

Lucas Peixoto Sales

**Análise da expressão gênica de monócitos clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻) de
pacientes com artrite reumatoide**

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

Orientadora: Dr^a. Camille Pinto Figueiredo

Coorientador: Dr. Bidossessi Wilfried Hounkpe

**São Paulo
2023**

Lucas Peixoto Sales

**Análise da expressão gênica de monócitos clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻) de
pacientes com artrite reumatoide**

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

Orientadora: Dr^a. Camille Pinto Figueiredo

Coorientador: Dr. Bidossessi Wilfried Hounkpe

**São Paulo
2023**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Sales, Lucas Peixoto

Análise da expressão gênica de monócitos
clássicos (CD14++CD16-) de pacientes com artrite
reumatoide / Lucas Peixoto Sales. -- São Paulo,
2023.

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

Programa de Ciências do Sistema
Musculoesquelético.

Orientadora: Camille Pinto Figueiredo.

Coorientador: Bidossessi Wilfried Hounkpe.

Descritores: 1.Artrite reumatoide 2.Monócitos
clássicos 3.Erosões ósseas 4.Inflamação 5.Osteogênese

USP/FM/DBD-343/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Nome: Lucas Peixoto Sales

Título: Análise da expressão gênica de monócitos clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻) de pacientes com artrite reumatoide

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

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Cora Coralina

Dedico esta tese à Professora Rosa Maria Rodrigues Pereira (*in memoriam*), cuja presença em minha trajetória acadêmica foi marcada por sua sabedoria, dedicação e carinho.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Rosa Maria Rodrigues Pereira (*in memoriam*) por todos os ensinamentos e confiança dos últimos anos. Sua falta será sempre sentida, mas sua lembrança e legado jamais serão esquecidos.

À Dra. Camille Pinto Figueiredo por todo o apoio, ensinamentos e amizades nesses últimos anos. Serei eternamente grato por todas as oportunidades e toda confiança. Obrigado por servir de inspiração.

À Valéria de Falco Caparbo que ao longo desses anos se tornou uma grande amiga e com certeza deixou os anos de pós-graduação mais leves e divertidos.

À Lívia de Souza Gonçalves por toda amizade e companheirismo nos últimos anos.

Às companheiras da disciplina de reumatologia, em especial à Claudia Reis de Oliveira, Maria Aurora Gomes da Silva, Virginia Lucia Nazário Bonoldi, Mayra de Carvalho, Elaine Pires Leon e Margarete Borges Galhardo Vendramini por todos os bons momentos nos últimos anos.

Aos membros da banca examinadora de qualificação Dr. Diogo Souza Domiciano, Dr. Júlio César Bertacini de Moraes e Dr. Bidossessi Wilfried Hounkpe pelas valiosas sugestões.

Ao Bidossessi Wilfried Hounkpe, pela orientação e análise de bioinformática.

Às secretárias da pós-graduação em Ciências do Sistema Musculoesquelético pela disponibilidade.

À Dalila Pinheiro Leal por me incentivar e apoiar desde o início.

À Zofia Agnieszka Wicik, pelo auxílio no processo de isolamento das células.

À Mariana Ortega Perez por todo carinho e contribuição para que este trabalho fosse realizado.

Ao Alan Lins Fernandes pelos conselhos estatísticos e parceria nesses últimos anos.

Ao Dr. Eduardo Borba pela correção da versão final do manuscrito.

Ao Laboratório multiusuário de Sequenciamento em Larga Escala (SELA) pelo sequenciamento de RNA em larga escala (RNA-seq).

À Bianca Trovello Ramallo pelos ensinamentos desde a graduação, amizade e por servir de inspiração.

Aos amigos do Laboratório de Miopatias Alexandre Santos e Rafael Misse pelos cafés e amizade.

A todas as pacientes que voluntariamente concordaram em participar do estudo e assim, torná-lo possível.

A todos os amigos presentes ao longo desses anos, em especial a Samantha Giustty, Jaqueline Aparecida, Camila Arruda, Mayara Trindade, Daniela Loureiro.

À minha família, em especial aos meus pais, Silvia Santos e Manuel Sales, a minha irmã, Juliana Peixoto e ao meu sobrinho que considero mais que um filho, Nicolas Peixoto. Obrigado por tudo, pela paciência, por todo o carinho e amor dedicados a mim e a minha formação ao longo de todos esses anos. Nada disso seria possível sem o apoio incondicional de vocês. Meus sinceros agradecimentos.

Por fim, agradeço à disciplina de Reumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo apoio financeiro e pelas inúmeras oportunidades de crescimento profissional.

Agradecimentos Especiais

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), que aprovou e financiou a execução deste projeto (#16/00006-7; #18/05596-2; 21/13590-7).

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação.
Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP.

Elaborado por Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentações; 2016.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus.*

Abreviaturas dos genes de acordo com a *HUGO Gene Nomenclature Committee*

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE SÍMBOLOS DE GENES

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	24
2. OBJETIVOS.....	31
3. MÉTODOS	33
3.1 <i>Pacientes e Controles</i>	34
3.2 <i>Avaliação clínica e laboratorial.....</i>	36
3.3 <i>Avaliação das erosões ósseas.....</i>	36
3.4 <i>Isolamento de monócitos clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻).....</i>	39
3.5 <i>Extração e quantificação de RNA</i>	40
3.6 <i>Avaliação da integridade do RNA</i>	40
3.7 <i>Preparo da biblioteca e sequenciamento de RNA em larga escala (RNA-seq).....</i>	40
3.8 <i>Análises da bioinformática</i>	41
3.9 <i>Análise estatística</i>	43
4. RESULTADOS.....	44
4.1 <i>Características gerais</i>	45
4.2 <i>Avaliação das erosões ósseas.....</i>	45
4.3 <i>Quantificação e integridade do RNA</i>	45
4.4 <i>Expressão gênica de monócitos CD14⁺⁺CD16⁻ de pacientes com artrite reumatoide.....</i>	47
4.5 <i>Expressão gênica de monócitos CD14⁺⁺CD16⁻ de pacientes com artrite reumatoide e erosão óssea.....</i>	53
5. DISCUSSÃO	64
6. CONCLUSÃO	72
7. ANEXOS	74
8. REFERÊNCIAS.....	85
9. APÊNDICES	97

LISTA DE ABREVIATURAS

anti-CCP	Anti-peptídeo citrulinado cíclico
ARE	Artrite reumatoide e erosão óssea
ARSE	Artrite reumatoide sem erosão óssea
CCR2	Receptor de quimiocina CC tipo 2
CT	Grupo controle
DMARDs	Fármacos sintéticos modificadores do curso da doença
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FcγRIII	Receptor de baixa afinidade para imunoglobulina G
FDR	Taxa de descoberta falsa
FR	Fator Reumatoide
GSEA	Análise de enriquecimento de um conjunto de genes
HR-pQCT	Tomografia computadorizada quantitativa periférica de alta resolução
IFP	Interfalângicas proximais
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
IGFBP-4	Proteína ligadora IGF tipo 4
IL-6	Interleucina-6
IMC	Índice de massa corporal
KLF	Fatores semelhantes a <i>Krüppel</i>
log2 fold-change	Mudança relativa
LPS	Lipopolissacarídeo
LRT	Teste de razão de verossimilhança
MCF	Metacarpofalângicas
MCP-3	Proteína quimiotática de monócitos 3
M-CSF	Fator estimulador de colônia de macrófagos
OSCAR	Receptor associado à osteoclastos
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PCR	Proteína C-Reativa
RANK	Receptor ativador de fator nuclear <i>kappa</i> B
RANKL	Ligante do receptor ativador do fator nuclear <i>kappa</i> B

RNA-seq	Sequenciamento de RNA em larga escala
SDAI	Índice Simplificado de Atividade de Doença
SPECTRA	<i>Study grouP for x-trEme Computed Tomography in Rheumatoid Arthritis</i>
ssGSEA	Análise de enriquecimento de um conjunto de genes para amostra
TLR4	<i>Toll-like receptor 4</i>
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
VHS	Velocidade de Hemossedimentação

LISTA DE SÍMBOLOS DE GENES

<i>AHNAK2</i>	AHNAK Nucleoprotein 2
<i>AKR1C1</i>	Aldo-Keto Reductase Family 1 Member C1
<i>BCO2</i>	Beta-Carotene Oxygenase 2
<i>CAGE1</i>	Cancer Antigen 1
<i>CAV1</i>	Caveolin 1
<i>CCDC154</i>	Coiled-Coil Domain Containing 154
<i>CCDC80</i>	Coiled-Coil Domain Containing 80
<i>CCL7</i>	C-C Motif Chemokine Ligand 7
<i>CD40</i>	CD40 Molecule
<i>CDH13</i>	Cadherin 13
<i>CDKN1A</i>	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A
<i>CMKLR1</i>	Chemerin Chemokine-Like Receptor 1
<i>CMTM1</i>	CKLF Like MARVEL Transmembrane Domain Containing 1
<i>COL1A1</i>	Collagen Type I Alpha 1 Chain
<i>COL26A1</i>	Collagen Type XXVI Alpha 1 Chain
<i>COQ8A</i>	Coenzyme Q8A
<i>CORO1A</i>	Coronin 1A
<i>CPEB1</i>	Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding Protein 1
<i>CSF3</i>	Colony Stimulating Factor 3
<i>CSF3R</i>	Colony Stimulating Factor 3 Receptor
<i>CTLA4</i>	Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4
<i>DDIT3:</i>	DNA Damage Inducible Transcript 3
<i>ENSG00000260861</i>	Novel Protein, SIRPB1-SIRPD Readthrough
<i>FERMT2</i>	FERM Domain Containing Kindlin 2
<i>GDF15</i>	Growth Differentiation Factor 15
<i>GPA33</i>	Glycoprotein A33
<i>GREM1</i>	Gremlin 1, DAN Family BMP Antagonist
<i>GSDMA</i>	Gasdermin A

<i>HLA-DQA2</i>	Major Histocompatibility Complex, Class II, DQ Alpha 2
<i>HSPA1A</i>	Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 1A
<i>HSPA1B</i>	Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 1B
<i>IGF</i>	Insulin-like growth factor
<i>IL18RAP</i>	Interleukin 18 Receptor Accessory Protein
<i>IL-1β</i>	Interleukin-1 beta
<i>IL6</i>	Interleukin 6
<i>KCNK17</i>	Potassium Two Pore Domain Channel Subfamily K Member 17
<i>KLF14</i>	KLF Transcription Factor 14
<i>KRTCAP2</i>	Keratinocyte Associated Protein 2
<i>LARP6</i>	La Ribonucleoprotein 6, Translational Regulator
<i>LGR4</i>	Leucine Rich Repeat Containing G Protein-Coupled Receptor 4
<i>MCP-3</i>	Monocyte chemotactic protein 3
<i>MLXIPL</i>	MLX Interacting Protein Like
<i>MMP2</i>	Matrix Metallopeptidase 2
<i>MMP25</i>	Matrix Metallopeptidase 25
<i>NALF1</i>	NALCN Channel Auxiliary Factor 1
<i>NOG</i>	Noggin
<i>OMG</i>	Oligodendrocyte Myelin Glycoprotein
<i>PAPPA</i>	Pappalysin 1
<i>PITX1</i>	Paired Like Homeodomain 1
<i>PLAUR</i>	Plasminogen Activator, Urokinase Receptor
<i>PRKD1</i>	Protein Kinase D1
<i>PRRX1</i>	Paired Related Homeobox 1
<i>RAB3B</i>	RAB3B, Member RAS Oncogene Family
<i>RND3</i>	Rho Family GTPase 3
<i>RPP21</i>	Ribonuclease P/MRP Subunit P21
<i>RSPO3</i>	R-Spondin 3
<i>S100A12</i>	S100 Calcium Binding Protein A12
<i>S100A9</i>	S100 Calcium Binding Protein A9

<i>SEC31B</i>	SEC31 Homolog B, COPII Coat Complex Component
<i>SERPING1</i>	Serpin Family G Member 1
<i>SOCS1</i>	Suppressor of Cytokine Signaling 1
<i>ST6GALNAC6</i>	ST6 N-Acetylgalactosaminide Alpha-2,6-Sialyltransferase 6
<i>TMEM233</i>	Transmembrane Protein 233
<i>UCHL1</i>	Ubiquitin C-Terminal Hydrolase L1
<i>WNT3A</i>	Wnt Family Member 3A
<i>WNT4</i>	Wnt Family Member 4
<i>WWTR1</i>	WW Domain Containing Transcription Regulator 1
<i>XCL1</i>	X-C Motif Chemokine Ligand 1
<i>ZNF665</i>	Zinc Finger Protein 665

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Osteoclastogênese mediada por M-CSF e RANKL	28
Figura 2 - Radiografias simples geradas pela HR-pQCT para a região de interesse a ser avaliada (região entre as linhas pontilhadas).....	37
Figura 3 - Varredura da 2ª cabeça do metacarpo pela HR-pQCT, com divisão anatômica em quatro quadrantes.....	38
Figura 4 - Isolamento de monócitos CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻	39
Figura 5 - Imagem de HR-pQCT da cabeça do osso metacarpo da 2ª MCF, quadrante IV (radial).....	45
Figura 6 - Genes <i>upregulated</i> e <i>downregulated</i> em pacientes com artrite reumatoide em comparação ao grupo controle.....	47
Figura 7 - <i>Heat map</i> demonstrando o padrão de expressão gênica dos 50 melhores genes diferencialmente expressos	49
Figura 8 - <i>Heat map</i> demonstrando o enriquecimento de genes associados à atividade de citocinas e seus receptores em pacientes com artrite reumatoide em comparação ao grupo controle	49
Figura 9 - Gráfico de pontos demonstrando os processos biológicos associados aos genes diferencialmente expressos	50
Figura 10 - <i>Heat map</i> da análise funcional de enriquecimento do conjunto de genes demonstrando uma estratificação do grupo de pacientes com artrite reumatoide e do grupo controle.....	51
Figura 11 - Análise de conectividade de rede	51
Figura 12 - Análise funcional de enriquecimento do conjunto de genes <i>upregulated</i>	52
Figura 13 - Correlação de Pearson e vias ativadas.....	53
Figura 14 - Genes <i>upregulated</i> e <i>downregulated</i> em pacientes com artrite reumatoide e erosão óssea em comparação ao grupo de pacientes com artrite reumatoide sem erosão óssea.	54
Figura 15 - Heat map demonstrando o padrão de expressão gênica dos 50 melhores genes diferencialmente expressos	54
Figura 16 - Genes <i>upregulated</i> compartilhados entre o grupo de pacientes com artrite reumatoide e o grupo ARE	55

Figura 17 - Vias enriquecidas em pacientes com artrite reumatoide e erosão óssea.....	57
Figura 18 - Gráfico de ponto dos genes associados à artrite reumatoide	58
Figura 19 - Vias altamente ativadas em monócitos CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻ de pacientes com artrite reumatoide e erosão óssea	59
Figura 20 - Curva ROC de classificação de erosão óssea.....	59
Figura 21 - Correlação entre parâmetros clínicos e vias ativadas em pacientes com artrite reumatoide e erosão óssea	61
Figura 22 - Análise de vias enriquecidas por genes <i>downregulated</i> em monócitos CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻ de pacientes com artrite reumatoide e erosão óssea	62
Figura 23 - Correlação entre a ativação das vias: diferenciação osteoblástica e regulação da sinalização Wnt canônica	62
Figura 24 - Correlação entre parâmetros clínicos e vias <i>downregulated</i> em pacientes com artrite reumatoide e erosão óssea	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características demográficas, antropométricas e clínicas de todos os grupos	46
Tabela 2 - Top genes diferencialmente expressos em pacientes com artrite reumatoide em comparação ao grupo CT	48
Tabela 3 - Top genes diferencialmente expressos em pacientes com artrite reumatoide e erosão óssea em comparação ao sem erosão	56

RESUMO

Sales LP. Análise da expressão gênica de monócitos clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻) de pacientes com artrite reumatoide [Tese]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2023.

Introdução: Artrite reumatoide é uma doença inflamatória crônica caracterizada por um comprometimento ósseo localizado. A formação de erosões ósseas é resultado de um processo inflamatório persistente, que leva a uma produção aumentada de osteoclastos, células responsáveis pelo processo de reabsorção óssea local. Em condições inflamatórias, os monócitos clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻) são a principal fonte de precursores de osteoclastos. Embora estudos transcriptômicos prévios possam ter demonstrado que os monócitos CD14⁺⁺CD16⁻ apresentam maior expressão de genes envolvidos na inflamação e no processo de degradação da matriz extracelular, não há dados sobre o papel dos monócitos CD14⁺⁺CD16⁻ na destruição óssea da artrite reumatoide.

