou concentrações elevadas de IL-6 e diminuídas de IL-17 em pacientes com DOP comparados ao grupo controle com osteoartrite.

No presente trabalho, foi observada maior concentração sérica de IL-2 em pacientes com DOP comparados ao grupo controle. Não foram observadas correlações entre as concentrações de IL-2 com a extensão de acometimento de doença. Além disso, houve redução nas concentrações desta citocina três meses após o tratamento com ácido zoledrônico. É sabido que o LT é ativado pela IL-2 e que é uma das células que secreta o RANKL, molécula crucial para o processo de ativação da osteoclastogênese (HOYER e col., 2008; D'AMICO e ROATO, 2012). Supõe-se que o aumento nas concentrações de IL-2 observado nos pacientes com DOP deste estudo estimule o LT para a produção de RANKL, e assim ative a reabsorção óssea. É descrito que um dos mecanismos de ação do ácido zoledrônico para conter a osteoclastogênese é através da inibição da enzima farnesil difosfatossintase, essencial para a função de reabsorção óssea do osteoclasto, e posterior indução da apoptose dessa célula, controlando assim a osteoclastogênese (ROELOFS e col., 2010). Desse modo, considerando a ação da medicação, talvez a IL-2 tenha reduzido após o tratamento por uma redução ou ausência da ativação de LT pelos osteoclastos, através da interação de receptores linfocitários com o receptor do tipo MHC II expressos em osteoclastos. Devemos ter em mente que a interação entre

o sistema imune e o osteometabolismo é complexa com envolvimento de múltiplas vias de sinalização, em diferentes tipos de células.

Outro achado interessante foi o obtido com a dosagem de MPO. Observamos concentrações diminuídas de MPO nos pacientes com DOP *versus* grupo controle. Ao investigar a possibilidade da interferência dos biomarcadores inflamatórios na atividade da DOP, a MPO foi encontrada em menores concentrações nos pacientes com DOP ativa *versus* inativa. Não foram observadas correlações entre as concentrações de MPO com a extensão de acometimento de doença. Estudos que relacionam a MPO no osteometabolismo são ainda mais escassos.

A MPO é uma enzima que contém a partícula heme, com propriedades pró-oxidativas, importante na defesa do organismo e nos processos inflamatórios (VEEN e col., 2009). Os grânulos de MPO são encontrados nos neutrófilos, e em menor número em células mononucleares. Os neutrófilos são as primeiras células a responder à injúria tecidual e tem a capacidade de atrair outras células do sistema de defesa, como os macrófagos/monócitos e células dendríticas. Os neutrófilos ativados liberam componentes bactericidas dos seus grânulos no fagossomo, principalmente a MPO, para destruir o microorganismo fagocitado (VEEN e col., 2009).

Recentemente foram descobertas novas funções para esta enzima como: 1) a biossíntese de matriz extracelular por fibroblastos (DENICHILO e col., 2015), 2) a angiogênese (PANAGOPOULOS e col., 2015) e 3) também aquelas relacionadas às funções do osteoclasto e do osteoblasto (DENICHILO e col., 2016; PANAGOPOULOS e col., 2017). Em estudos *in vitro* com osteoblastos humanos, a MPO contribuiu para a neoformação óssea através do aumento da deposição de colágeno do tipo I (DENICHILO e col., 2016). Por outro lado, Panagopoulos e col. (2017), demonstraram que a MPO inibiu a proliferação e a diferenciação de precursores do osteoclasto e o processo de osteoclastogênese em células humanas e murinas. Isto ocorreu através da internalização da MPO pelas células, e posterior inibição da fosforilação de componentes intracelulares da via de sinalização do RANK: jun N-terminal quinase (JNK), proteína quinase ativada p38 (p38-MAPK) e a quinase reguladora do sinal extracelular (ERK1/2), além do M-CSF. Além disso, a osteoclastogênese foi inibida de maneira dose-dependente somente nas células precursoras do osteoclasto, mas não no osteoclasto ativo. Sabe-se que o osteoclasto ativo é o alvo do

tratamento com bisfosfonatos, uma classe de medicamentos bastante eficaz no controle da doença na grande maioria dos pacientes (VALLET e RALSTON, 2016). Os resultados apresentados da MPO neste presente estudo poderiam ser explicados pela inibição dos osteoclastos. Porém, a hipótese de envolvimento da MPO na modulação do sistema imune através da ativação de macrófagos e de neutrófilos parece ser plausível já que estas células se infiltram no tecido ósseo na lesão por fraturas ósseas (LEFKOWITZ e col., 1993; TAKAYANAGI e col., 2000; BASTIAN e col., 2011).

Não há estudos do NO ou de seus metabólitos em pacientes com DOP. No entanto fazendo-se um paralelo em doenças inflamatórias como a artrite reumatoide (AR), foi demonstrada a influência do NO na reabsorção óssea. Observaram-se altas concentrações de iNOS na urina de pacientes com AR ativa, que reduziram após o tratamento com corticosteróides, sugerindo o envolvimento do NO no dano articular (UEKI e col., 1996; WHITEMAN e col., 1996; GRABOWSKI e col., 1996; SABANAI e col., 2008). Em ratos, o NO parece ter um efeito dependente de sua concentração: enquanto altas concentrações de NO inibem a osteoclastogênese, baixas concentrações de NO parecem estimulá-la. (VAN'T HOF e RALSTON, 1997; ZHENG e col., 2006). Apesar dos resultados de NO não significativos, não podemos descartar o seu papel como inibidor da osteoclastogênese, concordando com os achados de Zheng e col. (2006).

Uma limitação do nosso estudo pode ter sido a escolha de pacientes com osteoartrite como grupo controle, embora outros autores já o tenham feito previamente (PIOLI e col., 1989; CASTRO e col., 2014). Nós escolhemos esses indivíduos como controles devido à prevalência de OA neste grupo ser semelhante à dos pacientes com DOP da mesma faixa etária (ARDEN e NEVITT, 2006). Além do mais, é difícil encontrar pessoas acima de 60 anos de idade sem OA, e muitos indivíduos que não tem OA podem ter outras doenças prevalentes nesta faixa etária como obesidade, diabete melito, neoplasia e doenças cardiovasculares.