Objetivos: 1) Analisar o perfil transcriptômico de monócitos CD14⁺⁺CD16⁻ de pacientes com artrite reumatoide e comparar com controles saudáveis (CT); 2) Analisar o perfil transcriptômico de monócitos CD14⁺⁺CD16⁻ de pacientes com artrite reumatoide com erosão óssea (ARE) e comparar com pacientes sem erosão (ARSE). **Metodologia:** Foram incluídas no estudo 39 pacientes pré-menopausadas com artrite reumatoide. As pacientes foram divididas em dois grupos com base nos achados de erosões ósseas avaliadas por tomografia computadorizada quantitativa periférica de alta resolução (HR-pQCT) em 2^a e 3^a articulações metacarpofalângicas e interfalângicas proximais da mão dominante. Vinte mulheres saudáveis pareadas por idade e índice de massa corporal foram incluídas como grupo controle (CT). Para a análise do transcriptoma, monócitos CD14⁺⁺CD16⁻ foram isolados utilizando kit comercial (Myltenyi®). O sequenciamento de RNA em larga escala (RNA-seq) desta população foi realizado por meio da plataforma Illumina®. Os genes diferencialmente expressos foram identificados e a análise das vias biológicas foi realizada a partir de técnicas de bioinformática. **Resultados:** Monócitos CD14⁺⁺CD16⁻ de pacientes com artrite reumatoide apresentaram uma expressão diferenciada de genes associados à ativação da resposta imunológica e ao processo inflamatório

(*GDF15*, *CSF3*, *CCL7*, *MMP2*) em relação a controles saudáveis. Já os monócitos CD14⁺⁺CD16⁻ do grupo ARE, além de exibir uma superexpressão de genes associados à resposta imunológica, apresentam uma subexpressão daqueles relacionados ao metabolismo ósseo. Dentre os genes *upregulated* destacamos a expressão de *IL6* e *KLF14* relacionados à produção de citocinas pró-inflamatórias e à resposta imune inata e adaptativa. Por outro lado, genes relacionados ao metabolismo do colágeno (*LARP6*) e ao processo de formação óssea (*PAPPA*) estavam *downregulated* nesta população. As vias enriquecidas em pacientes com erosão foram associadas com maior ativação da imunidade e da inflamação. Curiosamente, vias associadas à diferenciação de osteoblastos e à regulação da via de sinalização Wnt estavam menos ativadas no grupo ARE. **Conclusão:** Esses achados sugerem que alterações em vias relacionadas ao processo inflamatório e ao comprometimento da formação óssea possuem um importante papel na fisiopatologia das erosões ósseas em pacientes com artrite reumatoide.

Palavras-chaves: Artrite reumatoide. Monócitos clássicos. Erosões ósseas. Inflamação. Osteogênese.

ABSTRACT

Sales LP. Gene expression of classical monocytes (CD14⁺⁺CD16⁻) from rheumatoid arthritis patients [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2023.

Background: Rheumatoid arthritis is an inflammatory autoimmune disease characterized by localized bone impairment. The development of bone erosions is triggered by chronic inflammation, which results in an elevated production of osteoclasts, accountable cells responsible for localized bone resorption process. Under inflammatory conditions, classical (CD14⁺⁺CD16⁻) monocytes are the main source of osteoclasts precursors. Although previous transcriptomic studies have shown that CD14⁺⁺CD16⁻ monocytes have high expression of genes involved in inflammation and in extracellular matrix degradation process, there is no data regarding the impact of CD14⁺⁺CD16⁻ monocytes on bone destruction in rheumatoid arthritis. **Objectives:** 1) To analyze CD14⁺⁺CD16⁻ monocytes transcriptomic profile from rheumatoid arthritis patients compared to health controls (CT); 2) To analyze CD14⁺⁺CD16⁻ monocytes transcriptomic profile from rheumatoid arthritis presenting bone erosions (ARE) compared to patients without erosion (ARSE). **Methods:** Thirty-nine premenopausal rheumatoid arthritis women were included in this study. Rheumatoid arthritis patients were classified into two groups according to the presence or absence of bone erosions evaluated by high-resolution peripheral quantitative computed tomography (HR-pQCT) on 2nd and 3rd metacarpophalangeal and proximal interphalangeal joints of the dominant hand. Twenty healthy subjects balanced with patients by age and body mass were enrolled in the control group (CT). CD14⁺⁺CD16⁻ monocytes were indirectly isolated using the CD16 MicroBeads (Myltenyi®), and RNA-Sequencing was performed using the Illumina® platform. The differentially expressed genes were identified and the analysis of the biological pathways was performed using bioinformatics tools. **Results:** CD14⁺⁺CD16⁻ monocytes from patients with rheumatoid arthritis show a differentiated expression of genes associated with the activation of the immune response and inflammatory process (*GDF15*, *CSF3*, *CCL7*, *MMP2*) compared to CT. The CD14⁺⁺CD16⁻ monocytes of the ARE group, in addition to exhibiting an overexpression of genes associated

with the immune response, present a downregulation of those related to bone metabolism. Among the upregulated genes, we highlight the expression of *IL6* and *KLF14* related to the production of pro-inflammatory cytokines and in the innate and adaptive immune response. Interestingly, the down-regulated genes were associated with bone formation (*PAPPA*) and collagen metabolism (*LARP6*). Enriched pathways in ARE group were associated with substantial activation of immunity and inflammation. Pathways associated with osteoblast differentiation and the regulation of Wnt signaling were less activated in ARE group. **Conclusion:** These findings suggest that variations in pathways related to the inflammatory process and to the impairment of bone formation might play a significant role in the pathophysiology of bone erosions in RA patients.

Keywords: Rheumatoid Arthritis. Classical monocytes. Bone erosions. Inflammation. Osteogenesis.

1. INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide é uma doença inflamatória crônica de natureza autoimune (Ahmed et al., 2016; Atzeni et al., 2021) caracterizada por destruição progressiva do osso e da cartilagem articular, resultando em disfunção articular e extra-articular (Petrovská et al., 2021; Rudan et al., 2015). Em sua etiologia estão envolvidos fatores genéticos (Gregersen et al., 1987; L. Zhang et al., 2017) e ambientais (Smolen et al., 2018). Dados epidemiológicos demonstram que a artrite reumatoide acomete cerca de 0,5-1% da população geral, o que a torna uma das doenças reumáticas mais prevalentes do mundo, acometendo cerca de três vezes mais o sexo feminino (Costenbader, 2008; Scott et al., 2010).

Indivíduos com artrite reumatoide apresentam comprometimento ósseo sistêmico e localizado, sendo o último caracterizado pela presença de cistos, osteopenia periarticular, além de erosões ósseas, que são consideradas achados típicos da doença (Heinlen & Humphrey, 2017). Erosões ósseas são definidas como rupturas na superfície do osso cortical e costumam ser acompanhadas pela perda do osso trabecular adjacente, constituindo um importante preditor de incapacidade, gravidade de doença e mortalidade em pacientes com artrite reumatoide. Estudos prévios sugerem que as erosões ósseas em pacientes com artrite reumatoide estão associadas com baixa densidade mineral óssea da mão (Hill et al., 2010), fêmur total e coluna lombar (Rossini et al., 2011).

Sabe-se que a formação de erosões ósseas, especialmente nas articulações sinoviais periféricas, é resultado de um processo inflamatório crônico no tecido sinovial. Isso porque na artrite reumatoide a membrana sinovial passa a desenvolver propriedades de órgão linfoide terciário, com ampla infiltração de linfócitos e principalmente de células da linhagem mieloide, o que

a torna mais espessa e com capacidade de invasão ao osso subcondral (Firestein & McInnes, 2017).

Células da linhagem mieloide são derivadas de células-tronco hematopoiéticas na medula óssea, e podem ser divididas didaticamente em células mononucleares e polimorfonucleares. Elas compreendem uma das principais defesas contra infecções, com um papel ímpar no controle da imunidade celular (Chaib et al., 2020; Falconer et al., 2018). No que tange às células mononucleares, elas podem ser divididas em células dendríticas e monócitos, que representam cerca de 5-10% dos leucócitos totais e são células fundamentais da resposta imune inata, e além de exercerem um importante papel regulador nos processos inflamatórios, desempenham funções específicas na localização de patógenos, regulação da homeostase do tecido e vigilância imunológica (Auffray et al., 2009; Davies et al., 2013).

No sangue periférico, os monócitos podem ser classificados em monócitos clássicos ($CD14^{++}CD16^{-}$), intermediários ($CD14^{++}CD16^{+}$) e não clássicos ($CD14^{+}CD16^{++}$) de acordo com a expressão de moléculas de superfície (Ziegler-Heitbrock et al., 2010). O receptor de superfície CD14 é considerado um co-receptor do *Toll-like receptor 4* (TLR4), que é o receptor do lipopolissacarídeo (LPS) de determinadas bactérias Gram-negativas. Por outro lado, o CD16 é o receptor de baixa afinidade para imunoglobulina G (FcγRIII) (Ziegler-Heitbrock, 2014). É importante ressaltar que essas subpopulações, além de apresentarem diferenças fenotípicas, também exibem diferenças funcionais (Aguilar-Ruiz et al., 2011; Ancuta et al., 2009; Belge et al., 2002).

A subpopulação $CD14^{++}CD16^{-}$ possui alta expressão de CD14 e ausência de CD16 (Ziegler-Heitbrock et al., 2010), representando cerca de 80-90% do

total de monócitos da circulação sanguínea. Ainda expressam o receptor de quimiocina CC tipo 2 (CCR2), o qual após ser ativado por diversas quimiocinas, em especial CCL2 e/ou CCL7 (Anbazhagan et al., 2014; Chu et al., 2014), levando à transmigração de monócitos CD14⁺⁺CD16⁻ para sítios inflamatórios, onde irão se diferenciar em macrófagos M1, subtipo mais pró-inflamatório. Eles ainda podem sofrer diferenciação em monócitos CD14⁺⁺CD16⁺, que irão deixar a circulação por morte, migração ou por diferenciação em monócitos CD14⁺CD16⁺⁺ (Patel et al., 2017; Sampath et al., 2018).

Os monócitos CD14⁺⁺CD16⁻, quando estimulados com LPS e complexos imunes, secretam altos níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-10 e TNF- α) e de metaloproteinase de matriz 1, enzima pertencente à família de enzimas zinco-dependentes relacionadas à degradação da matriz extracelular (Ingersoll et al., 2010; Wong et al., 2012). Além disso, os monócitos CD14⁺⁺CD16⁻ possuem uma maior capacidade fagocítica, maior produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e conseqüentemente, uma atividade microbicida superior quando comparado às demais subpopulações (Sampath et al., 2018).

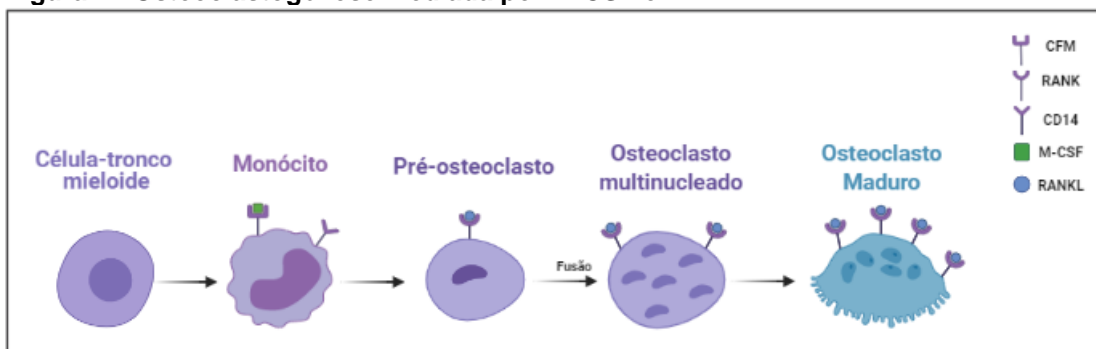
Dados preliminares demonstraram que a frequência dos subtipos de monócitos é diferente entre indivíduos saudáveis e indivíduos com artrite reumatoide (Cairns et al., 2002; Rossol et al., 2012), sendo que a concentração sérica de monócitos CD14⁺⁺CD16⁻ é moderadamente maior em pacientes com artrite reumatoide (Klimek et al., 2014).

A elevação da população plasmática de monócitos CD14⁺⁺CD16⁻ em pacientes com artrite reumatoide poderia agravar o processo inflamatório articular e conseqüentemente a destruição óssea (Rana et al., 2018), uma vez que os monócitos CD14⁺⁺CD16⁻ de humanos são a principal fonte de células

precursoras de osteoclastos, tanto em condições normais quanto na artrite inflamatória (Charles et al., 2012; Chiu et al., 2010; Lari et al., 2009).

A osteoclastogênese é um processo de diferenciação de monócitos/macrófagos em osteoclastos (Figura 1) (Massey & Flanagan, 1999; Udagawa et al., 1990, 2021), que ocorre a partir da fusão de monócitos após a sua interação com o fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF) e com o ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL), ambos liberados por osteoblastos (Takahashi et al., 1988; Udagawa et al., 2021). O M-CSF ainda é capaz de estimular a expressão do receptor ativador de fator nuclear kappa B (RANK) em monócitos, promovendo a diferenciação e a manutenção da sobrevivência de osteoclastos (Udagawa et al., 2021; Zhao et al., 2016).

Figura 1 - Osteoclastogênese mediada por M-CSF e RANKL



Fonte: Produção do próprio autor

Corroborando com este processo, os monócitos de pacientes com artrite reumatoide expressam o receptor associado a osteoclastos (OSCAR) que, ao interagir com seus ligantes (colágeno do tipo I e II) facilita o processo de osteoclastogênese (Greisen et al., 2015; Schultz et al., 2016). Quando ativados, os osteoclastos além de liberarem ácido clorídrico, responsável por solubilizar o cálcio presente na matriz óssea, produzem catepsina K e metaloproteinases de matriz, que degradam a matriz remanescente do osso levando a erosões ósseas

justas articulares (Rana et al., 2018). De fato, o bloqueio de CD11b, receptor encontrado na superfície de monócitos clássicos e que atua como regulador negativo da diferenciação de monócitos em osteoclastos, levou à diminuição da diferenciação da linhagem de macrófagos RAW 264.7 para precursores de osteoclastos induzida por RANKL (Hayashi et al., 2008).

Diante disso, o sequenciamento do transcriptoma de monócitos CD14⁺⁺CD16⁻ de pacientes com artrite reumatoide com e sem erosão óssea, bem como de controles saudáveis, irá permitir a identificação de genes potencialmente envolvidos na fisiopatologia da erosão óssea, uma vez que a detecção de genes candidatos poderá ser utilizada como biomarcador preditivo de atividade de doença, reparação e como ferramenta na avaliação de resposta a medicamentos.

Em relação às técnicas de sequenciamento do transcriptoma, o Sequenciamento de Nova Geração (NGS, do inglês *next-generation sequencing*) emerge como uma tecnologia de sequenciamento em larga escala na qual os fragmentos são sequenciados simultaneamente. Dentre os métodos de NGS podemos destacar o sequenciamento de RNA em larga escala (RNA-seq, do inglês RNA sequencing), uma técnica altamente precisa e sensível, capaz de mensurar a expressão de todo o transcriptoma. Em comparação a outros métodos de avaliação de transcriptoma (e.g. chip de *microarray*), o RNA-Seq fornece uma maior cobertura, uma melhor resolução e uma quantificação mais precisa da expressão gênica. Além de quantificar a expressão gênica, os dados gerados pelo RNA-Seq facilitam a descoberta de novos transcritos, a identificação de genes que sofreram *splicing* alternativo e a detecção de expressão alelo-específica (Kukurba & Montgomery, 2015). Cabe ressaltar que

essas tecnologias já foram utilizadas anteriormente para elucidar o papel de outras células imunológicas na patogênese da artrite reumatoide (Fonseka et al., 2018; Rao et al., 2017; F. Zhang et al., 2019).

Assim, ainda que a literatura apresente evidências de que os subconjuntos de monócitos do sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide possam estar diretamente envolvidos na osteoclastogênese, a real influência dos monócitos CD14⁺⁺CD16⁻ neste processo ainda é desconhecida. É fundamental salientar que grande parte dos estudos disponíveis foram realizados em modelos experimentais (Koizumi et al., 2009; Puchner et al., 2018), e que até o momento não existem trabalhos analisando, por meio de ferramentas de bioinformática, o perfil transcriptômico dos monócitos CD14⁺⁺CD16⁻ e suas possíveis vias de interação gênica e/ou de sinalização imunológicas em mulheres com artrite reumatoide com e sem erosão óssea.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi avaliar o perfil transcriptômico de monócitos CD14⁺⁺CD16⁻ nos seguintes grupos:

1. Pacientes do sexo feminino pré-menopausadas, com artrite reumatoide e mulheres saudáveis.
2. Pacientes do sexo feminino pré-menopausadas, com artrite reumatoide e erosão óssea (ARE), e pacientes do sexo feminino pré-menopausadas, com artrite reumatoide sem erosão óssea (ARSE).

3. MÉTODOS

3.1 Pacientes e Controles

Foram incluídas neste trabalho 39 pacientes com artrite reumatoide, do sexo feminino, com idade entre 18 e 50 anos, em seguimento regular no ambulatório de artrite reumatoide do serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Todas as pacientes preenchem os critérios do *American College of Rheumatology / European League Against Rheumatism* (Aletaha et al., 2010). Vinte mulheres saudáveis, pareadas pela idade e índice de massa corporal (IMC), que estudavam e/ou trabalhavam na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, ou seus familiares, foram incluídas como grupo controle (CT).

Critérios de Inclusão utilizados para o grupo de pacientes com artrite reumatoide:

- ✓ Sexo feminino.
- ✓ Idade entre 18-50 anos.
- ✓ Dose de glicocorticoide $\leq 7,5$ mg/dia

Critérios de exclusão utilizados para o grupo de pacientes com artrite reumatoide:

- ✓ Doenças autoimunes associadas.
- ✓ Pós-menopausa.
- ✓ Gestação atual.
- ✓ Insuficiência renal.
- ✓ Diabetes.
- ✓ Doenças disabsortivas e/ou doenças do metabolismo ósseo: hiperparatireodismo, doença de Paget e displasias ósseas, neoplasias.

- ✓ Uso de imunobiológicos e/ou bisfosfonatos.

Critérios de Inclusão utilizados para o grupo CT:

- ✓ Sexo feminino.
- ✓ Idade entre 18-50 anos.
- ✓ Ausência de doenças osteometabólicas.

Critérios de exclusão utilizados para o grupo CT:

- ✓ Doenças autoimunes e/ou doenças crônicas não transmissíveis.
- ✓ Pós-menopausa.
- ✓ Gestação atual.
- ✓ Doenças disabsortivas e/ou doenças do metabolismo ósseo: hiperparatireodismo, doença de Paget e displasias ósseas, neoplasias.
- ✓ Uso de drogas que possam interferir no metabolismo ósseo.

As pacientes com artrite reumatoide foram divididas em dois grupos (ARE e ARSE), com base na presença ou não de erosões ósseas periféricas, avaliadas por imagens geradas pelo escaneamento realizado por tomografia computadorizada quantitativa periférica de alta resolução (HR-pQCT) nas regiões de 2ª e 3ª articulações metacarpofalângicas (MCF), além de 2ª e 3ª articulações interfalângicas proximais (IFP) da mão dominante.

Este trabalho, como parte de um projeto temático, recebeu financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo: 2016/00006-7. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Local em Pesquisa Humana do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP sob o número 51178115.1.0000.0068 (Anexo A). Todas as participantes leram e

assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido de acordo com a Declaração de Helsinque (Anexos B e C).

3.2 Avaliação clínica e laboratorial

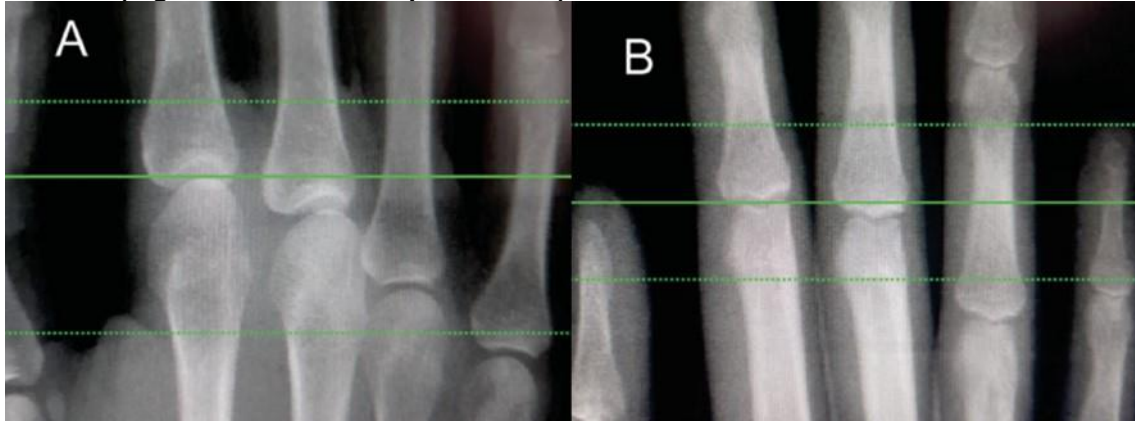
Dados clínicos e demográficos foram obtidos por meio de prontuário eletrônico e entrevista com médico reumatologista do serviço. A atividade de doença foi avaliada pelo Índice Simplificado de Atividade de Doença (SDAI, do inglês *Simplified Disease Activity Index*). Valores séricos de Proteína C-Reativa (PCR) e Fator Reumatoide (FR) foram determinados a partir do método imunoturbidimétrico. A técnica da Velocidade de Hemossedimentação (VHS) foi realizada pelo método Westergren automatizado e a análise do anti-peptídeo citrulinado cíclico (anti-CCP) foi realizada pelo método ELISA.

3.3 Avaliação das erosões ósseas

A análise de erosões ósseas das pacientes com artrite reumatoide foi realizada utilizando imagens escaneadas por HR-pQCT (Xtreme CT Scanco Medical AG, Brüttisellen, Suíça), utilizando o protocolo estabelecido pelo *Study group for x-trEme Computed Tomography in Rheumatoid Arthritis* (SPECTRA) (Stok et al., 2017). O exame de HR-pQCT foi realizado nas seguintes regiões: 2ª e 3ª articulações MCF, além de 2ª e 3ª articulações IFP da mão dominante (Figuras 2A e 2B), sendo que cada superfície óssea foi analisada separadamente como se segue: nas articulações MCF foram avaliadas as cabeças de 2º e 3º ossos metacarpos, e bases de 2ª e 3ª falanges proximais; e nas articulações IFP foram analisadas as cabeças de 2ª e 3ª falanges proximais, e bases de 2ª e 3ª falanges médias; assim, um total de 8 superfícies ósseas da mão dominante de cada indivíduo participante do estudo, foram avaliadas individualmente quanto à

presença ou ausência de erosões, quantificação do número de erosões, bem como o volume da maior erosão de cada superfície óssea analisada.

Figura 2 - Radiografias simples geradas pela HR-pQCT para a região de interesse a ser avaliada (região entre as linhas pontilhadas)



O operador posiciona a linha de referência (linha contínua) no ponto médio da superfície articular côncava na base da cabeça do 2º osso metacarpo (A), estendendo-se 9,02 mm na direção distal e 18,04 mm na direção proximal. Para avaliação das articulações interfalângicas proximais (B), a linha de referência é colocada na cabeça da 2ª falange proximal, estendendo-se 9,02 mm em ambas as direções.

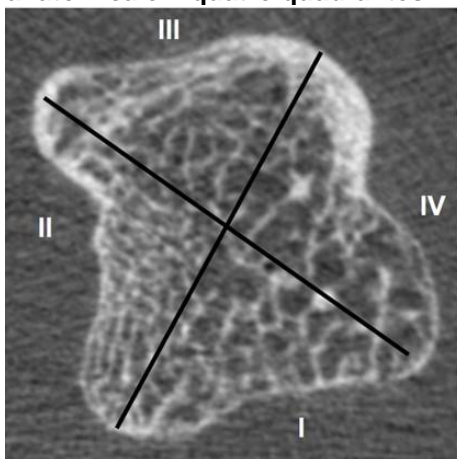
Resumidamente, o antebraço das participantes fica apoiado em um suporte de fibra de carbono produzido pelo fabricante (Scanco), com a face palmar voltada para baixo, garantindo uma varredura adequada das MCFs e IFPs e minimizando a ocorrência de artefatos de movimento, devido à fixação realizada com fitas em velcro, material já previamente confeccionado pelo fabricante.

Após a aquisição das imagens na HR-pQCT, uma reconstrução 3D foi realizada e em seguida todas as imagens foram exportadas no formato *Digital Imaging and Communications in Medicine* (DICOM). Depois disso, as imagens em DICOM foram analisadas por meio do software OsiriX (OsiriX Lite, v.11.0.2 32 bits), por reumatologista com elevada *expertise* (CF) e as erosões ósseas foram então identificadas seguindo uma definição padronizada pelo grupo SPECTRA. As erosões foram definidas como uma perda de continuidade da

cortical, visualizadas em pelo menos dois cortes consecutivos e em dois planos perpendiculares, acompanhada de rarefação do osso trabecular adjacente (Barnabe et al., 2016).

Após a identificação, as erosões ósseas foram delineadas de forma semiautomática, sendo essencial que o primeiro e o último corte da erosão fossem contornados. Caso a erosão fosse muito irregular também era possível contornar todos os cortes. Finalmente, após a erosão ter sido definida pelo operador e segmentada semi-automaticamente corte por corte (definida como região de interesse = ROI), o volume total foi calculado automaticamente pelo software OsiriX e o resultado foi registrado em milímetros cúbicos, com uma reconstrução 3D da erosão processada (Figueiredo et al., 2021). Para a localização exata das erosões ósseas cada superfície óssea foi dividida em 4 quadrantes (I = palmar, II = ulnar, III = dorsal e IV = radial) (Figura 3), conforme protocolo SPECTRA. O número total de erosões ósseas foi contabilizado, e aquelas superfícies ósseas com mais de uma erosão, foi mensurada volumetricamente apenas a maior erosão de cada superfície óssea, sempre identificando o quadrante que a erosão estava (Figueiredo et al., 2021).

Figura 3 - Varredura da cabeça do 2º osso metacarpo pela HR-pQCT, com divisão anatômica em quatro quadrantes

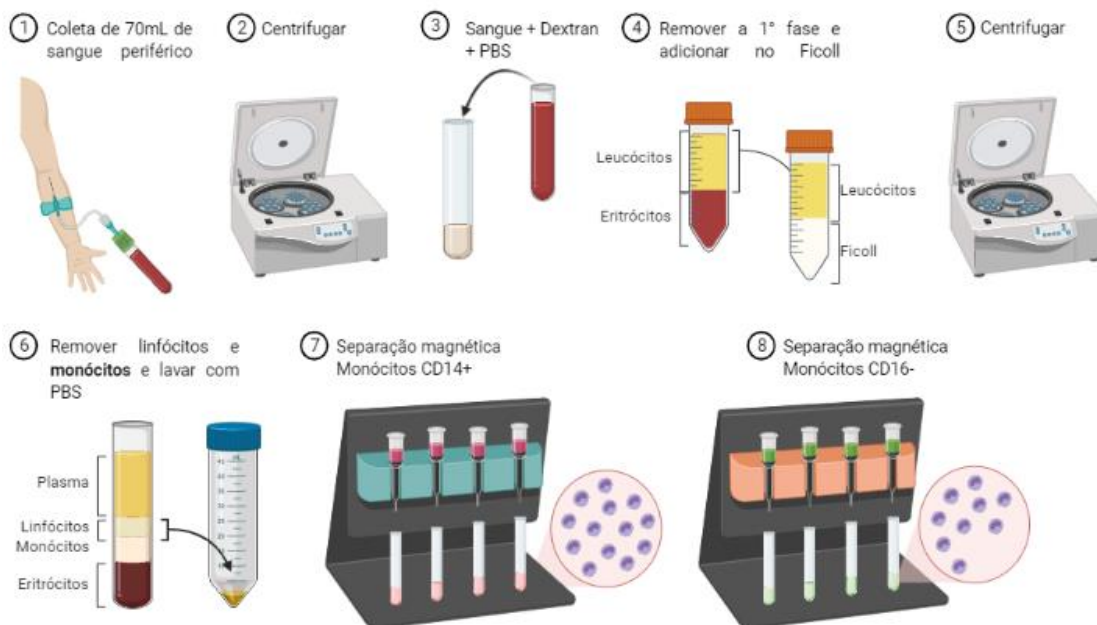


Quadrantes: I (palmar), II (ulnar), III (dorsal) e IV (radial) [Fonte: Figueiredo et al., 2021]

3.4 Isolamento de monócitos clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻)

Amostras de sangue periférico total (70 mL) de todas as participantes do estudo foram coletadas por punção venosa durante o jejum, e armazenadas em tubos a vácuo *BD Vacutainer System*® com anticoagulante K3EDTA (0,15 mg/mL, Becton Dickinson, USA). As células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram isoladas por densidade de ficoll-hypaque e sedimentação de dextrano. As PBMCs foram então marcadas com anticorpos monoclonais, conjugados à biotina, contra antígenos não expressos em monócitos humanos, utilizando o kit comercial *Pan Monocyte Isolation* (Myltenyi®, Germany). Na sequência foram adicionados *microbeads* conjugados aos anticorpos monoclonais anti-biotina, que por separação magnética permitiu o isolamento de uma população pura de monócitos no filtrado. Todo processo de isolamento foi realizado pelo doutorando. Os monócitos foram marcados com anticorpos CD16⁺, permitindo a separação das subpopulações. Os monócitos CD14⁺⁺CD16⁻ foram isolados por seleção negativa (Figura 4).

Figura 4 - Isolamento de monócitos CD14⁺⁺CD16⁻



Fonte: Produção do próprio autor

3.5 Extração e quantificação de RNA

Após o isolamento da subpopulação de monócitos CD14⁺⁺CD16⁻ as células foram mantidas em tampão RLT na presença de β - mercaptoetanol, a 80°C a fim de evitar a degradação do RNA. A extração de RNA foi realizada pelo doutorando, utilizando o kit comercial *RNeasy Plus Mini* (Qiagen®), seguindo as orientações do fabricante. Nesta etapa, os lisados celulares foram centrifugados utilizando o homogeneizador *QIAshredder* (Qiagen®) e posteriormente, para eliminação de contaminação com DNA genômico, as amostras foram centrifugadas em gDNA Eliminator (Qiagen®). Após a extração, a concentração e a qualidade do RNA foram avaliadas por espectrofotometria (NanovueTM Plus). Os RNAs extraídos foram mantidos a -80°C até serem submetidos à análise de transcriptoma.

3.6 Avaliação da integridade do RNA

A integridade das amostras de RNA foi avaliada pelo método *ScreenTape* utilizando o equipamento Bioanalyser 2100 (Agilent®), seguindo as orientações do fabricante. Neste processo, 5 μ l de tampão foi adicionado a 1 μ l das amostras de RNA que foram desnaturadas a 72°C. Após esta etapa as amostras foram submetidas a uma eletroforese capilar automatizada a fim de ser estimada a integridade do RNA. A integridade das amostras foi classificada entre valores de 1 a 10, sendo 10 o valor de melhor integridade.

3.7 Preparo da biblioteca e sequenciamento de RNA em larga escala (RNA-seq)

A construção da biblioteca de RNA foi realizada no laboratório multiusuário de Sequenciamento em Larga Escala (SELA) utilizando o kit *QuantSeq 3' mRNA-Seq Library Prep* (Lexogen®), seguindo as orientações do

fabricante. O RNA-seq foi realizado no SELA a partir da plataforma Illumina® utilizando kit *NSQ 500/550 Hi Output KT v2.5*.

3.8 Análises da bioinformática

Após o sequenciamento foi realizada a análise dos dados de RNA-seq por um profissional de bioinformática (BWH):

Controle de qualidade e alinhamento com genoma de referência:

Um controle de qualidade rigoroso dos dados oriundos do sequenciamento (Fastq) foi realizado usando a ferramenta FastQC. Com o auxílio do software *BBDuk (Ref)* foi realizada a remoção de bases com baixa qualidade e de sequências correspondentes à cauda de poli-adenina (poly-A). Dessa forma, apenas os dados brutos de alta qualidade foram incluídos no presente estudo. Em seguida, os *reads* foram alinhados com o genoma humano de referência (GRCh38/Ensembl) utilizando o software *STAR (Ref)*. A anotação e a preparação dos dados do sequenciamento para as análises foram realizadas no software R versão 4.1.

Contagem dos reads de cada gene com HTseq-count e análise de expressão diferencial:

A contagem de *reads* foi realizada com a ferramenta *HTseq-count (Ref)* que produz um dado tabular de *reads* não normalizados. Os *reads* foram pré-filtrados para eliminar os genes não expressos. A análise de expressão diferencial, baseada na distribuição binomial negativa, foi realizada utilizando a ferramenta *DESeq2* e envolveu a comparação dos níveis de expressão dos genes dos pacientes com artrite reumatoide com os do grupo CT. Nesta primeira análise os pacientes com artrite reumatoide foram avaliados como grupo único, independente da presença ou ausência de erosões. Na análise seguinte, os

pacientes com artrite reumatoide foram então categorizados em dois grupos com base na presença ou ausência de erosão (ARE e ARSE).

A expressão diferencial foi realizada por meio de um teste de razão de verossimilhança (LRT, do inglês *likelihood ratio test*) para comparar as diferenças entre os grupos. Finalmente, uma comparação *pairwise* foi realizada entre os grupos de pacientes para identificar os genes diferencialmente expressos no grupo ARE utilizando o teste de Wald. Em ambas as análises, os genes diferencialmente expressos foram identificados com base em uma mudança relativa (\log_2 fold-change) $> 1,5$ e uma taxa de descoberta falsa (FDR, do inglês *false discovery rate*) de $< 0,05$.

Avaliação das vias associadas e de correlação com dados clínicos e laboratoriais entre os grupos:

Os principais processos biológicos associados aos genes diferencialmente expressos mais bem classificados, foram determinados por curadoria manual. Além disso, análises de enriquecimento de genes foram realizadas utilizando os algoritmos implementados na ferramenta GenePattern: 1) análise de enriquecimento de um conjunto de genes (GSEA, do inglês Gene Set Enrichment Analysis) e 2) análise de enriquecimento de um conjunto de genes para amostra (ssGSEA, do inglês single-sample GSEA). Correlações de Pearson (r) entre a ativação de vias e dados clínicos foram realizadas. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. A rede constituída pelas vias GSEA significativas e seus genes compartilhados interconectados, foi reconstruída no Cytoscape. A conectividade de rede foi analisada para identificar os *hub genes* com base em sua medida de centralidade (maior grau).

A lista de genes relevantes associados à artrite reumatoide foi extraída da plataforma *Open Target*, que integra dados públicos relevantes para a associação entre alvos e doenças, incluindo dados de genética, mutações somáticas, análise de expressão, fármacos e modelos animais. A pontuação mediana da associação *Open Target* e a centralidade dos genes regulados positivamente foram usadas para priorizar alvos relevantes na artrite reumatoide.

Gráficos (*Volcano plot* e *Heatmaps*) foram projetados usando o pacote *ggplot2* e o pacote *ComplexHeatmap* respectivamente. Os *Heatmaps* foram escalados pelo z-score e agrupados usando agrupamento hierárquico.