Porém, apesar destes achados, devemos considerar que indivíduos com OA seriam considerados saudáveis em outros estudos. Adicionalmente, a maior parte dos pacientes com DOP tinha OA. A consistência dos nossos dados pode ser confirmada com as análises dos pacientes com DOP ativa comparados com doença inativa,

demonstrando concentrações diminuídas de MPO nos pacientes com DOP ativa, com diferença estatística. Além disso, este estudo exploratório de 7 biomarcadores inflamatórios precisam ser replicados em outras amostras de pacientes com DOP para confirmação de nossos achados.



## **7 CONCLUSÃO**

Concluindo, este trabalho demonstrou concentrações séricas elevadas de IL-2, e baixas de MPO, em pacientes com DOP comparados ao grupo controle. Após o tratamento com ácido zoledrônico 5mg endovenoso de 5 pacientes com DOP ativa, foi observada redução na concentração sérica apenas da IL-2.



## 8 REFERENCIAS

Acotto CG, Mautalen CA. European origin of patients with Paget's disease of bone in the Buenos Aires area. *Eur J Epidemiol.* 2001;17:409-11.

Albagha OM, Visconti MR, Alonso N, Langston AL, Cundy T, Dargie R, Dunlop MG, Fraser WD, Hooper MJ, Isaia G, Nicholson GC, Montez JP, Gonzalez-Sarmiento R, Stefano M, Tenesa A, Walsh JP, Ralston SH. Genome-wide association study identifies variants at CSF1, OPTN and TNFRSF11A as genetic risk factors for Paget's disease of bone. *Nat Genet.* 2010;42:520-4.

Albagha OM, Wani SE, Visconti MR, Alonso N, Goodman K, Brandi ML, Cundy T, Chung PY, Dargie R, Devogelaer JP, Falchetti A, Fraser WD, Gennari L, Gianfrancesco F, Hooper J, Hul W, Isaia G, Nicholson GC, Nuti R, Papapoulos S, Montes JD, Ratajczak T, Rea SL, Rendina D, Gonzalez-Sarmiento R, di Stefano M, Ward LC, Walsh P, Ralston SH. Genome-wide association identifies three new susceptibility loci for Paget's disease of bone. *Nat Genet.* 2011;43:685-9.

Alonso N, Paiagua-Calero I, Pino-Montes J. Clinical and genetic advances in Paget's Disease of bone. *Clinic Rev Bone Miner Metal.* 2017;15:37-48.

Arden N, Nevitt MC. Osteoarthritis: epidemiology. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 2006;20:3-25.

Bastian O, Pillay J, Alblas J, Leenen L, Koenderman L, Blokhuis T. Systemic inflammation and fracture healing. *J Leukoc Biol.* 2011;89(5):669-73.

Bozec A, Zaiss MM, Kagwiria R, Voll R, Rauh M, Chen Z, Mueller-Schmucker S, Kroczeck RA, Heinzerling L, Moser M, Mellor AL, David JP, Schettl J. T cell costimulation molecules CD80/86 inhibit osteoclast differentiation by inducing the IDO/tryptophan pathway. *Sci Transl Med.* 2014;6:235ra60.

Bozec A, Zaiss MM. T regulatory cells in bone remodeling. *Curr Osteoporos Rep.* 2017;15:121-5.

Castro GRWC, Buss Z, Rosa JS, Fröde TS. Inflammatory cytokines in Paget's disease of bone. *Int J Immunopharmacol.* 2014;18:277-81.

Castro GRW, Heiden GI, Zimmermann AF, Morato ED, Neves FS, Toscano MA, Fialho SCMS, Pereira IA. Paget's disease of bone: analysis of 134 cases from an island in Southern Brazil: another cluster of Paget's disease of bone in South America. *Rheumatol Int.* 2012;32:627-31.

Chung PY, Beyens G, Riches PL, Wesenbeeck LV, Freitas F, Jennes K, Daroszevska A, Franssen E, Boonen S, Geusens P, Vanhoenacker F, Verbruggen L, Offel JV, Goemaere S, Ralston SH, Devogelaer JP, Hul WV. Genetic variation in the TNFRSF11A gene encoding RANK is associated with susceptibility to Paget's disease of bone. *J Bone Miner Res.* 2010;25(12):2592-605.

Cooper C, Harvey NC, Dennison EM, van Staa TP. Update on the epidemiology of Paget's disease of bone. *J Bone Min Res*, 2006;21 Suppl 2:S3-8.

Corral-Gudino L, Borao-Cengotita-Bengoa M, Pino-Montes J and Ralston S. *Bone.* 2013;55:347-42.

Cundy T. Paget's disease of bone. *Metabolism.* 2018;80:5-14.

Curfs JHAJ, Meis JFGM, Hoogkamp-Korstanje JAA. A Primer on Cytokines: Sources, Receptors, Effects, and Inducers. *Clin Microbiol Rev.* 1997;10(4):742-80.

D'Amico L, Roato I. Cross-talk between T cells and osteoclasts in bone resorption. *Bonekey Rep.* 2012;82 doi:10.1038/bonekey.2012.82

Denichilo MO, Panagopoulos V, Rayner TE, Borowicz RA, Greenwood JE, Evdokiou A. Peroxidase enzymes regulate collagen extracellular matrix biosynthesis. *Am J Pathol.* 2015;185(5):1372-84.

DeNichilo MO, Shoubridge AJ, Panagopoulos V, Liapis V, Zysk A, Zinonos I, Hay S, Atkins GJ, Findlay DM, Evdokiou A. Peroxidase enzymes regulate collagen biosynthesis and matrix mineralization by cultured human osteoblasts. *Calcif Tissue Int.* 2016;98:294-305.

Dieppe P, Peterfly C, Watt I. Osteoarthritis and related disorders: imaging. *Rheumatology*. Londres: Mosby, 1998. p. 8:4.1-8:4.10.