3.9 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS, 22.0, SPSS Inc). Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão para variáveis contínuas e como porcentagem para variáveis categóricas. A hipótese de distribuição normal foi verificada pelo teste de *Shapiro-Wilk*. Variáveis quantitativas foram analisadas pelo teste t de *Student* ou pelo teste de análise de variância (ANOVA) (distribuição normal). O teste de *Mann-Whitney* ou *Kruskal-Wallis* foram aplicados para variáveis que apresentavam distribuição não normal. As associações entre as variáveis categóricas foram avaliadas com o teste do Qui-quadrado ou teste exato de *Fisher*. O teste de *Bonferroni* foi utilizado para correção *post-hoc* de comparações múltiplas. Foi definido o grau de significância com $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

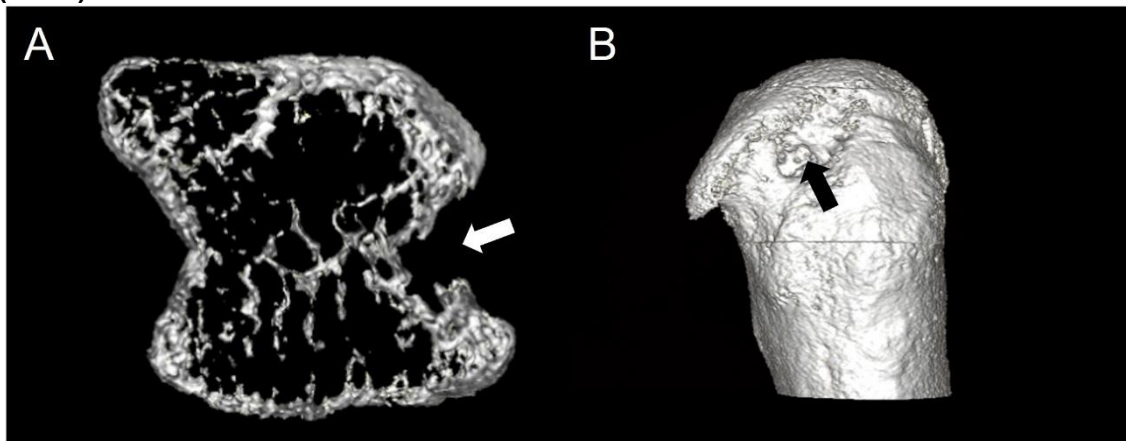
4.1 Características gerais

Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos em relação à idade, IMC e raça ($p > 0,05$). O grupo ARE apresentou valores significativamente maiores de VHS em comparação ao grupo ARSE ($p = 0,018$) e ao grupo CT ($p = 0,022$). Além disso, a positividade dos autoanticorpos (FR e anti-CCP) foi maior no grupo ARE em relação ao grupo ARSE óssea (Tabela 1).

4.2 Avaliação das erosões ósseas

Noventa e oito erosões ósseas foram encontradas no grupo ARE ($3,8 \pm 3,5$ erosões/paciente com volume médio de $13,5 \pm 18,4 \text{ mm}^3$). O principal local das erosões ósseas foi na região da MCF (75,7%), especificamente no quadrante IV (radial). Na **figura 5** é possível observar uma erosão na cabeça do osso metacarpo da 2ª MCF de uma paciente do grupo ARE.

Figura 5 - Imagem de HR-pQCT da cabeça do osso metacarpo da 2ª MCF, quadrante IV (radial)



Corte axial (A) e reconstrução 3D (B).

4.3 Quantificação e integridade do RNA

As concentrações totais de RNA nas amostras de monócitos $\text{CD14}^{++}\text{CD16}^{-}$ nos grupos ARE, ARSE e CT foram de $95 \pm 71 \text{ ng}/\mu\text{L}$, $71 \pm 53 \text{ ng}/\mu\text{L}$ e $107 \pm 82 \text{ ng}/\mu\text{L}$, respectivamente. A avaliação da qualidade do RNA demonstrou que todas as amostras apresentaram uma relação $\text{A260}/\text{A280} \geq 1,9$, o que

demonstra baixo risco de contaminação do RNA com proteína. Todas as amostras apresentaram uma integridade ≥ 8 .

Tabela 1 - Características demográficas, antropométricas e clínicas de todos os grupos

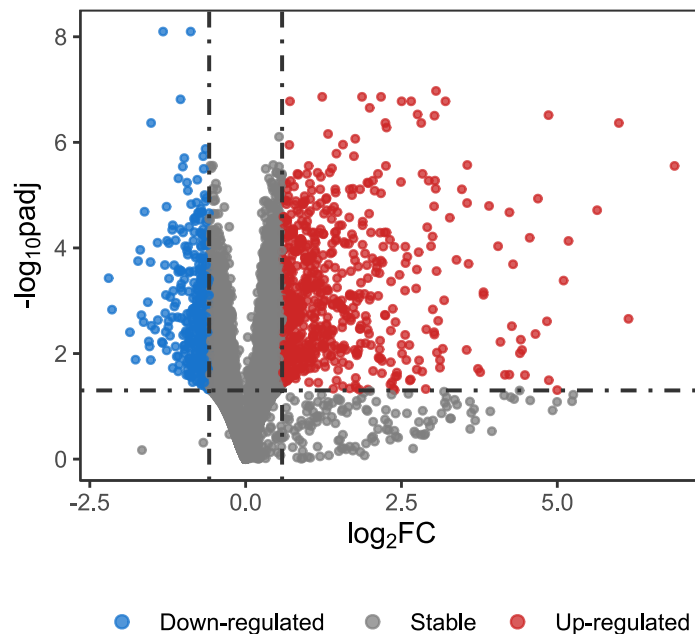
	ARE (n=26)	ARSE (n=13)	CT (n=20)	P
Idade, anos	38,8±7,1	36,6±6,6	38,6±6,8	0,635
IMC, kg/m ²	26,4±4,7	26,4±5,4	25,7±5,1	0,857
Raça, N° (%)				
Branca	17 (65,4)	8 (61,5)	15 (75)	0,296
Preta	3 (11,5)	3 (23,1)	0 (0)	
Parda	6 (23,1)	2 (15,4)	5 (25)	
VHS, mm/h	12,0 (7,5 - 28)	6,0 (3,1 - 11,5)	7,0 (4,0 - 10,0)	0,005^{a,b}
Proteína C-reativa, mg/L	3,4 (0,8 - 8,6)	2,2 (0,5 - 8,0)	1,1 (0,8 - 2,6)	0,111
Tempo de doença, anos	8,0 (3,8 - 12,8)	7 (3,5 - 10,5)	-	0,501
Fator reumatoide, n (%)	26 (100)	10 (76,9)	-	0,031
anti-CCP, n (%)	24 (92,3)	7 (53,8)	-	0,010
SDAI	19,1 (11,2 - 25,5)	13,2 (5,5 - 19,8)	-	0,140
Glicocorticoide, n (%)	12 (46,2)	7 (53,8)	-	0,651
Glicocorticoide, mg/dia	5,0 (5,0 - 5,0)	5,0 (3,0 - 7,5)	-	0,606
DMARDs, n (%)	25 (96,2)	11 (84,6)	-	0,253

Valores expressos em média \pm desvio padrão, mediana (intervalo interquartil) ou n (porcentagem); ARE: Artrite reumatoide com erosão óssea; ARSE: artrite reumatoide sem erosão óssea; CT: Controle; IMC: Índice de Massa Corporal; VHS: Velocidade de hemossedimentação; anti-CCP: Anticorpo antipeptídeo citrulinado cíclico; SDAI: Índice Simplificado de Atividade de Doença, do inglês *Simplified Disease Activity Index*; DMARDs: fármacos sintéticos modificadores do curso da doença, do inglês *Disease-modifying antirheumatic drugs*. a: Controle \neq artrite reumatoide com erosão; b: artrite reumatoide com erosão \neq artrite reumatoide sem erosão. Significância: p <0,05.

4.4 Expressão gênica de monócitos CD14⁺⁺CD16⁻ de pacientes com artrite reumatoide

A avaliação da expressão gênica de monócitos CD14⁺⁺CD16⁻ identificou 1.050 genes diferencialmente expressos no grupo de pacientes com artrite reumatoide (incluindo ARE e ARSE), em comparação ao grupo CT (Figura 6). Dos 1.050 genes, 693 estavam superexpressos (*upregulated*) e 357 subexpressos (*downregulated*).

Figura 6 - Genes *upregulated* e *downregulated* em pacientes com artrite reumatoide em comparação ao grupo controle.



Os 10 melhores genes diferencialmente expressos (*upregulated* e *downregulated*) estão disponíveis na Tabela 2. Enquanto os genes ligados ao processo inflamatório e à ativação da resposta imunológica (*GDF15*, *CSF3*, *CCL7*, *MMP2*) estavam *upregulated*, aqueles relacionados à formação de colágeno (*COL26A1*) e à mineralização óssea (*CCDC154*) estavam *downregulated* nos pacientes com artrite reumatoide vs. grupo CT.

Tabela 2 - Top genes diferencialmente expressos em pacientes com artrite reumatoide em comparação ao grupo CT

Genes	Ave FC	FDR	Processo biológico
<i>Upregulated</i>			
GDF15	117,85	< 0,0001	Atividade de citocinas.
MMP2	70,62	0,0020	Degradação da matriz extracelular.
CSF3	63,46	< 0,0001	Imunidade inata.
UCHL1	49,84	< 0,0001	Sistema ubiquitina-proteassomo.
PITX1	36,24	< 0,0001	Crescimento e desenvolvimento celular.
CCDC80	34,32	0,0004	Adesão celular.
TMEM233	31,97	0,0490	Componente integral da membrana.
MLXIPL	29,12	0,0300	Homeostase de carboidratos e ácidos graxos.
CCL7	29,02	< 0,0001	Imunidade inata.
AKR1C1	28,52	0,0020	Metabolismo do colesterol.
<i>Downregulated</i>			
COL26A1	0,22	0,0003	Formação de colágeno.
COQ8A	0,23	0,0010	Biossíntese da coenzima Q10 e produção de ATP.
CAGE1	0,28	0,0039	Antígeno de câncer de testículo.
CCDC154	0,29	0,0100	Mineralização e maturação óssea.
KCNK17	0,30	0,0001	Transporte de potássio.
BCO2	0,31	0,0001	Biossíntese de vitamina A.
KRTCAP2	0,31	0,0018	Modificação de peptidil-arginina.
SEC31B	0,32	< 0,0001	Função desconhecida.
OMG	0,32	< 0,0001	Desenvolvimento e funcionamento do sistema nervoso
RPP21	0,34	0,0010	Atividade da ribonuclease P.

Os genes foram classificados de acordo com o *fold change*. FC: Fold-change; Ave FC: average FC; FDR: *False Discovery Rate*.

O agrupamento não-supervisionado das amostras usando o padrão de expressão gênica dos 50 melhores genes diferencialmente expressos (25 *upregulated* e 25 *downregulated*) revelou uma clara estratificação entre pacientes e CT (Figura 7). A partir da lista de genes *upregulated*, observou-se um enriquecimento de genes associados à atividade de citocinas e seus receptores (Figura 8).

Figura 7 - Heat map demonstrando o padrão de expressão gênica dos 50 melhores genes diferencialmente expressos

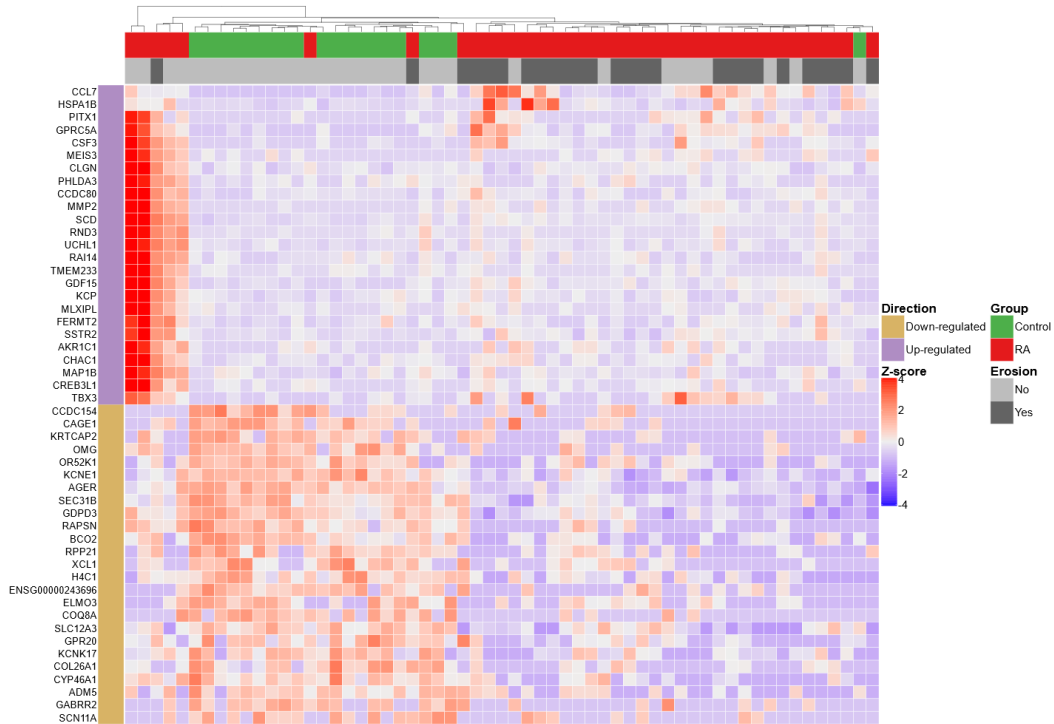
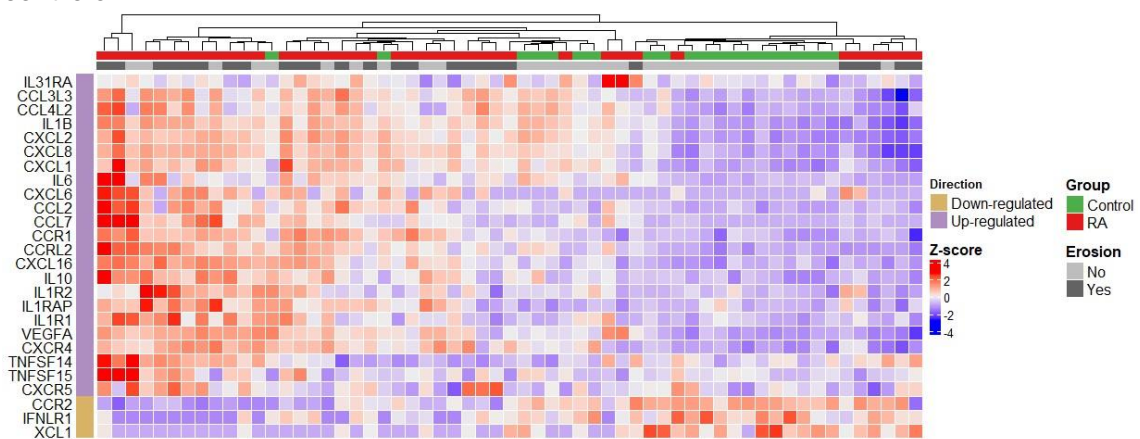


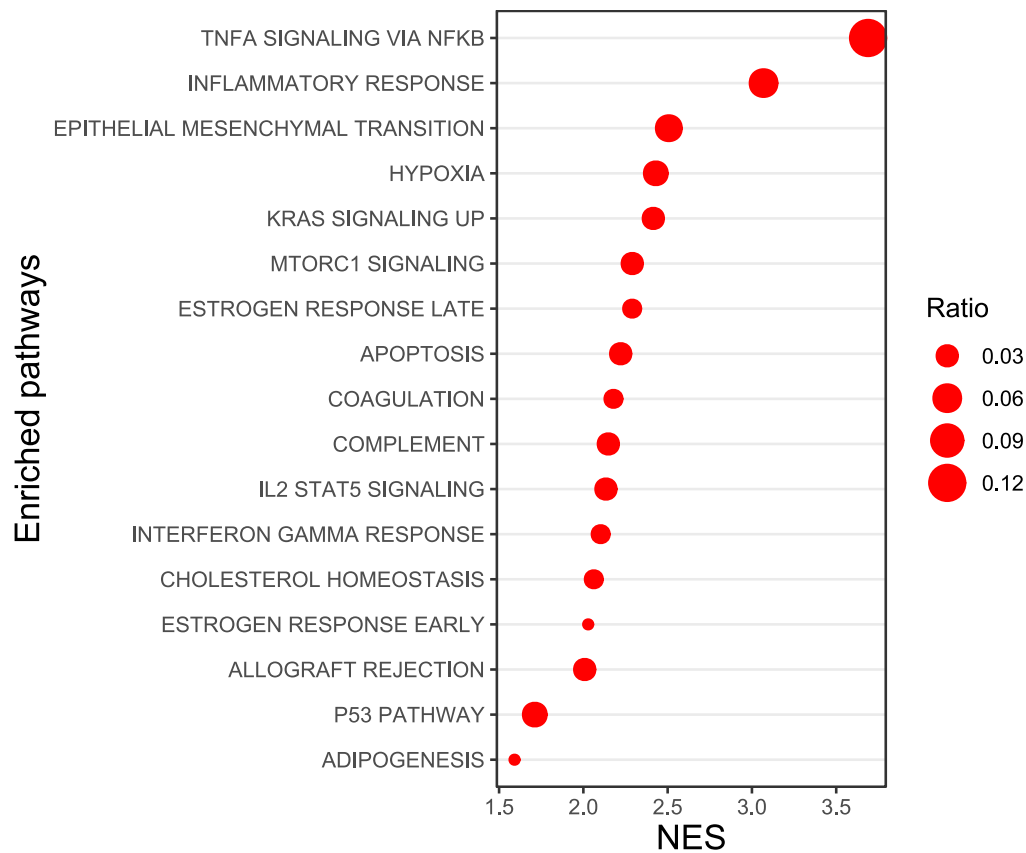
Figura 8 - Heat map demonstrando o enriquecimento de genes associados à atividade de citocinas e seus receptores em pacientes com artrite reumatoide em comparação ao grupo controle



Corroborando com esses achados, a análise funcional de enriquecimento do conjunto de genes utilizando todos os genes *upregulated*, demonstrou um aumento na ativação de vias associadas à inflamação (Figura 9 e Figura 10), nos monócitos CD14⁺⁺CD16⁻ do grupo de pacientes com artrite reumatoide (ARE e ARSE) em comparação com ao grupo CT.

Uma rede de interação (Figura 11) foi construída com base nas vias demonstradas na Figura 9 e seus respectivos genes diferencialmente expressos. A partir da medida de centralidade (*Degree Centrality*), o gene *IL6* foi identificado como o gene que possui o maior número de conexões e/ou interações (*hub genes*).

Figura 9 - Gráfico de pontos demonstrando os processos biológicos associados aos genes diferencialmente expressos



O tamanho dos pontos representa a proporção de genes diferencialmente expressos envolvidos em cada processo, e o eixo X indica o escore GSEA normalizado. Foram consideradas significativas as vias com valor de $p < 0,05$. NES: *Normalized Enrichment Score*.