Gabay C, Kurshner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med*. 1999;11:448-54.

Galson DL, Roodman GD. Pathobiology of Paget's disease of bone. *J Bone Miner Res*. 2014;21:85-98.

Gao Y, Grassi F, Ryan MR, Terauchi M, Page K, Yang X, Weitzmann MN, Pacifici R. IFN- $\gamma$  stimulates osteoclast formation and bone loss in vivo via antigen-driven T cell activation. *J. Clin. Invest*. 2007;117(1):122-32.

Goode A, Long JE, Shaw B, Ralston SH, Visconti MR, Gianfrancesco F, Esposito T, Gennari L, Merlotti D, Rendina D, Rea SL, Sultana M, Searle MS, Layfield R. Paget disease of bone-associated UBA domain mutations of SQSTM1 exert effects on protein structure and function. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1842:992-1000.

Gordon MT, Mee AP, Anderson DC, Sharpe PT. Canine distemper transcripts sequenced from pagetic bone. *Bone Miner*. 1992;19:159 –74.

Grabowski PS, England AJ, Dykhuizen R, Copland M, Benjamin N, Reid DM, Ralston SH. Elevated nitric oxide production in rheumatoid arthritis. Detection using the fasting urinary nitrate: creatinine ratio. *Arth Rheum*, 1996; 39:643-7.

Grassi F, Manfredini C, Cattini L, Piacentini A, Gabusi E, Facchini A, Lisignoli G. T Cell Suppression by Osteoclasts In Vitro. *J. Cell. Physiol*. 2011;226:982–90.

Giusti G, Galanti B. Adenosine deaminase: colorimetric method. In: BERGMEYER, H. U. *Methods of enzymatic analysis*. New York: Verlag Chemie, 315-323, 1984.

Green IC, Wagner DA, Glowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SB. Analysis of nitrate, nitrite and (15N) nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*. 1982;126:131-8.

Key LL, Rodriguez RM, Willi SM, Wright NM, Hatcher HC, Eyre DR, Cure JK, Griffin PP, Ries WL. Long-term treatment of osteopetrosis with recombinant human interferon gamma. *N Engl J Med.* 1995;332(24):1594-9.

Helfrich MH, Hobson RP, Grabowski PS, Zurbriggen A, Cosby SL, Dickson GR, Fraser WD, Ooi CG, Selby PL, Crisp AJ, Eallace RGH, Kahn S, Ralston SH. A negative search for a paramyxoviral etiology of Paget's disease of bone: molecular, immunological, and ultrastructural studies in UK patients. *J Bone Miner Res.* 2000;15(12):2315-29.

Hocking LJ, Lucas GJ, Daroszewska A, Mangion J, Olavesen M, Cundy T, Nicholson GC, Ward L, Bennett ST, Wuyts W, van Hul W, Ralston SH. Domain-specific mutations in sequestosome 1 (SQSTM1) cause familial and sporadic Paget's disease. *Hum Mol Genet.* 2002;11:2735-9.

Hoyer KK, Dooms H, Barron L, Abbas AK. Interleukin-2 in the development and control of inflammatory disease. *Immunol Rev.* 2008, 226:19-28.

Kalyanaraman H, Ramdani G, Joshua J, Schall N, Boss GR, Cory E, Sah RL, Casteel DE, Pills RB. A novel, direct NO donor regulates osteoblast and osteoclast functions and increases bone mass in ovariectomized mice. *J Bone Miner Res.* 2016;32(1):46-59.

Katsimbri P. The biology of normal bone remodeling. *Eur J Cancer Care.* 2017; 26(6):e12740.

Klein-Nulend J, Oers RFM, Bakker AD, Bacabac RG. Nitric oxide signaling in mechanical adaptation of bone. *Osteoporos Int.* 2014;25:1427-37.

Laurin, N, Brown JP, Morissette J, Raymond V. Recurrent mutation of the gene encoding sequestosome 1 (SQSTM1/p62) in Paget disease of bone. *Am J Hum Genet.* 2002;70:1582-8.

Lefkowitz DL, Mills KC, Moguilevsky N, Bollen A, Vaz A, Lekkowitz SS. Regulation of macrophage function by human recombinant myeloperoxidase. *Immunol Lett.* 1993;36:43-9.

Mautalen C, Pumarino H, Blanco MC, Gonzalez D, Guiringuelli G, Fromm G. Paget's disease: the South American experience. *Seminars Arthritis Rheum.* 1994;23(4):226-7.

Mediero A, Cronstein BN. Adenosine and bone metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2013;24(6):290-300.

Meunier PJ, Salson C, Mathieu L, Chapuy MC, Delmas P, Alexandre C, Charhon S. Skeletal distribution and biochemical parameters of Paget's disease. *Clin Orthop Relat Res.* 1987;217:37-44.

Mills BG, Frausto A. Cytokines expressed in multinucleated cells: Paget's disease and giant cell tumors versus normal bone. *Calcif Tissue Int.* 1997;61:16-21.

Mills BG, Singer FR, Weiner LP, Suffin SC, Stabile E, Holst P. Evidence for both respiratory syncytial virus and measles virus antigens in the osteoclasts of patients with Paget's disease of bone. *Clin Orthop Relat Res.* 1984;183:303-11.

Mirosavljevic D, Quinn JM, Elliott J, Horwood NJ, Martin TJ, Gillespie M. T-cells mediate an inhibitory effect of interleukin-4 on osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res.* 2003;18(6):984-93.

Morales-Piga AA, Rey-Rey JS, Corres-Gonzalez J, Garcia-Sagredo JM, Lopez-Abente G. Frequency and characteristics of familial aggregation of Paget's disease of bone. *J Bone Miner Res.* 1995;10:663-70.

Neale SD, Schulze E, Smith R, Athanasou NA. The influence of serum cytokines and growth factors on osteoclast formation on Paget's disease of bone. *Q J Med.* 2002;95:230-40.

Nagy ZB, Gergely Jr P, Donath J, Borgulya G, Csanad M, Poor G. Gene expression profile in Paget's disease of bone: up regulation interferon signalling pathways in parietic monocytes and lymphocytes. *J Bone Miner Res.* 2008;23(2):253-9.

Pacifici R. The immune system and bone. *Arch Biochem Biophys.* 2010;503:41-53.

Panagopoulos V, Zinonos I, Leach DA, Hay SJ, Liapis V, Zysk A, Ingman WV, DeNichilo MO, Evdokiou A. Uncovering a new role for peroxidase enzymes as drivers of angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2015;68:128–38.

Panagopoulos V, Liapis V, Zinonos I, Hay S, Leach DA, Ingman W, DeNichilo MO, Atkins GJ, Findlay DM, Zannettino ACW, Evdokiou A. Peroxidase enzymes inhibit osteoclast differentiation and bone resorption. *Molecular and Cell Endocrinol.* 2017;440:8-15.

Paget J. On a form of chronic inflammation of bones (osteitis deformans). *Medico-Chir Trans.* 1877;60(37):64-9.

Palmqvist P, Lundberg P, Persson E, Johansson A, Lundgren I, Lie A, Conaway HH, Lerner UH: Inhibition of hormone and cytokine-stimulated osteoclastogenesis and bone resorption by interleukin-4 and interleukin-13 is associated with increased osteoprotegerin and decreased RANKL and RANK in a STAT6-dependent pathway. *J Biol Chem.* 2006;281:2414-29.

Park-Min KH, Ji JD, Antoniv T, Reid AC, Silver RB, Humphrey MB, Nakamura M, Ivashkiv LB. IL-10 suppresses calcium-mediated costimulation of receptor activator NF-kappa B signaling during human osteoclast differentiation by inhibiting TREM-2 expression. *J Immunol.* 2009;183:2444-55.

Pioli G, Girasole G, Pedrazzoni M, Sansoni P, Erroi A, Davoli L, Ciotti G, Mantovani A, Passeri M. Spontaneous Release of Interleukin-1 (IL-1) from Medullary Mononuclear Cells of Pagetic Subjects. *Calcif Tissue Int.* 1989;45:257-9.

Rao TS, Currie JL, Shaffer AF, Isakson PC. Comparative evaluation of arachidonic-acid- (AA) and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation. *Inflammation.* 1993;17(6):723-41.

Rea SL, Walsh JP, Layfield R, Ratajczak T, Xu J. New insights into the role of sequestosome 1/p62 mutant proteins in the pathogenesis of Paget's disease of bone. *Endocrine Rev.* 2013;34(4):501-24.

Rebel A, Basle M, Pouplard A, Kouyoumdjian S, Filmon R, Lepatezour A. Viral antigens in osteoclasts from Paget's disease of bone. *Lancet.* 1980;2(8190):344–6.

Reis RL, Poncell MF, Diniz ET, Bandeira F. Epidemiology of Paget's disease bone in the city of Recife, Brazil. *Rheumatol Int.* 2012;32:3087-91.

Ries WL, Seeds MC, Key LL. Interleukin-2 stimulates osteoclastic activity: increased acid production and radioactive calcium release. *J Periodontal Res.* 1989;24(4):242-6.

Roelofs AJ, Thompson K, Ebetino FH, Rogers MJ, Coxon FP. Bisphosphonates: mechanism of action and effects on bone cells, monocytes and macrophages. *Curr Pharm Des.* 2010;16(27):1950-60.

Sabanai K, Tsutsui M, Sakai A, Hirasawa H, Tanaka S, Nakamura E, Tanimoto E, Sasaguri Y, Ito M, Shimokawa H. Genetic disruption of all NO synthase isoforms enhances BMD and bone turnover in mice in vivo: involvement of the renin-angiotensin system. *J Bone Min Res.* 2008;23(5):633-43.

Sasaki H, Hou L, Belani A, Wang CY, Uchiyama T, Müller R, Stashenko P. IL-10, but not IL-4, suppresses infection-stimulated bone resorption in vivo. *J Immunol.* 2000;165:3626-30.

Saura M, Tarin C, Zaragova C. Recent insights into the implication of nitric oxide in osteoblasts differentiation and proliferation during bone development. *The Scientific World Journal.* 2010; q10:624-32.

Saxena A, Khosraviani S, Noel S, Mohan D, Donner T, Hamad ARA. Interleukin-10 paradox: a potent immunoregulatory cytokine that has been difficult to harness for immunotherapy. *Cytokine.* 2015;74(1):27-34.

Schoenborn JR, Wilson CB. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol.* 2007;96:41-101.

Shimegi S. ATP and adenosine act as a mitogen for osteoblast-like cells (MC3T3-E1). *Calcif Tissue Int.* 1996;58(2):109– 13.

Sieradzan KA, Mehan AO, Jones L, Wanker EE, Nukina N, Mann DM. Huntington's disease intranuclear inclusions contain truncated, ubiquitinated huntingtin protein. *Exp Neurol.* 1999; 156:92–9.

Strazzulla LC, Cronstein BN. Regulation of bone and cartilage by adenosine signaling. *Purinergic Signalling.* 2016; 12:583–93.

Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S, Shiba T, Murata S, Sato K, Takaoka A, Yokochi T, Oda H, Tanaka K, Nakamura K, Taniguchi T. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN- $\gamma$ . *Nature.* 2000;408(30):600-5.

Teramachi J, Nagata Y, Mohammad K, Inagaki Y, Ohata Y, Guise T, Michou L, Brown JP, Windle JJ, Kurihara N, Roodman GD. Measles virus nucleocapsid protein increases osteoblast differentiation in Paget's disease. *J Clin Invest.* 2016;126(3):1012-22.

Ueki Y, Miyake S, Tominaga Y, Eguchi K. Increased nitric oxide levels in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 1996;23(2):230-6.

Vallet M, Ralston SH. Biology and treatment of Paget's disease of bone. *J Cell Biochem.* 2016;117:289-99.