Figura 10 - Heat map da análise funcional de enriquecimento do conjunto de genes demonstrando uma estratificação do grupo de pacientes com artrite reumatoide e do grupo controle

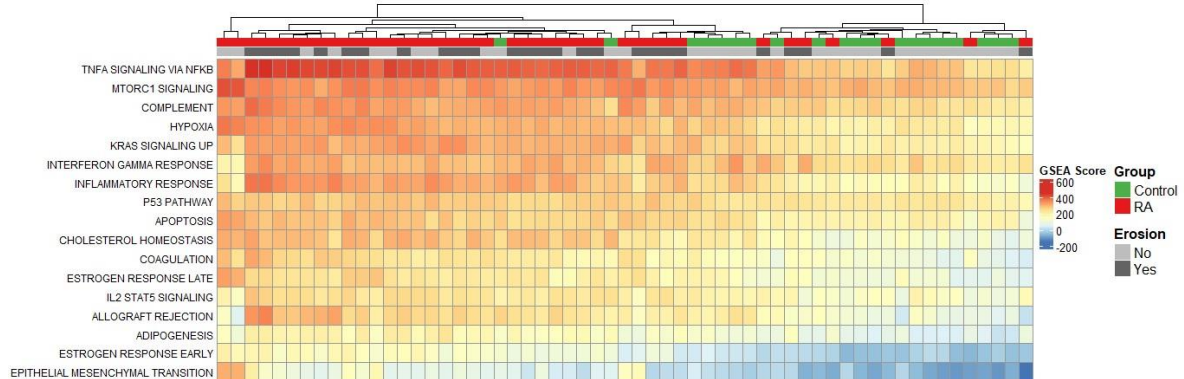
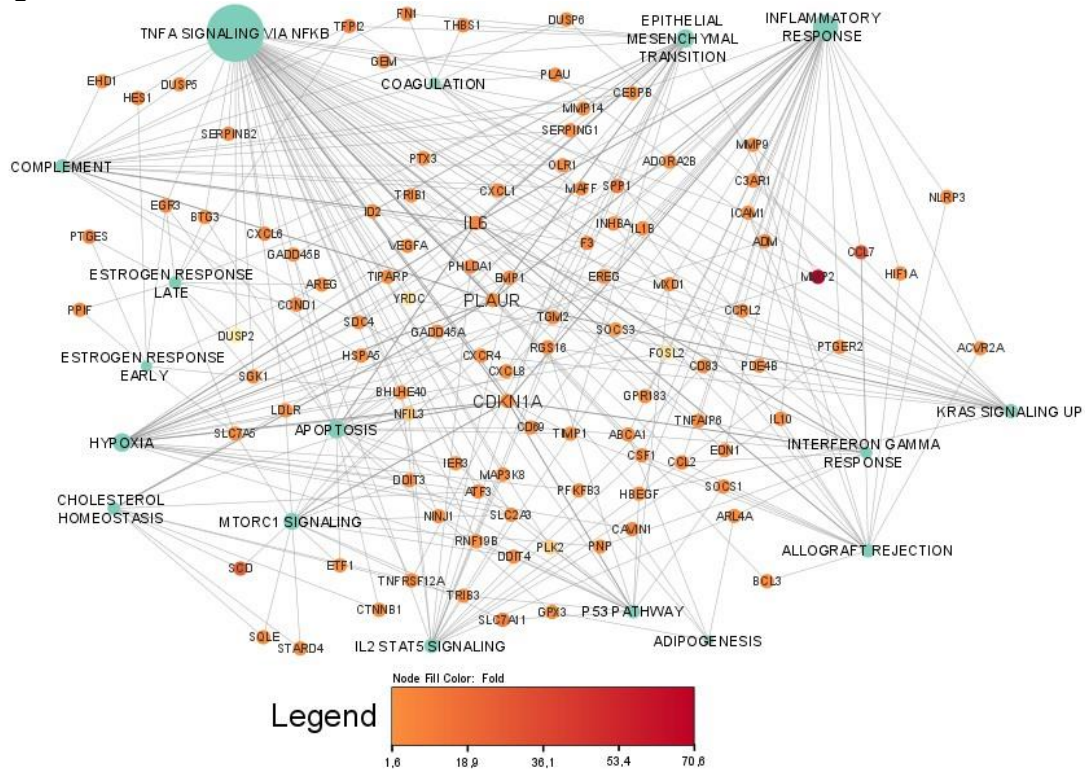


Figura 11 - Análise de conectividade de rede

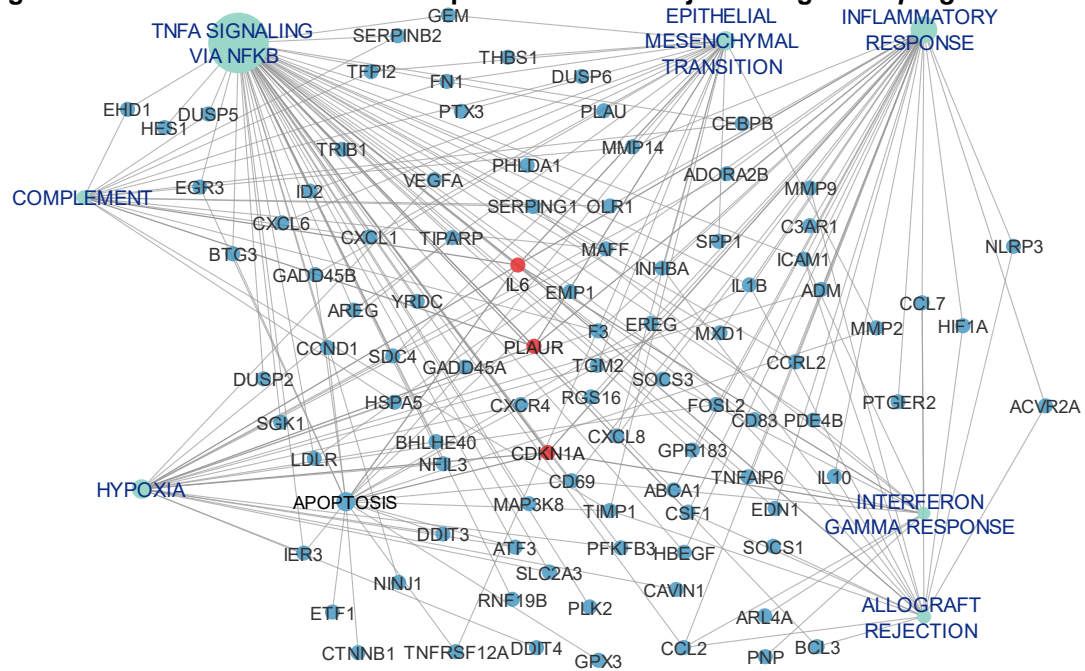


O tamanho de cada ponto indica a importância da via representada nesta rede. O *fold change* de cada gene é indicado pela intensidade da coloração dos pequenos pontos.

Uma sub-rede contendo apenas as conexões com o gene *IL6* (Figura 12) identificou outros dois *hub genes* (*CDKN1A* e *PLAUR*) e duas vias centrais mais essenciais e potencialmente relevantes (resposta inflamatória e via de ativação do fator de transcrição NF-κB através da sinalização do Fator de Necrose

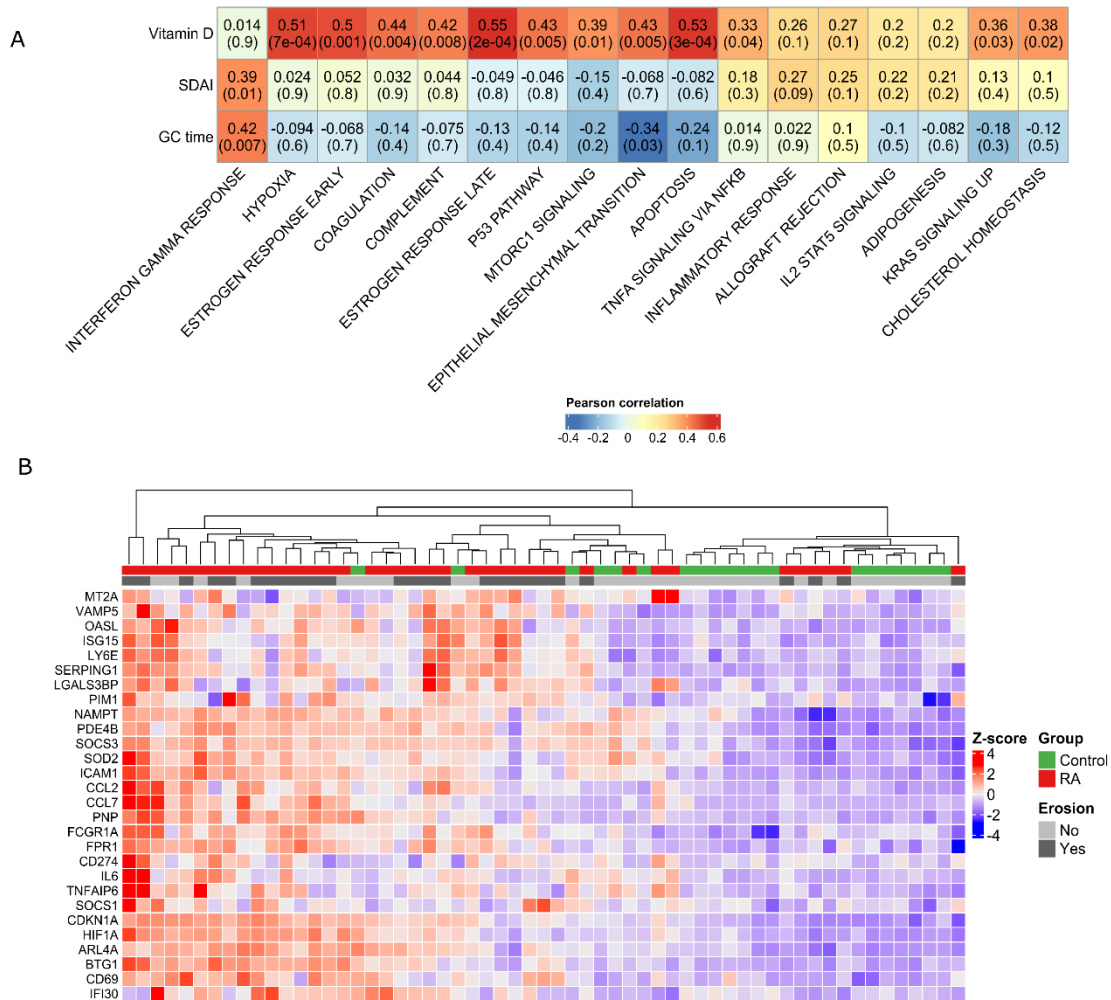
Tumoral alfa (TNF- α), medida de centralidade [*betweenness centrality*] 0,46 e 0,15 respectivamente). Isso indica uma regulação coordenada desses processos e sugere uma rede pró-inflamatória em monócitos CD14⁺⁺CD16⁻ na artrite reumatoide.

Figura 12 - Análise funcional de enriquecimento do conjunto de genes *upregulated*.



A análise de correlação revelou uma correlação positiva entre a intensidade da via de resposta do Interferon gama (escore ssGSEA) e o índice SDAI ($r = 0,39$, $p = 0,01$) (Figura 13A). Além disso, os genes associados à via de resposta do interferon gama foram suficientes para estratificar em dois grupos os pacientes com artrite reumatoide e os controles (Figura 13B).

Figura 13 - Correlação de Pearson e vias ativadas



Correlação entre parâmetros clínicos e vias ativadas em pacientes com artrite reumatoide (A). Heat map do agrupamento não supervisionado de genes associados à via de interferon gama (B).

4.5 Expressão gênica de monócitos CD14⁺⁺CD16⁻ de pacientes com artrite reumatoide e erosão óssea

A avaliação da expressão gênica de monócitos CD14⁺⁺CD16⁻ encontrou 1.140 genes diferencialmente expressos no grupo ARE em comparação ao grupo ARSE (Figura 14). Desses, 89 estavam *upregulated* e 1.051 regulados negativamente, *downregulated*.

O padrão de expressão gênica dos 50 melhores genes diferencialmente expressos (25 *upregulated* e 25 *downregulated*) é demonstrado na Figura 15.

Figura 14 - Genes *upregulated* e *downregulated* em pacientes com artrite reumatoide e erosão óssea em comparação ao grupo de pacientes com artrite reumatoide sem erosão óssea.

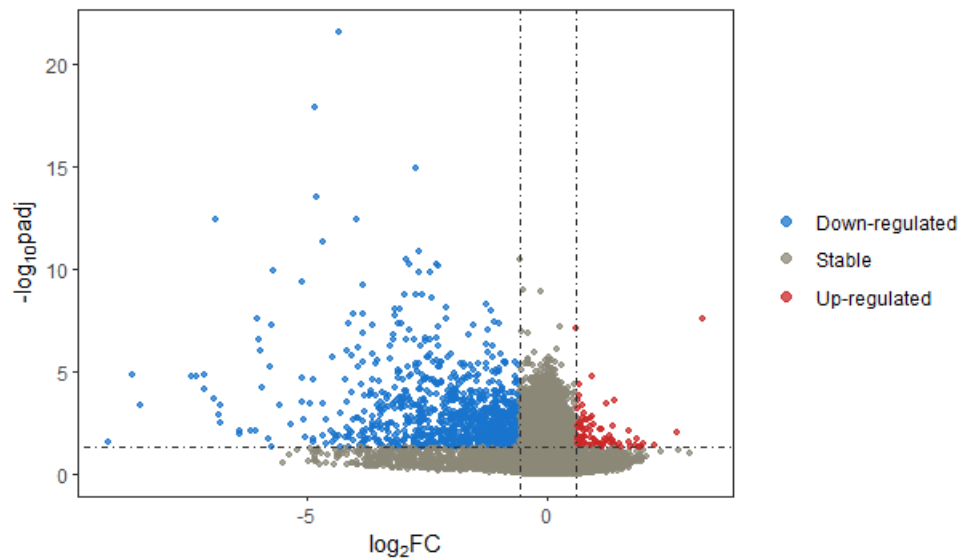
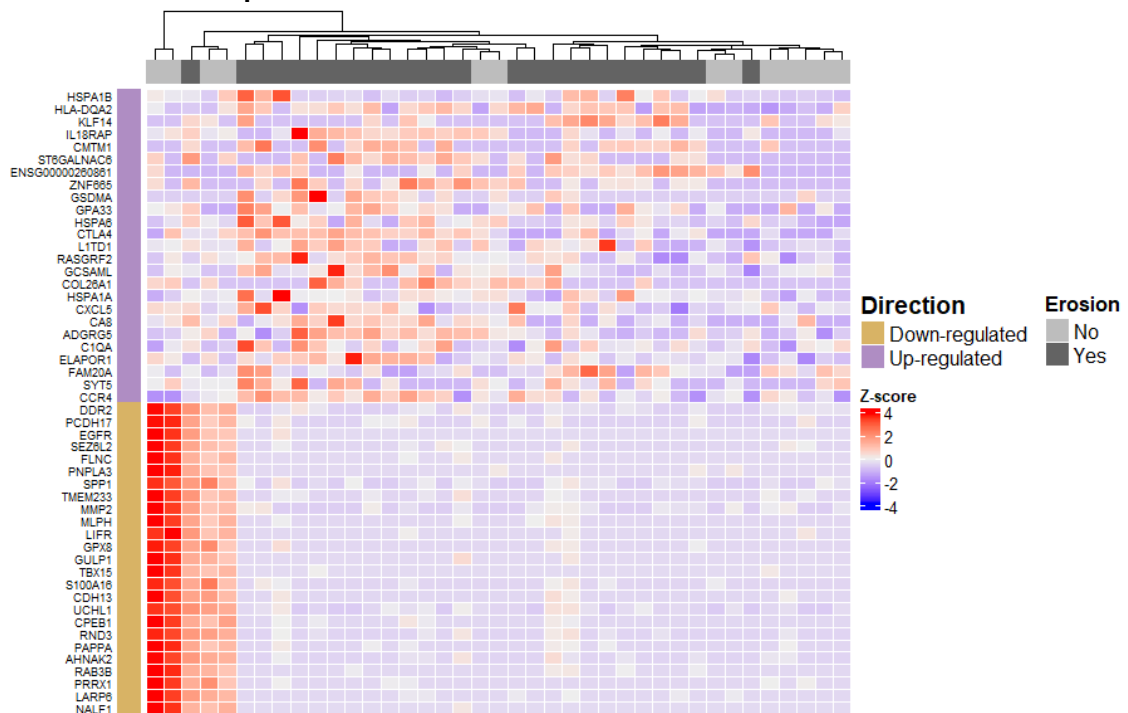


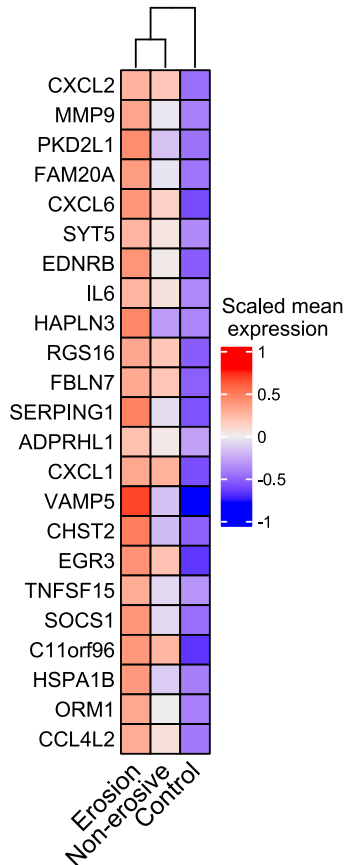
Figura 15 - Heat map demonstrando o padrão de expressão gênica dos 50 melhores genes diferencialmente expressos



Vinte e três genes que estavam *upregulated* nos pacientes com artrite reumatoide, independentemente da presença de erosão óssea (artrite reumatoide vs. controles), também estavam diferencialmente expressos no grupo ARE em comparação ao grupo ARSE (Figura 16). A Figura 16 ilustra um

enriquecimento de genes associados à resposta imunoinflamatória como *IL6*, *CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL6* e à metaloproteinase como *MMP9* na doença erosiva.