Van't Hof RJ, Ralston SH. Cytokine-induced nitric oxide inhibits bone resorption by inducing apoptosis of osteoclast progenitors and suppressing osteoclast activity. *J Bone Miner Res.* 1997;12(11):1797-804.

Van't Hof RJ, Ralston SH. Nitric oxide and bone. *Immunology.* 2001;(103):255-61.

Veen BS, Winther MPJ, Heeringa P. Myeloperoxidase: molecular mechanisms of action and their relevance to human health and disease. *Antioxid Redox Signal.* 2009;11:2899–937.

Wang CT, Lin YT, Chiang BL, Lee SS, Hou SH. Over-expression of receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL), inflammatory cytokines, and chemokines in periprosthetic osteolysis of loosened total hip arthroplasty. *Biomaterials.* 2010;31:77-82.

Whiteman M, Kaur H, Halliwell B. Protection against peroxynitrite dependent tyrosine nitration and alpha (1)-antitrypsin inactivation by some antiinflammatory drugs and by the antibiotic tetracycline. *Ann Rheum Diseases*. 1996;55:383-7.

Zaiss MM, Axmann R, Zwerina J, Polzer K, Gückel E, Skapenko A, Schulze-Koops H, Horwood N, Cope A, Schett G. Treg cells suppress osteoclast formation: a new link between the immune system and bone. *Arthritis and Rheumatism*. 2007;56:4104–12.

Zhao B, Ivashkiv LB. Negative regulation of osteoclastogenesis and bone resorption by cytokines and transcriptional repressors. *Arthritis Res Ther*. 2011;13:234-43.

Zheng H, Yu X, Collin-Osdoby P, Osdoby P. RANKL stimulates inducible nitric-oxide synthase expression and nitric oxide production in developing osteoclasts: an autocrine negative feedback mechanism triggered by RANKL-induced interferon- $\beta$  via NF- $\kappa$ B that restrains osteoclastogenesis and bone resorption. *J Biol Chem*. 2006;281(23):15809–20.



## **NORMAS ADOTADAS**

O estilo de requisitos uniformes adotados, conhecido como ABNT, foi elaborado pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (normas publicadas em <http://www.abnt.org.br/normalizacao/lista-depublicacoes/abnt>) e adotado pela Universidade Federal de Santa Catarina.



## ANEXO 1 - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA CATARINA - UFSC



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** Estudo das alterações genéticas, de marcadores inflamatórios e do metabolismo ósseo em pacientes portadores de doença óssea de Paget

**Pesquisador:** Tania Sílvia Frode

**Área Temática:**

**Versão:** 4

**CAAE:** 51747315.3.0000.0121

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Santa Catarina

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.064.392

#### Apresentação do Projeto:

Solicitação de inclusão de emenda pela pesquisadora responsável Tania Sílvia Frode. O projeto previa a análise da prevalência de SNPs relacionados à Doença Óssea de Paget (DOP); da mutação do gene Sequestosomo-1 P392L e T430P, associadas à etiologia da doença; e da mutação IVS28+23del15bp. Estes ensaios seriam realizados no Laboratório de pesquisa em Imunologia, no Centro de Ciências da Saúde na Universidade Federal de Santa Catarina, coordenado pela pesquisadora responsável pelo projeto. No entanto, de acordo com justificativa apresentada pela Profa. Tania S. Frode, essas análises não puderam ser realizadas no referido laboratório, uma vez que empresas fornecedoras de kits apropriados padrão ouro para as análises previstas não vendem mais os reagentes para o Brasil, tendo em vista a crise econômica que atravessa o País. Assim, a inclusão de emenda consiste no envio de documentos ao CEPISH referente ao Biorepositório, uma vez que essas análises seriam agora, realizadas no Molecular Biology Laboratory of the Department of Surgery and Translational Medicine, na Universidade de Florença, na Itália e situado em Cubo ala ovest, Viale Pieraccini 6, 50139, Florença, Italia. Este laboratório é referencia Mundial para a pesquisa de ensaios relacionados a doença de Paget. Após as análises previstas para este projeto, as amostras enviadas ao laboratório estrangeiro serão descartadas. Por sua vez, os marcadores inflamatórios, citocinas

**Endereço:** Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401  
**Bairro:** Trindade **CEP:** 88.040-400  
**UF:** SC **Município:** FLORIANOPOLIS  
**Telefone:** (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Parecer: 2.064.392

serão realizados no Laboratório de Pesquisa em  
Imunologia - CCS da UFSC.

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo primário

Estudar as alterações genéticas, os marcadores inflamatórios e o metabolismo ósseo nos pacientes com doença óssea de Paget.

**Objetivos secundários**

1. Estudar as mutações do SQSTM1 (T430P e P392L), encontrada nos pacientes com doença óssea de Paget e realizar análise genética dos familiares de primeiro grau do subgrupo de pacientes com a doença de Paget que apresentarem a mutação P392L ou T430P e dos pacientes do grupo controle para estabelecer o efeito familiar fundador;
2. Verificar a interação da mutação IVS8+23del15bp do gene do Sequestosomo 1 com a síntese de microRNAs nos pacientes com doença óssea de Paget e em controles saudáveis;
3. Analisar a frequência de SNPs (TNFRSF11a e TNRSF11b) em pacientes com doença óssea de Paget e em controles saudáveis;
4. Dosar a proteína relacionada ao PTH em pacientes com doença de Paget, familiares de primeiro grau do subgrupo de pacientes com a doença de Paget que apresentarem a mutação P392L ou T430P e em controles saudáveis;
5. Avaliar as concentrações séricas de citocinas e de enzimas que participam da resposta inflamatória em pacientes com doença de Paget, familiares de primeiro grau do subgrupo de pacientes com a doença que apresentarem a mutação P392L ou T430P e em controles saudáveis.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos e benefícios adequadamente avaliados e especificados no TCLE.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Ver parecer n. 1599472 do CEPESH/UFSC.

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

Apresentou todos os Termos. O TCLE foi adequado conforme as solicitações do CEPESH.

**Recomendações:**

Sem recomendações adicionais.