Figura 16 - Genes upregulated compartilhados entre o grupo de pacientes com artrite reumatoide e o grupo ARE



Os 10 melhores genes diferencialmente expressos (*upregulated* e *downregulated*) no grupo ARE estão disponíveis na Tabela 3. Genes associados à ativação da resposta imunológica (*HLA-DQA2*, *KLF14*, *IL18RAP*, *CMTM1*) estavam *upregulated* e genes associados à formação óssea (*PAPPA*) e à cicatrização de feridas (*AHNAK2*) estavam *downregulated* em comparação ao grupo ARSE.

Tabela 3 - Top genes diferencialmente expressos em pacientes com artrite reumatoide e erosão óssea em comparação ao sem erosão

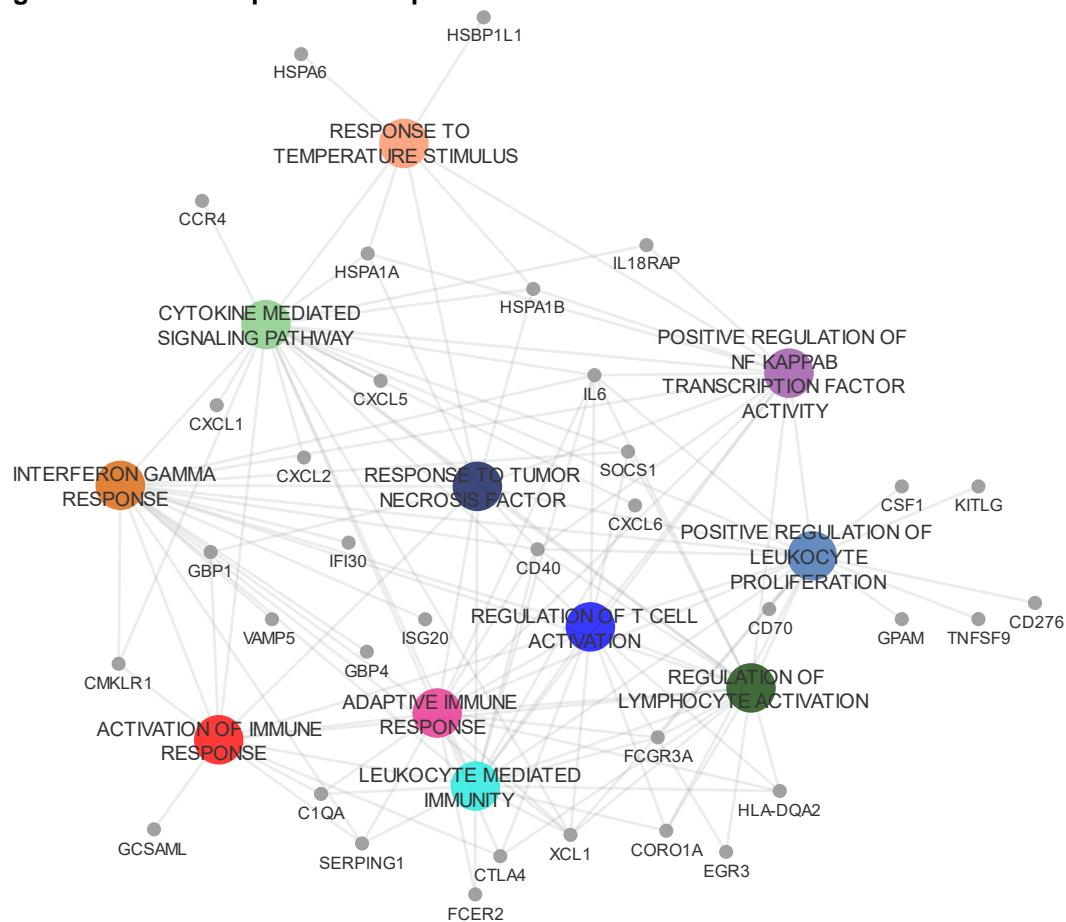
Genes	Ave FC	FDR	Processo biológico
<i>Upregulated</i>			
<i>HSPA1B</i>	9,26	< 0,0001	Proteína de choque térmico e via ubiquitina-proteassomo.
<i>HLA-DQA2</i>	6,35	0,009525	Imunidade adaptativa.
<i>KLF14</i>	4,6	0,041606	Imunidade inata e adaptativa.
<i>IL18RAP</i>	3,9	0,031739	Atividade de citocina.
<i>CMTM1</i>	3,83	0,043922	Atividade quimiotática.
<i>ST6GALNAC6</i>	3,76	0,043904	Atividade de sialiltransferase e alfa-N-acetilgalactosaminida alfa-2,6-sialiltransferase.
<i>ENSG00000260861</i>	3,67	0,049279	Função desconhecida.
<i>ZNF665</i>	3,64	0,019876	Regulação da transcrição pela RNA polimerase II.
<i>GSDMA</i>	3,54	0,039658	Processo apoptótico.
<i>GPA33</i>	3,30	0,046824	Atividade de receptor.
<i>Downregulated</i>			
<i>NALF1</i>	0,0018	0,02	Atividade do canal de cálcio.
<i>LARP6</i>	0,0026	< 0,0001	Colágeno biossintético.
<i>PRRX1</i>	0,0029	0,0004	Regulação da transcrição pela RNA polimerase II.
<i>RAB3B</i>	0,0061	< 0,0001	Regulação do transporte de íons.
<i>AHNAK2</i>	0,0065	< 0,0001	Cicatrização de feridas.
<i>PAPPA</i>	0,0072	< 0,0001	Formação óssea, inflamação e cicatrização de feridas.
<i>RND3</i>	0,0073	< 0,0001	Organização do citoesqueleto cortical.
<i>CPEB1</i>	0,0083	< 0,0001	Regulação negativa da tradução citoplasmática.
<i>UCHL1</i>	0,0085	< 0,0001	Sistema ubiquitina-proteassomo.
<i>CDH13</i>	0,0089	0,001	Regulação da proliferação celular.

Os genes foram classificados de acordo com o *fold change*. FC: *Fold-change*; Ave FC: *average FC*; FDR: *False Discovery Rate*.

A análise funcional de enriquecimento do conjunto de genes, utilizando todos os genes *upregulated* no grupo ARE, confirmou uma ativação aumentada de genes associados à atividade de citocinas (principalmente Interferon gama e TNF- α) e à ativação da resposta imune mediada por leucócitos (Figura 17). A análise de rede de interação identificou que os seguintes genes possuíam o

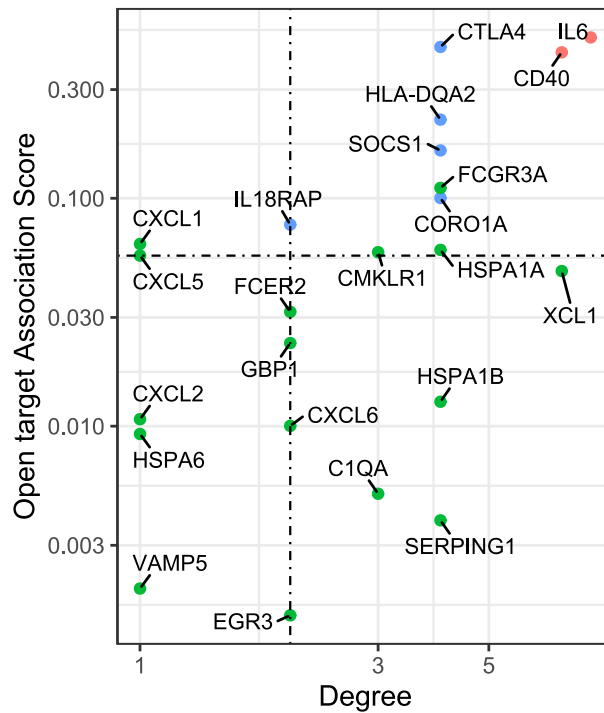
maior grau de conectividade (variando de 4 a 8): *IL6*, *CD40*, *XCL1*, *SOCS1*, *CORO1A*, *HSPA1B*, *CTLA4*, *HLA-DQA2*, *HSPA1A*, *SERPING1*.

Figura 17 - Vias enriquecidas em pacientes com artrite reumatoide e erosão óssea



Para priorizar ainda mais os alvos potencialmente relevantes, filtramos a lista de genes *upregulated*, identificados no grupo ARE, com uma lista de genes relevantes associados à artrite reumatoide disponível na plataforma *Open target*. Essa estratégia identificou *SOCS1*, *CORO1A*, *IL18RAP*, *CMKLR1* e *HSPA1A* como os principais genes associados à artrite erosiva (Figura 18). De forma notável, esses genes incluem a maioria dos genes conectados identificados anteriormente na análise de rede.

Figura 18 - Gráfico de ponto dos genes associados à artrite reumatoide



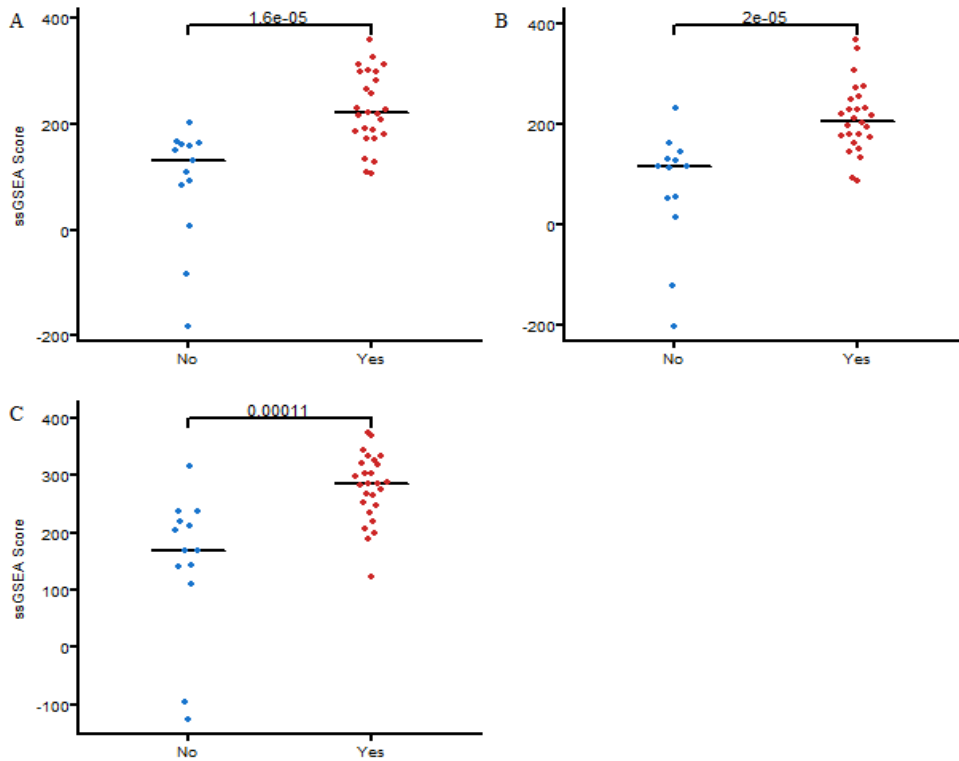
Profile

- Known drug + Genetic Ass
- Unknown drug + Genetic Ass
- Unknown drug

Os pontos vermelhos indicam genes utilizados como alvo por fármacos conhecidos. Os pontos azuis indicam genes sem fármaco específico, mas com associação genética. O eixo X mostra o grau de conectividade dos genes. O eixo Y mostra o escore de associação do gene com artrite.

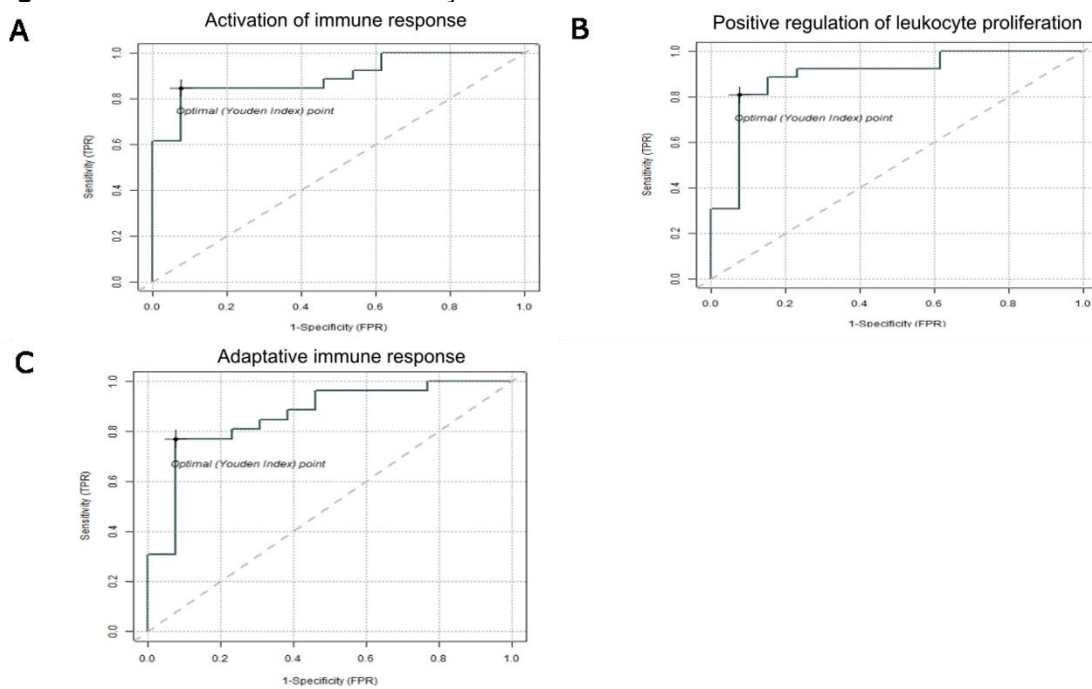
Para identificar as vias mais ativadas na erosão óssea, foi realizada uma comparação das taxas de ativação (escore ssGSEA) das vias enriquecidas entre os grupos (ARE vs. ARSE) (Figura 19A-C). As vias mais diferencialmente ativadas em monócitos CD14⁺⁺CD16⁻ no grupo ARE foram relacionadas à resposta imune (Figura 19A). Além disso, uma análise ROC foi realizada, a fim de avaliar o desempenho dessas vias em discriminar artrite reumatoide erosiva de artrite reumatoide não erosiva com base em seu nível de ativação (escore ssGSEA). Essa análise demonstrou que essas vias podem ser utilizadas para classificar o *status* de erosão, alcançando uma acurácia de pelo menos 0,8 (Figura 20).

Figura 19 - Vias altamente ativadas em monócitos CD14++CD16- de pacientes com artrite reumatoide e erosão óssea



Via e ativação da resposta imune (A). Via de regulação positiva da proliferação leucocitária (B). Via de resposta imune adaptativa (C).

Figura 20 - Curva ROC de classificação de erosão óssea



Ativação da resposta imune (A). Regulação positiva da proliferação leucocitária (B). Resposta imune adaptativa (C).

O número de erosões ósseas foi correlacionado positivamente com a atividade das seguintes vias: ativação da resposta imune ($r= 0,48$, $p= 0,002$), resposta imune adaptativa ($r= 0,38$, $p= 0,02$) e regulação positiva de proliferação leucocitária ($r= 0,35$, $p= 0,03$) (Figura 21). De forma notável, essas vias foram as mesmas sugeridas para distinguir artrite reumatoide erosiva de não erosiva (Figura 20). Além disso, a maioria das vias enriquecidas estavam correlacionadas com o escore de atividade de doença SDAI (Figura 21).

Em relação às vias biológicas *downregulated*, foi encontrada uma predominância de vias envolvidas na diferenciação osteoblástica e na regulação da via de sinalização Wnt canônica no grupo ARE (Figura 22). Conforme esperado, foi observada uma correlação positiva entre a taxa de ativação da diferenciação osteoblástica e a regulação da via de sinalização Wnt canônica (Figura 23).

Notavelmente, foi demonstrado que os genes mais conectados (*GREM1*, *NOG*, *DDIT3*, *COL1A1*, *PRKD1*, *LGR4*, *FERMT2*, *WNT4*, *RSPO3*, *WWTR1*, *CAV1*) estavam associados ao processo de formação óssea. Por fim, foi observada uma correlação negativa entre o número de erosões e as vias de diferenciação osteoblástica ($r= -0,35$, $p= 0,03$) e regulação da adesão à matriz celular ($r= -0,45$, $p= 0,004$) (Figura 24).