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

Considerando que as dívidas do CEP quanto à obtenção do TCLE foram sanadas, bem como as

**Endereço:** Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401  
**Bairro:** Trindade **CEP:** 88.040-400  
**UF:** SC **Município:** FLORIANOPOLIS  
**Telefone:** (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA CATARINA - UFSC**



Continuação do Parecer: 2.064.392

adequações em relação ao TCLE foram realizadas, o presente projeto está aprovado.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

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

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_835988_E1.pdf	05/04/2017 09:49:15		Aceito
Outros	CartaAbril2017.pdf	05/04/2017 09:46:45	Tania Silvia Frode	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEAbril2017.pdf	05/04/2017 09:46:16	Tania Silvia Frode	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.doc	09/02/2017 09:29:20	Tania Silvia Frode	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	BiorepositorioDeclaracaoUFSC.pdf	09/02/2017 09:27:26	Tania Silvia Frode	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	BiorepositorioDeclaracaoItalia.pdf	09/02/2017 09:27:14	Tania Silvia Frode	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	ACORDOENTREINSTITUICOES.pdf	09/02/2017 09:26:58	Tania Silvia Frode	Aceito
Cronograma	cronograma.docx	09/02/2017 09:23:36	Tania Silvia Frode	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_pesquisadores_assinada.pdf	08/12/2015 19:48:56	Tania Silvia Frode	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	HGCR_autorizacao.pdf	08/12/2015 19:20:29	Tania Silvia Frode	Aceito
Orçamento	Orçamento.docx	04/12/2015 10:07:58	Tania Silvia Frode	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Formulario_de_Autorizacao_HEMOSC.pdf	03/12/2015 08:10:41	Tania Silvia Frode	Aceito

**Endereço:** Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401  
**Bairro:** Trindade **CEP:** 88.040-400  
**UF:** SC **Município:** FLORIANOPOLIS  
**Telefone:** (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propeq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 2.064.392

Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_de_Anuencia_HEMOSC.pdf	03/12/2015 08:09:24	Tania Silvia Frode	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto.pdf	29/09/2015 14:00:24	Tania Silvia Frode	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

FLORIANOPOLIS, 15 de Maio de 2017

---

**Assinado por:**  
**Ylmar Correa Neto**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401  
**Bairro:** Trindade **CEP:** 88.040-400  
**UF:** SC **Município:** FLORIANOPOLIS  
**Telefone:** (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

## **ANEXO 2: Termo de Consentimento livre e esclarecido**

### **UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Biorrepositório)**

Você está sendo convidado a participar voluntariamente de um estudo de pesquisa clínica sobre a doença óssea de Paget. Esta folha de informação tem como objetivo fornecer-lhe maiores detalhes sobre este estudo, de tal forma que você possa decidir se deseja ou não participar do mesmo. As informações serão dadas de uma maneira clara e acessível para que você entenda todos os procedimentos que serão realizados. Você terá o tempo que for necessário para refletir, consultar os seus familiares ou outras pessoas que achar necessário para decidir se você vai participar ou não desta pesquisa. Você terá a plena liberdade de recusar a participar do estudo ou retirar o seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer penalização. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será apresentado para que seja lido e compreendido antes da concessão do seu consentimento livre e esclarecido.

A justificativa do estudo é que a doença óssea de Paget é uma doença crônica que, ao afetar os ossos, pode causar dor, deformidades, fraturas, sintomas neurológicos, artrose e acarretar o desenvolvimento de neoplasias malignas (câncer). Muitas pessoas acometidas não apresentam sintomas, mas podem apresentar futuramente. Apesar de terem sido identificados alguns fatores genéticos ligados ao desenvolvimento da doença, sua causa ainda não foi completamente esclarecida. Florianópolis é a cidade da região sul na qual a frequência de pacientes com doença de Paget é bastante significativa.

O estudo tem como objetivo avaliar a presença de alterações genéticas, os marcadores inflamatórios e o metabolismo ósseo nos pacientes com doença óssea de Paget. Para possibilitar comparações, será necessário avaliar dados de seu prontuário médico, coletar sangue dos pacientes com doença de Paget e dos familiares de primeiro grau dos pacientes com doença de Paget que apresentarem a mutação chamada P392L ou T430P, e também de indivíduos saudáveis, doadores

de sangue provindos do Hemocentro de Santa Catarina – Florianópolis (Hemosc) com testes sorológicos negativos. A biópsia de um pequeno fragmento de pele para análise genética de mutações no gene envolvido na Doença de Paget será necessária apenas nos pacientes com doença de Paget com uma mutação do gene da doença em particular, a IVS+23del15bp, e também dos pacientes do grupo controle.

Para participar do estudo você terá que ser submetido à coleta de sangue de veia periférica. Uma parte da amostra de sangue será armazenado no laboratório de Pesquisa em Imunologia, e outra parte será enviada posteriormente para o laboratório de **Biologia Molecular do Departamento de Cirurgia e Medicina Translacional da Universidade de Florence**, Cubo ala Ovest, Viale Pieraccini 6, 50139, em Florença, na Itália, para ser utilizado na análise da presença de mutações genéticas da doença de Paget. Após ser utilizado para esta pesquisa, qualquer sobra de material biológico será descartada. Por tratar-se de procedimento invasivo, a coleta de sangue apresenta alguns riscos, incluindo dor local, tromboflebite, formação de equimoses e alergia ao curativo. Os riscos serão minimizados pelo emprego de métodos adequados, como compressão local digital por alguns minutos e evitar realizar esforço com o braço a que foi submetido a coleta por algumas horas. Você deverá entrar em contato com o pesquisador responsável caso ocorra alguma intercorrência após o procedimento.