Figura 21 - Correlação entre parâmetros clínicos e vias ativadas em pacientes com artrite reumatoide e erosão óssea

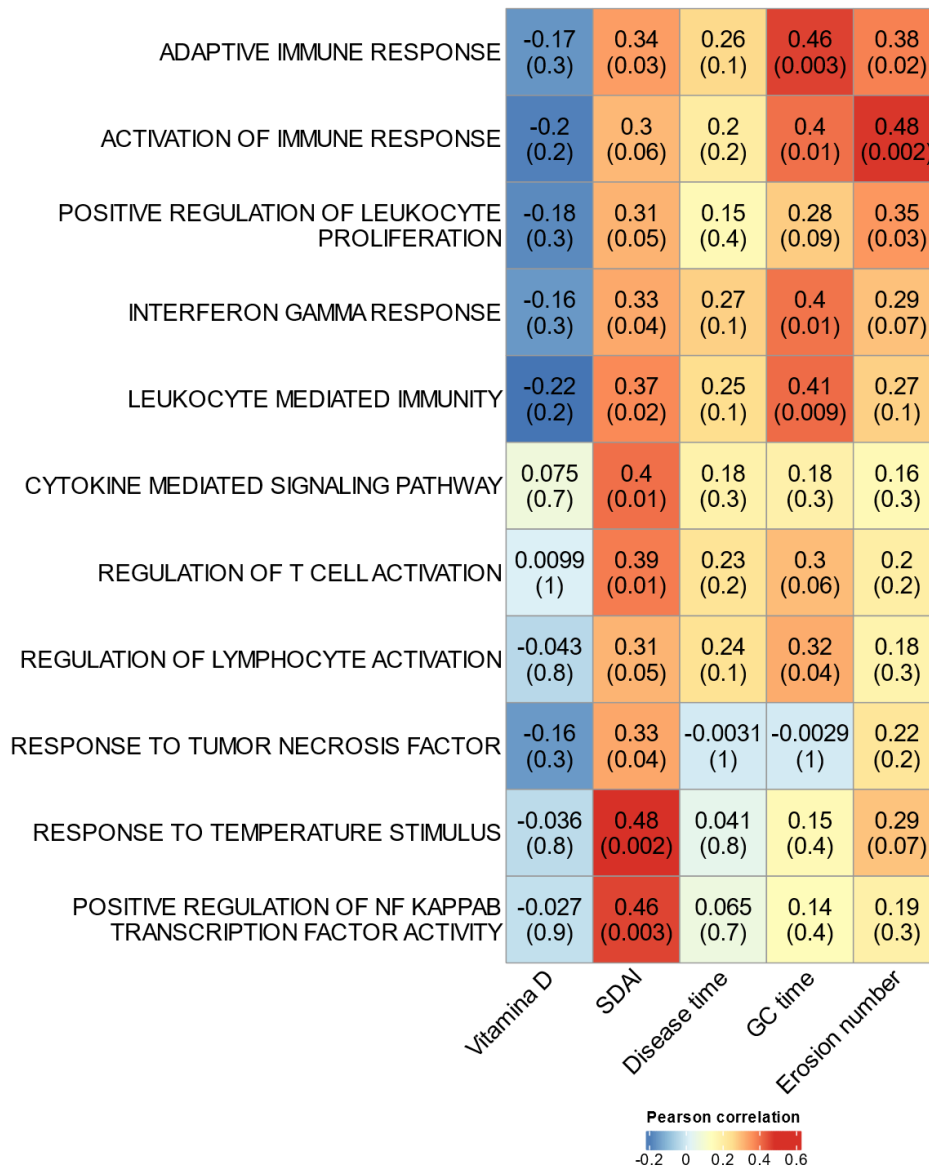


Figura 22 - Análise de vias enriquecidas por genes *downregulated* em monócitos CD14⁺⁺CD16⁻ de pacientes com artrite reumatoide e erosão óssea

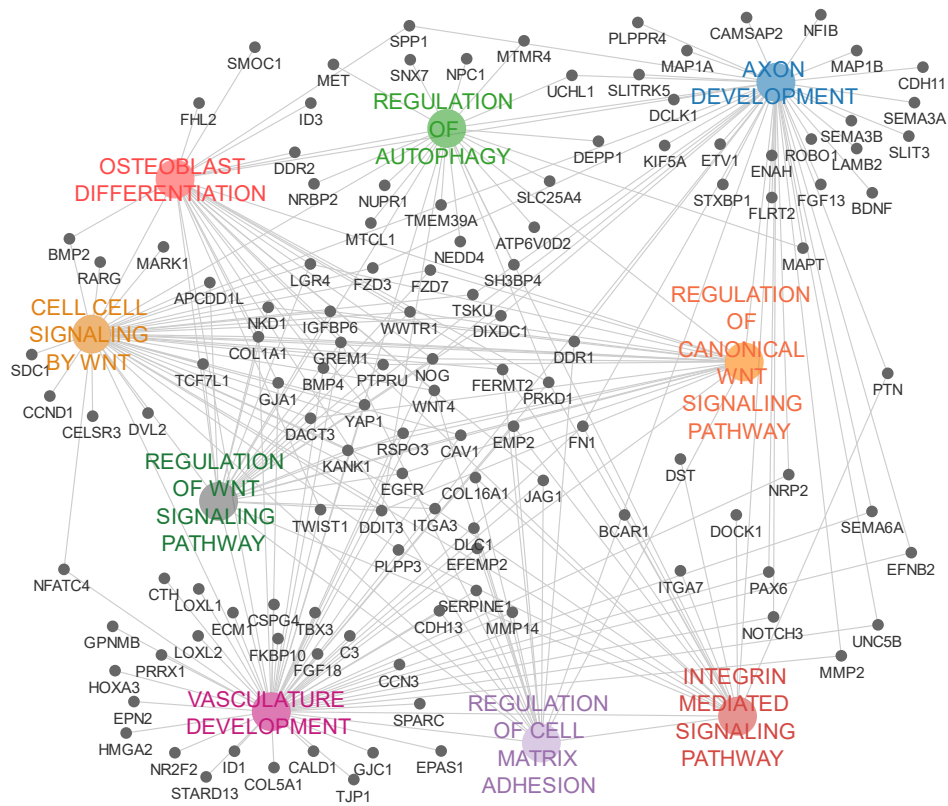


Figura 23 - Correlação entre a ativação das vias: diferenciação osteoblástica e regulação da sinalização Wnt canônica

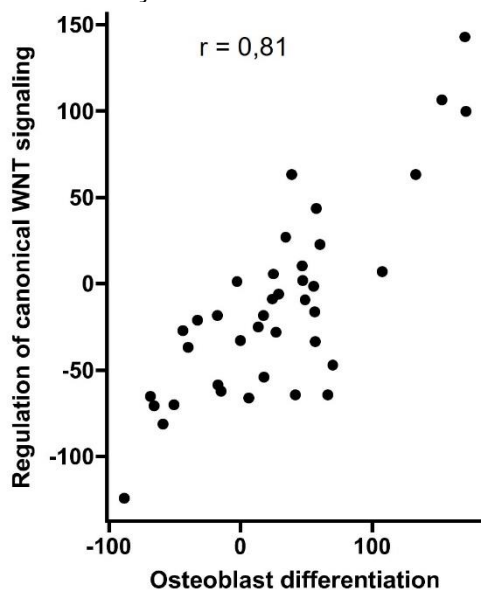
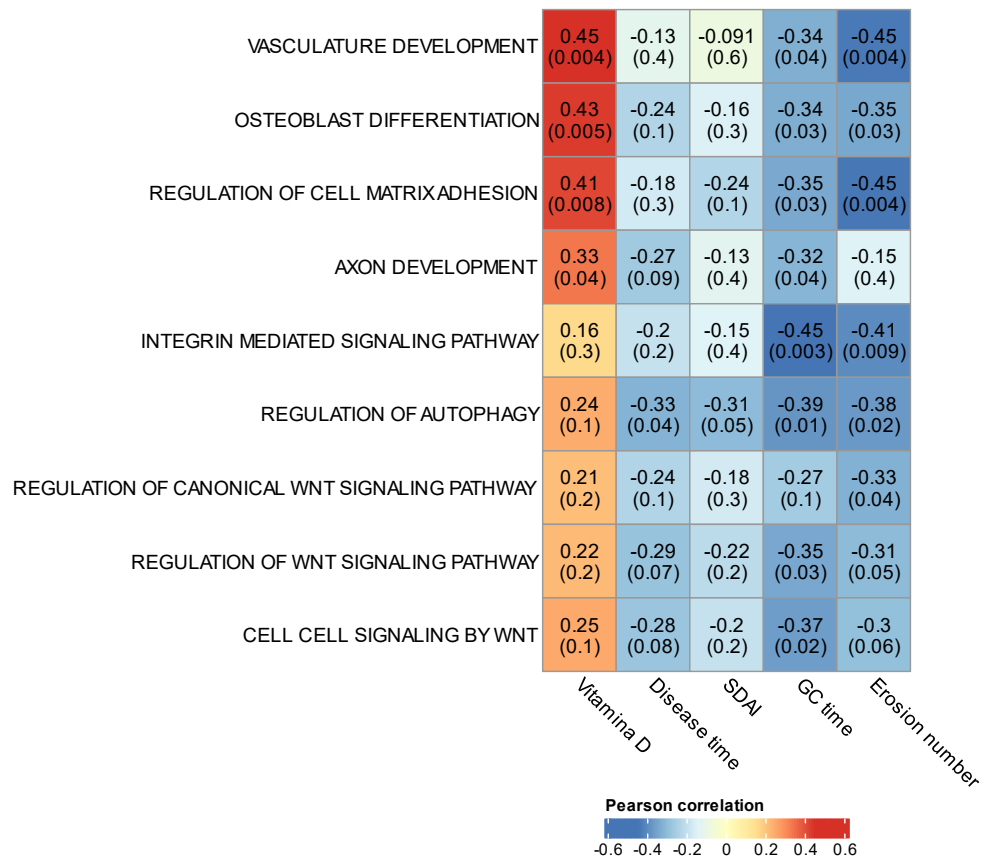


Figura 24 - Correlação entre parâmetros clínicos e vias *downregulated* em pacientes com artrite reumatoide e erosão óssea



5. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que monócitos CD14⁺⁺CD16⁻ de pacientes com artrite reumatoide apresentaram uma expressão diferenciada de genes associados à ativação da resposta imunológica e ao processo inflamatório, em relação aos controles saudáveis. Adicionalmente, pacientes com artrite reumatoide e erosão óssea apresentaram uma superexpressão de genes associados à resposta imunológica e uma subexpressão daqueles relacionados ao metabolismo ósseo.

Embora o papel dos monócitos na patogênese e na progressão da artrite reumatoide já tenha sido discutido anteriormente (Culemann et al., 2019), o papel de suas subpopulações (e.g. Monócitos CD14⁺⁺CD16⁻) no processo erosivo no segmento transcriptômico ainda não havia sido avaliado.

Este trabalho identificou o gene *IL6* como o gene com o maior número de conexões e/ou interações. Este gene codifica a Interleucina-6 (IL-6) que atua como uma citocina pró-inflamatória. A IL-6 é produzida por diferentes células, incluindo linfócitos T e B, monócitos, fibroblastos sinoviais, queratinócitos, células endoteliais, células mesangiais, adipócitos e algumas células tumorais (Takeuchi et al., 2021), e desempenha um papel ímpar na regulação da imunidade. O papel da IL-6 na destruição óssea da artrite reumatoide tem sido extensivamente estudado, uma vez que a IL-6, além de induzir a expressão do RANK nos osteoclastos, estimula a liberação de outros fatores associados à reabsorção óssea (e.g. M-CSF e RANKL). Corroborando com essa hipótese, camundongos transgênicos superexpressando *IL-6* exibem diminuição do volume ósseo trabecular no fêmur, maior número de osteoclastos e elevação da concentração plasmática de fosfatase ácida tartarato resistente (Peruzzi et al., 2012).

A inibição do eixo IL-6/IL-6R é altamente eficaz no tratamento de doenças imunoinflamatórias, como a artrite reumatoide (Kang et al., 2020). A administração de anticorpos antirreceptor de IL-6 em um modelo animal de artrite induzida por colágeno impediu a redução da densidade mineral óssea e da microarquitetura ocasionada pela artrite inflamatória (Yoshida et al., 2018).

No cenário clínico, tocilizumabe e sarilumabe despontam como antagonistas dos receptores de IL-6 autorizados pelas agências reguladoras para o tratamento da artrite reumatoide. Ambos os medicamentos são anticorpos antirreceptor de IL6, com dados semelhantes quanto à segurança e eficácia (den Broeder et al., 2023). O tratamento por 52 semanas com tocilizumabe em pacientes com artrite reumatoide que apresentaram falha ao metotrexato levou à redução da progressão da destruição óssea (escore de erosão de 0,17 no grupo tocilizumabe e 0,71 no grupo placebo) (Kremer et al., 2011). O uso de sarilumabe em associação com outro fármaco sintético modificador do curso da doença (DMARDs), demonstrou retardar a progressão do dano estrutural, melhorar a função física, a qualidade de vida e os sinais e sintomas de pacientes com artrite reumatoide que apresentam falha ao metotrexato ou resposta inadequada (intolerância) a um inibidor de TNF (Lamb & Deeks, 2018).

Reforçando o papel dos monócitos CD14⁺⁺CD16⁻ na inflamação, outros genes associados ao processo inflamatório e à ativação da resposta imunológica estavam *upregulated* neste estudo. O gene *CCL7* é responsável pela codificação da proteína quimiotática de monócitos 3 (MCP-3), uma quimiocina que regula o tráfego de monócitos para sítios inflamatórios (Chang et al., 2022). Recentemente, foi demonstrado que pacientes com artrite reumatoide apresentam maiores concentrações séricas de *CCL7* no plasma e no líquido

sinovial, em comparação a pacientes com osteoartrite (Rump et al., 2017). O aumento nos valores séricos de CCL7 parece estar envolvido na promoção da reabsorção óssea local, por meio da migração e diferenciação de osteoclastos. Reforçando essa hipótese, dados de RNA-seq de macrófagos da medula óssea de mulheres na pós menopausa com osteoporose demonstraram um aumento da expressão de *CCL7* e da via de sinalização NF- κ B, em comparação a mulheres sem osteoporose (Yuan et al., 2022).

Da mesma forma, a MMP2, membro da família das metaloproteinases da matriz, atua na ativação de diversas quimiocinas, entre elas a CCL7, contribuindo assim para a criação de um gradiente quimiotático e posterior infiltração de células imunes (de Jager & Hofer, 2017). Foi demonstrado que metaloproteinases da matriz (e.g. MMP-2 e MMP-9) são expressas nos sinoviócitos e nas células endoteliais vasculares CD34⁺ do tecido sinovial de paciente com artrite reumatoide, sugerindo sua contribuição na progressão da artrite reumatoide, principalmente no processo fisiopatológico da angiogênese e na formação do *pannus* (Zhou et al., 2014).

Corroborando com os achados aqui encontrados, um estudo conduzido por Gren et al., (2015) utilizando a técnica de expressão gênica *single-cell reverse transcription quantitative PCR* demonstrou que os monócitos CD14⁺⁺CD16⁻ apresentaram elevada expressão de *CD93*, *CD209* e *CLEC4E*, genes envolvidos no reconhecimento e na fagocitose de patógenos. Além disso, quando comparados com os monócitos CD14⁺CD16⁺⁺ (não clássicos), os monócitos CD14⁺⁺CD16⁻ possuem uma expressão significativamente superior do receptor TREM1, que em resposta a infecções bacterianas e fúngicas, é capaz de amplificar a produção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, podendo

levar ao choque séptico (Bouchon et al., 2000; Dower et al., 2008; Gibot et al., 2007).

Diversos genes (*NRG1*, *PLA2G7*, *CREB5*, *ADAM19*, *LDLR*, *SCARB1*, *STAB1* e *S100A12*) demonstraram ser *upregulated* em monócitos CD14⁺⁺CD16⁻ (Anbazhagan et al., 2014). Particularmente, o S100A12 que atua como ligante do TLR4, estimulando a produção de citocinas e quimiocinas e, conseqüentemente, influenciando no recrutamento, adesão e migração de leucócitos, o que acaba por amplificar a resposta imune inata (Foell et al., 2013; Meijer et al., 2012). Em parte, essa regulação positiva de citocinas pode ser explicada pela superexpressão do gene *SOCS1*, que é um inibidor de feedback negativo da via JAK/STAT (Liau et al., 2018). Digno de nota, a expressão de vias mediadas por citocinas também foi correlacionada com a extensão das erosões. Em conjunto, essas evidências indicam a capacidade dos monócitos CD14⁺⁺CD16⁻ de modular o influxo de células imunes no tecido sinovial e a remodelação do tecido sinovial durante a inflamação.

Outro achado importante deste estudo é que os monócitos CD14⁺⁺CD16⁻ do grupo ARE apresentam uma expressão gênica diferenciada em relação à ativação da resposta imunológica e à formação óssea em comparação ao grupo ARSE.

Dentre os genes associados à resposta imunológica, o *KLF14*, membro da família de fatores semelhantes a Krüppel (KLF), se destaca como um gene envolvido na regulação da diferenciação de células T reguladoras (Wei et al., 2017). Curiosamente, a presença de subtipos de células T (e.g. Th17) na sinóvia de pacientes com artrite reumatoide, tem a capacidade de produzir fatores associados à osteoclastogênese (e.g. RANKL, IL-6 e metaloproteases) (Miossec

et al., 2009; Sato et al., 2006).

Um estudo recente demonstrou que *KLF14* é regulado negativamente durante a diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais da medula óssea, e sua superexpressão suprimiu a viabilidade celular e a diferenciação osteogênica (Weng et al., 2020). É interessante ressaltar que a expressão de *KLF14* está negativamente correlacionada com a expressão de *WNT3A*, um fator chave para a formação óssea (Weng et al., 2020).

Neste trabalho, foi encontrada uma subexpressão de vias envolvidas na diferenciação osteoblástica e na regulação da via de sinalização Wnt canônica no grupo ARE. A via de sinalização Wnt desempenha um papel fundamental no desenvolvimento embrionário, na homeostase tecidual e na regulação de processos celulares ao longo da vida. Ao passo que a ativação da sinalização Wnt estimula a formação óssea, regulando a proliferação e diferenciação de osteoblastos e osteoclastos, e o seu bloqueio contribui para o surgimento da erosão (Baron & Kneissel, 2013; Cici et al., 2019; Rabelo et al., 2010). De fato, a inibição de antagonistas da via Wnt (e.g. DKK-1 e esclerostina) foi capaz de reverter a destruição óssea observada em modelos animais com artrite reumatoide (Florio et al., 2016).

Evidenciando que o comprometimento da formação óssea desempenha um importante papel na fisiopatologia das erosões ósseas, identificou-se que outros dois genes (*AHNAK2* e *PAPPA*) associados ao metabolismo ósseo estavam *downregulated* no grupo ARE. A família de proteínas codificadas pelo gene *AHNAK2* desempenha importante papel na sinalização de cálcio, interagindo com as proteínas dos canais de cálcio, cruciais para o metabolismo ósseo (Zardab et al., 2022). Camundongos *knockout* para o gene *AHNAK2*

apresentam diminuição da resistência óssea e encurtamento de fêmur e tíbia (Kim et al., 2020).