A biópsia de pele será realizada com técnicas de assepsia e antisepsia. É necessária anestesia local com vasoconstritor, que será injetado com agulha fina abaixo da pele, na região subcutânea, da região a ser biopsiada. O paciente sentirá uma pequena picada e um pouco de ardor quando o anestésico for injetado, mas durante o procedimento não deverá sentir nenhuma dor. A retirada do fragmento de pele do antebraço ou da perna ou de outra região que pode ser escolhida pelo paciente, será realizada pela técnica com *punch* de biópsia, que é um instrumento com uma lâmina circular cortante na ponta que visa facilitar o procedimento. A técnica consiste em fazer movimentos de rotação e pressão vertical até atingir uma profundidade de aproximadamente três milímetros. Após o procedimento, as bordas da pele são aproximadas com a realização de sutura para melhor cicatrização e evitar hemorragias. Deverão ser realizados curativos diários em casa ou no posto de saúde mais próximo. Após um período de sete à 10 dias do procedimento, o paciente terá os pontos da pele removidos. A cicatrização da pele demora de três a catorze dias. Como é um

procedimento invasivo, existem riscos como dor local após o procedimento, formação de quelóide, demora na cicatrização e raramente infecção de pele. Para minimizar o risco das complicações, você deve evitar atividade ou esforço físico intenso nos dias subsequentes até a retirada dos pontos de sutura da pele, deverá aplicar compressa gelada por quinze minutos de duas à três vezes ao dia nas primeiras 24 horas, realizar as trocas de curativo diariamente. Em caso de alguma intercorrência, você deverá entrar em contato com o pesquisador responsável para ser orientado. Não será realizada nenhuma intervenção terapêutica ou teste de medicamentos novos. O fragmento de pele será armazenado em no Laboratório de Pesquisa em Imunologia (CCS-UFSC) e posteriormente será enviado para o Laboratório **de Biologia Molecular do Departamento de Cirurgia e Medicina Translacional da Universidade** em Florença, Itália, onde será utilizado para análise da presença de mutações genéticas da Doença de Paget. Após ser utilizado para esta pesquisa, qualquer sobra de material biológico será descartada em lixo hospitalar.

Sua participação será importante, pois recentemente foi confirmada a presença de um grande número de pessoas afetadas pela Doença de Paget na região de Florianópolis – SC e há necessidade de pesquisar o porquê desse fenômeno. Em torno de 30% dos portadores da doença óssea de Paget apresentam familiares acometidos pela mesma doença. A identificação de mutações genéticas que propiciem seu surgimento pode identificar pessoas com maior risco, e propiciar tratamento mais precoce.

Você terá acesso ao acompanhamento e a assistência médica, incluindo o encaminhamento para aconselhamento genético caso necessário, mesmo após o encerramento ou interrupção da pesquisa. Você pode recusar-se a participar do estudo, ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma. Os resultados serão identificados apenas por códigos, não havendo identificação do paciente garantindo o sigilo e sua privacidade em todas as fases da pesquisa. Esses resultados poderão ser conhecidos apenas por você e por seu médico, mediante prévia autorização.

Você receberá uma via deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Todas as despesas dos participantes da pesquisa serão cobertas pelos responsáveis da pesquisa.

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será assinado em duas vias de igual teor que deverão ser rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela pessoa por ele delegada, devendo as páginas de assinaturas estar na mesma folha.

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido cumpre todas as exigências da resolução 466/12. Os pesquisadores envolvidos na pesquisa declaram cumprir todas as exigências desta resolução e de suas complementares.

### **Termos de Participação e assinatura**

**Pesquisa:** Estudo das alterações genéticas e do metabolismo ósseo na doença de Paget.

#### **Responsáveis:**

**Fernanda Vicente da Costa** Médica reumatologista Hospital Governador Celso Ramos. Unidade de reumatologia, Rua Irmã Benwarda, 297, Centro, Florianópolis/SC. Brasil **Telefones:** (48) 3251-7000 (48) 32517155

**Profa. Dra. Tânia Silvia Fröde** Professora do Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Catarina; Campus Universitário – Trindade; Florianópolis, Santa Catarina, Brasil, 88040-970 Fone- 48 99614846 Fone (48) 37219712

**Dados do paciente****Nome do paciente:****RG:****CPF:****Data de nascimento:****Endereço:****Telefone:**

Eu, abaixo assinado, aceito participar voluntariamente desta pesquisa para estudar as alterações genéticas da doença de Paget. Estou ciente que para participar do estudo os pesquisadores terão acesso à dados do meu prontuário médico, terei que ser submetido a coleta de sangue de veia periférica, e que este sangue será armazenado no laboratório de Pesquisa em Imunologia no CCS/UFSC e posteriormente será enviado para o laboratório **de Biologia Molecular do Departamento de Cirurgia e Medicina Translacional da Universidade** em Florença, Itália para ser analisado quanto à presença das mutações genéticas. Este material biológico (sangue) será utilizado somente nesta pesquisa. Também sei que pode ser necessária a realização de biópsia de pele se eu apresentar a mutação a IVS+23del15bp, ou se eu fizer parte dos pacientes do grupo controle, e que este material será armazenado no laboratório de Pesquisa em Imunologia no CCS/UFSC e posteriormente será enviado para o laboratório **de Biologia Molecular do Departamento de Cirurgia e Medicina Translacional da Universidade** em Florença, na Itália para ser analisado quanto à presença das mutações genéticas. Este material biológico (fragmento de pele) será utilizado somente nesta pesquisa. Por tratar-se de procedimento invasivo, a coleta de sangue apresenta alguns riscos, incluindo dor local, tromboflebite, formação de equimoses e alergia ao curativo; sei que a biópsia de pele também tem riscos como dor local após o procedimento, formação de quelóide, demora na cicatrização e raramente infecção de pele. Sei que os riscos serão minimizados pelo emprego de métodos adequados descritos anteriormente no texto, e que terei suporte adequado e acesso à equipe de pesquisadores para orientações em caso de intercorrências. O material coletado servirá para pesquisa genética de mutações associadas à doença óssea de Paget. A

identificação de mutações genéticas pode identificar pessoas com maior risco, e propiciar tratamento mais precoce. Sei que posso sair do estudo em qualquer momento e que isso não irá prejudicar o meu tratamento no ambulatório de doenças osteometabólicas do Hospital Governador Celso Ramos. Estou ciente que a pesquisa de polimorfismos genéticos será realizada para portadores de doença óssea de Paget, familiares de primeiro grau dos pacientes com doença de Paget que apresentarem a mutação P392L ou T430P e para pacientes do grupo controle, e seus resultados serão identificados apenas por códigos, não havendo identificação do paciente, garantindo a sua privacidade. Esses resultados poderão ser conhecidos apenas por mim e por meu médico, mediante prévia autorização. Sei que terei acesso ao acompanhamento e a assistência, incluindo o aconselhamento genético caso necessário, mesmo após o encerramento ou interrupção da pesquisa.

Eu li / ouvi o conteúdo deste termo e recebi esclarecimento sobre minhas dúvidas oralmente. Entendi o propósito do estudo e os riscos de minha aceitação em participar do mesmo. A minha assinatura a seguir, indica que concordei a participar voluntariamente do estudo.

**Data:** \_\_\_\_\_

**Assinatura do paciente ou responsável:** \_\_\_\_\_

Eu, abaixo assinado, expliquei e discuti todos os detalhes deste estudo com o paciente, usando uma linguagem compreensível e apropriada e acredito que o mesmo tenha entendido a explicação.

**Assinatura:** \_\_\_\_\_

Dra. Fernanda Vicente da Costa -(48) 3251-7000 (48) 84185588

Profa. Dra. Tânia Silvia Fröde – (48) 99614846

**COMITE DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERE HUMANOS-  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA – CEP SH**

Pró-Reitoria de Pesquisa

Prédio Reitoria II

R: Desembargador Vitor Lima, no 222, sala 401, Trindade,  
Florianópolis/SC

CEP 88.040-400

Contato: (48) 3721-6094

cep.propesq@contato.ufsc.br

**ANEXO 3: Protocolo de coleta de dados**  
**AVALIAÇÃO GENÉTICA, CLÍNICO-LABORATORIAL DE**  
**PORTADORES DE DOENÇA ÓSSEA DE PAGET**

<b>Identificação</b>		
Nome: (_____)		Prontuário: (_____)
Sexo: <input type="checkbox"/> Masc <input type="checkbox"/> Fem		Idade: (____) anos
Cor: <input type="checkbox"/> Branca <input type="checkbox"/> Negra <input type="checkbox"/> Amarela <input type="checkbox"/> Parda		
Ascendência: <input type="checkbox"/> Judaica <input type="checkbox"/> Germânica <input type="checkbox"/> Italiana <input type="checkbox"/> Portuguesa <input type="checkbox"/> Outra _____ ( <input type="checkbox"/> Não sabe)		
<b>Endereço</b>		
Rua: (_____)		Número: (_____)
Município: (_____)		UF: (____)
CEP: (_____)	Fone: (_____)	e-mail: (_____)
<b>Dados clínicos</b>		
Tempo dos Sintomas: (____) anos		Tempo de diagnóstico: (____) anos
Peso:		Altura:
Sintomas: <input type="checkbox"/> Dor óssea <input type="checkbox"/> Limitação funcional <input type="checkbox"/> Deformidade óssea visual		
Forma: <input type="checkbox"/> Monostótica <input type="checkbox"/> Poliostótica Ossos acometidos: (_____)		
Cintilografia Óssea (todas): <input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Alterada <input type="checkbox"/> Não fez		
Primeira Cintilografia Óssea: <input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Alterada		Data: _____ Ext. do Acometimento
Raio X: <input type="checkbox"/> Lesões Líticas <input type="checkbox"/> Esclerose <input type="checkbox"/> Deformidade radiológica -> Qual? <input type="checkbox"/> Aumento de volume <input type="checkbox"/> Curvatura		
Fosfatos e alcalina ao diagnóstico: Total (____) Óssea (____)		
História Familiar: <input type="checkbox"/> ausente <input type="checkbox"/> Pai <input type="checkbox"/> Mãe <input type="checkbox"/> Irmãos <input type="checkbox"/> Tios <input type="checkbox"/> Avós <input type="checkbox"/> Filhos		
Comorbidades:		
Medicamentos em uso atualmente:		
Tabagismo:		
Complicações (assinale as que ocorreram)		
<input type="checkbox"/> Hidrocefalia <input type="checkbox"/> Surdez <input type="checkbox"/> Sarcoma <input type="checkbox"/> Fratura <input type="checkbox"/> Osteoartrite		

Tratamento								
Medicamento	Assinale os usados	Dose Utilizada (mg/periodo)	Periodo de uso	Assinale a resposta apresentada				
				Melhora da dor	FA Total Pré Tto	Ossea Pré Tto		Não houve resposta
Calcitonina	<input type="checkbox"/>	( )	( )	<input type="checkbox"/>				
Etidronato	<input type="checkbox"/>	( )	( )	<input type="checkbox"/>				
Pamidronato	<input type="checkbox"/>	( )	( ) Número de doses	<input type="checkbox"/>				
Clodronato	<input type="checkbox"/>	( )	( )	<input type="checkbox"/>				
Alendronato	<input type="checkbox"/>	( )	( )	<input type="checkbox"/>				
Risendronato	<input type="checkbox"/>	( )	( )	<input type="checkbox"/>				
Ibandronato vo	<input type="checkbox"/>	( )	( )	<input type="checkbox"/>				
Ibandronato EV	<input type="checkbox"/>	( )	( ) Número de doses	<input type="checkbox"/>				
Zoledronato	<input type="checkbox"/>	( )	( ) Número de doses	<input type="checkbox"/>				<input type="checkbox"/>
Houve efeito adverso? <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim			Caso afirmativo, qual(is)? (_____)					
_____								
Sem indicação de tratamento <input type="checkbox"/>								
<b>Estado Atual</b>								
Dor óssea <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim				Fosfatase alcalina alterada (mg/dl) <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim				
Fosfatase alcalina Total ( ) Ossea ( )				Data:				
Cintilografia óssea: Normal ( ) Alterada ( )			Data:		Ext. do acometimento:			
Tratamento atual: (_____)								
_____								