O gene *PAPPA* codifica a proteína plasmática A, associada à gravidez (PAPP-A), cuja função principal é clivar a proteína ligadora IGF tipo 4 (IGFBP-4, do inglês *IGF-binding protein 4*), que se liga ao fator de crescimento semelhante à insulina (IGF). Essa clivagem aumenta a ativação e a disponibilidade plasmática do IGF (*GeneCards®: The Human Gene Database*, 2023). A inibição do gene *PAPPA* em camundongos tem sido associada a efeitos adversos no desenvolvimento ósseo (e.g. redução da área cortical e da espessura trabecular de ossos longos e vertebrais). Além disso, foi observado um comprometimento na taxa de formação óssea e uma tendência na diminuição do número de osteoblastos e da superfície mineralizante e osteoblástica (Mohrin et al., 2021). Conforme esperado, foi demonstrado que o número de erosões ósseas e a atividade de doença correlacionaram-se positivamente com a atividade de vias associadas à ativação da resposta imune e à regulação positiva de proliferação leucocitária.

Finalmente, 23 genes *upregulated* nos pacientes com artrite reumatoide vs. grupo CT, também estavam *upregulated* no grupo ARE vs. grupo ARSE. Este achado corrobora com evidências prévias que sugerem que as erosões ósseas na artrite reumatoide fazem parte de um processo progressivo, que envolve um estado inflamatório mais elevado, indicando maior gravidade da doença.

Um dos pontos mais importantes deste trabalho é a descoberta de potenciais genes candidatos a uma associação com o processo erosivo na artrite reumatoide (*SOCS1*, *CORO1A*, *IL18RAP*, *CMKLR1* e *HSPA1A*).

A identificação de genes potencialmente envolvidos na fisiopatologia de

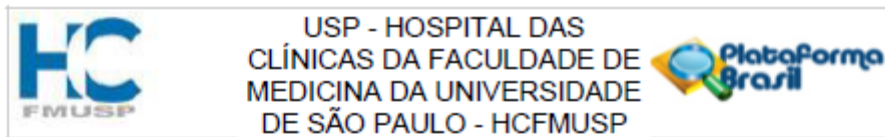
doenças permite uma melhor compreensão dos mecanismos subjacentes, revelando as vias moleculares e processos celulares afetados. Essas informações abrem caminho para o desenvolvimento de novas terapias e abordagens de tratamento mais direcionadas e eficazes. Além disso, o encontro de genes possivelmente associados à destruição óssea, pode ter um impacto significativo no diagnóstico e triagem da AR. Futuramente, com base nos genes identificados, podem ser desenvolvidos testes genéticos que auxiliem no diagnóstico precoce, na prevenção e na triagem de indivíduos com risco de desenvolver a doença.

6. CONCLUSÃO

Até onde se sabe, este é o primeiro estudo que avalia o perfil transcriptômico de monócitos CD14⁺⁺CD16⁻ de pacientes com artrite reumatoide. Foi observado aqui que pacientes com artrite reumatoide apresentam uma superexpressão de genes associados ao processo inflamatório e à regulação da resposta imunológica. Em relação aos pacientes com artrite reumatoide que apresentavam erosão óssea, identificou-se não apenas a ativação de vias imunoinflamatórias, mas também um comprometimento nas vias relacionadas ao processo de formação óssea.

7. ANEXOS

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



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DO METABOLISMO ÓSSEO POR HR-pQCT E HISTOMÓRFOMETRIA NA ARTRITE REUMATOIDE E NA ARTRITE IDIOPÁTICA JUVENIL E ASSOCIAÇÃO COM VARIÁVEIS CLÍNICAS E GENÉTICAS

Pesquisador: Rosa Maria Rodrigues Pereira

Área Temática:

Versão: 7

CAAE: 51178115.1.0000.0068

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.537.325

Apresentação do Projeto:

Emenda com o objetivo de incluir o estudo "Análise da expressão gênica de monócitos clássicos em pacientes com artrite reumatoide", que será tese de um aluno de doutorado.

Objetivo da Pesquisa:

Incluir um novo sub-estudo com objetivo de avaliar a expressão gênica de monócitos clássicos em pacientes com artrite reumatoide.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A emenda não traz aumento do risco ao participante.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante, sem ressalvas éticas.

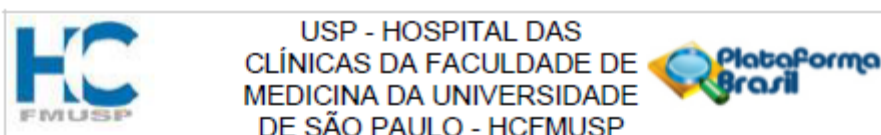
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:



Continuação do Parecer: 4.537.325

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1690937_É4.pdf	26/01/2021 17:43:23		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_artriteumatoide_Lucas.docx	26/01/2021 17:42:49	Rosa Maria Rodrigues Pereira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_controle_Lucas.docx	26/01/2021 17:42:42	Rosa Maria Rodrigues Pereira	Aceito
Outros	RelatoriodeAcompanhamentoTematico15012021.pdf	18/01/2021 14:53:18	Rosa Maria Rodrigues Pereira	Aceito
Outros	Adendo.pdf	18/01/2021 14:52:42	Rosa Maria Rodrigues Pereira	Aceito
Outros	Adendo.docx	18/01/2021 14:52:16	Rosa Maria Rodrigues Pereira	Aceito
Outros	Emenda.pdf	18/01/2021 14:46:09	Rosa Maria Rodrigues Pereira	Aceito
Outros	EMENDA.docx	18/01/2021 14:45:52	Rosa Maria Rodrigues Pereira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_Lucas.pdf	18/01/2021 14:45:30	Rosa Maria Rodrigues Pereira	Aceito
Folha de Rosto	14157.pdf	16/10/2015 14:30:58	Rosa Maria Rodrigues Pereira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 12 de Fevereiro de 2021

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador(a))

Anexo B. Termo de Consentimento Informado Livre e Esclarecido

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DA PESQUISA

TÍTULO DA PESQUISA: **Avaliação de parâmetros do metabolismo ósseo por HR-pQCT e histomorfometria na artrite reumatoide e na artrite idiopática juvenil e associação com variáveis clínicas e genéticas.**

PESQUISADOR PRINCIPAL: Prof. Dra. Rosa Maria Rodrigues Pereira

DEPARTAMENTO/INSTITUTO: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - Disciplina de Reumatologia

UNIDADE DO HCFMUSP: Ambulatório de Reumatologia do Hospital das Clínicas de São Paulo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e Laboratório de Metabolismo Ósseo da Disciplina de Reumatologia (LIM-17) da FMUSP.

1 – Convite à participação.

Prezada senhora, como você tem Artrite reumatoide ou é um adulto com Artrite idiopática juvenil, e esta doença pode levar a problemas nos seus ossos, você está sendo convidada a participar deste estudo denominado: **“Avaliação de parâmetros do metabolismo ósseo por HR-pQCT e histomorfometria na artrite reumatoide e na artrite idiopática juvenil e associação com variáveis clínicas e genéticas”**.

Para participar do estudo, iremos avaliar seu osso através da densitometria óssea e do exame de tomografia periférica de osso (exame da mão e perna).

Além disso, também será realizada uma biópsia de osso (retirada de um pequeno fragmento de osso) na região do quadril, no caso de você ter fratura ou osteoporose identificadas no exame de densitometria.

Coletaremos 100ml de sangue que serão utilizados no isolamento de células e na avaliação laboratorial. Além disso, você precisará responder dois questionários, um geral sobre: dados pessoais, uso de medicamentos, doenças associadas e outro de atividade física. Antes de decidir participar, leia este documento que se chama Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE. Faça quantas perguntas achar necessário. Se for preciso, discuta com seus familiares. Tenha certeza que entendeu todo o texto.

2 – Justificativa e objetivos.

A artrite reumatoide é uma doença inflamatória, sistêmica e de natureza autoimune, que leva à um comprometimento ósseo generalizado (osteoporose) e localizado (erosões) prejudicando a capacidade física com piora da qualidade de vida. Neste estudo, pretendemos entender melhor a sua doença óssea decorrente da sua artrite e desta maneira orientar melhor em tratamentos futuros.

3 – Descrição dos procedimentos que serão realizados e métodos que serão empregados

Caso você aceite participar do estudo você irá realizar um exame de densitometria óssea e uma tomografia periférica de osso (exame da mão e perna). O exame de densitometria óssea da coluna e quadril e a tomografia computadorizada de mão e perna apresentam riscos baixos. A quantidade de radiação dos 4 exames é menor do que um RX de tórax.

Além disso, também será realizada uma biópsia de osso (retirada de um pequeno fragmento de osso) na região do quadril, no caso de você ter fratura ou osteoporose no exame de densitometria. Para realização deste exame será necessária a realização de anestesia local.

Serão coletados 100ml de sangue (equivalente a 10 colheres de sopa) que serão utilizados para isolar células (para realizar análise genética) e avaliação laboratorial (marcadores inflamatórios). Além disso, você precisará responder dois questionários, um geral sobre: dados pessoais, uso de medicamentos, doenças associadas e outro de atividade física. Você responderá estes questionários apenas uma vez. O objetivo deste estudo é avaliar o comprometimento ósseo em pacientes com artrite reumatoide.

4 – Explicação de possíveis desconfortos e riscos decorrentes da participação na pesquisa;

O maior desconforto será no momento da coleta de sangue, que será realizada na veia do braço podendo causar dor e manchas arroxeadas, entretanto este procedimento não trará nenhum risco à sua saúde. Em relação a biópsia do osso, pode haver a possibilidade de pequenos hematomas na região e um pouco de dor, devendo permanecer em observação médica por 2-4 horas após a biópsia.

Em conjunto, os desconfortos ou riscos dos procedimentos descritos acima são classificados como baixo.

5 – Benefícios esperados para o participante

Você receberá todos os resultados de seus exames ao final do estudo. Além disso, sua participação auxiliará na melhor compreensão da perda óssea na artrite reumatoide.

6 – Esclarecimentos sobre a forma de acompanhamento e assistência a que terão direito os participantes da pesquisa

Você tem a liberdade de desistir ou interromper sua colaboração e deixar de participar deste estudo quando desejar sem qualquer custo ou prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição. Você também possui o direito de solicitar que as suas amostras de sangue, que ficarão guardadas na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sejam descartadas em qualquer etapa do estudo.

Os pesquisadores se comprometem a utilizar os dados coletados exclusivamente para pesquisa. Os resultados obtidos serão analisados em conjunto com outros pacientes, de forma anônima, e mantidos em sigilo. Os resultados serão divulgados apenas em publicações científicas, sem a menção dos seus dados pessoais.

7 – Garantia de que o participante receberá uma via do termo de consentimento

Ao aceitar fazer parte desta pesquisa, você deverá assinar e rubricar todas as páginas de duas vias do termo de consentimento, as quais serão assinadas e rubricadas também pela pesquisadora responsável. Uma via do termo de consentimento com as devidas assinaturas será entregue a você antes de iniciar qualquer procedimento do estudo e a outra via ficará com a pesquisadora responsável.

8 – Explicação das garantias de ressarcimento por despesas decorrentes da pesquisa e explicação da garantia de indenização por eventuais danos decorrentes da pesquisa

Você não terá despesas pessoais em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

9 – Armazenamento e cuidados com material biológico

Os pesquisadores se comprometem a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa. Todas as amostras de sangue ficarão armazenadas na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (de acordo com a resolução 441/2011), em um freezer apropriado para o armazenamento do material.

Caso parte das amostras coletadas não seja utilizada, manteremos suas amostras sanguíneas por um período de até 7 anos após a conclusão do projeto, e então iremos descartá-las, conforme normas vigentes, após este período. Respeitamos esse prazo pois ocasionalmente revistas científicas ou a agência que financia nossa pesquisa pode nos pedir análises adicionais ou esclarecimentos.

10 - Garantia de acesso

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de dúvidas. A investigadora principal é a Dr^a. Rosa Maria Rodrigues Pereira que pode ser encontrada no endereço: Av. Dr. Arnaldo, 455 - 3º andar – sala 3193 - Cerqueira César – São Paulo – SP – CEP: 01246-000. Telefone(s) (11) 30617490, e-mail: reumatologia.fmusp@hc.fm.usp.br.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: (11) 2661-7585, (11) 2661-1548, (11) 2661-1549, das 7 às 16h de segunda a sexta feira ou por e-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br.

Fui suficientemente informada a respeito do estudo: “Avaliação de parâmetros do metabolismo ósseo por HR-pQCT e histomorfometria na artrite reumatoide e na artrite idiopática juvenil e associação com variáveis clínicas e genéticas”.

Eu discuti as informações acima com a Dra. Rosa Maria R. Pereira ou com pesquisadores da sua equipe sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim os objetivos, os procedimentos, os potenciais desconfortos e riscos e as garantias. Concordo voluntariamente em participar deste estudo, assino este termo de consentimento e recebo uma via rubricada pelo pesquisador.

_____ Data ____/____/____

Assinatura do participante/representante legal

Nome do participante/representante legal

_____ Data ____/____/____

Assinatura do responsável pelo estudo

Nome resumido do projeto: Artrite reumatoide e metabolismo ósseo	Confidencial	
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido versão 1.0 15 de Janeiro de 2021		
Nome do Pesquisador: Rosa Maria Rodrigues Pereira Hospital Das Clínicas Da Faculdade De Medicina Da USP	_____ Rubrica do Participante da Pesquisa Representante legal	_____ Rubrica do Investigador Responsável

Anexo C. Termo de Consentimento Informado Livre e Esclarecido

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DA PESQUISA

TÍTULO DA PESQUISA: Avaliação de parâmetros do metabolismo ósseo por HR-pQCT e histomorfometria na artrite reumatoide e na artrite idiopática juvenil e associação com variáveis clínicas e genéticas.

PESQUISADOR PRINCIPAL: Prof. Dra. Rosa Maria Rodrigues Pereira

DEPARTAMENTO/INSTITUTO: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - Disciplina de Reumatologia

UNIDADE DO HCFMUSP: Ambulatório de Reumatologia do Hospital das Clínicas de São Paulo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e Laboratório de Metabolismo Ósseo da Disciplina de Reumatologia (LIM-17) da FMUSP.

1 – Convite à participação.

Prezada senhora, você está sendo convidada a participar deste estudo denominado: **“Avaliação de parâmetros do metabolismo ósseo por HR-pQCT e histomorfometria na artrite reumatoide e na artrite idiopática juvenil e associação com variáveis clínicas e genéticas”**.

Participando deste estudo, vamos comparar a saúde do seu osso com a de pacientes com artrite reumatoide. Para participar do estudo, será necessário realizar o exame de densitometria óssea e de tomografia computadorizada de mão e perna, ambos indolores. Coletaremos 100ml de sangue que serão utilizados no isolamento de células e na avaliação laboratorial. Além disso, você precisará responder dois questionários, um geral sobre: dados pessoais, uso de medicamentos, doenças associadas e outro de atividade física. Antes de decidir participar, leia este documento que se chama Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE. Faça quantas perguntas achar necessário. Se for preciso, discuta com seus familiares. Tenha certeza que entendeu todo o texto.

2 – Justificativa e objetivos.

A artrite reumatoide é uma doença inflamatória, sistêmica e de natureza autoimune, que leva à um comprometimento ósseo generalizado (osteoporose) e localizado (erosões) prejudicando a capacidade física com piora da qualidade de vida. Neste estudo, pretendemos comparar a saúde do seu osso com a de pacientes com artrite reumatoide e assim tentar entender melhor a perda óssea que ocorre nesta doença e desta maneira orientar o melhor tratamento. Além disto, através da amostra

de sangue coletada, iremos realizar uma análise genética, com a finalidade de identificar alterações relacionadas aos mecanismos biológicos que possam estar associados ao comprometimento ósseo na artrite reumatoide.

3 – Descrição dos procedimentos que serão realizados e métodos que serão empregados

Caso você aceite participar do estudo você irá realizar um exame de densitometria óssea e tomografia computadorizada de mão e perna. Serão coletados 100ml de sangue (equivalente a 10 colheres de sopa) que serão utilizados para isolar células do sangue (para análise genética) e avaliação laboratorial (marcadores inflamatórios). Além disso, você precisará responder dois questionários, um geral sobre: dados pessoais, uso de medicamentos, doenças associadas e outro de atividade física. Você responderá estes questionários apenas uma vez.

O objetivo deste estudo é avaliar se existe diferença entre o seu osso e de pacientes com artrite reumatoide.

4 – Explicação de possíveis desconfortos e riscos decorrentes da participação na pesquisa;

O maior desconforto será no momento da coleta de sangue, que será realizada na veia do braço podendo causar dor e manchas arroxeadas, entretanto este procedimento não trará nenhum risco à sua saúde. Em conjunto, os desconfortos ou riscos dos procedimentos descritos acima são classificados como baixo.

5 – Benefícios esperados para o participante

Você receberá todos os resultados de seus exames ao final do estudo. Além disso, sua participação auxiliará na melhor compreensão da perda óssea na artrite reumatoide.

6 – Esclarecimentos sobre a forma de acompanhamento e assistência a que terão direito os participantes da pesquisa

Você tem a liberdade de desistir ou interromper sua colaboração e deixar de participar deste estudo quando desejar sem qualquer custo ou prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição. Você também possui o direito de solicitar que as suas amostras de sangue, que ficarão guardadas na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sejam descartadas em qualquer etapa do estudo.

Os pesquisadores se comprometem a utilizar os dados coletados exclusivamente para pesquisa. Os resultados obtidos serão analisados em conjunto com outros pacientes, de forma anônima, e mantidos em sigilo. Os resultados serão divulgados apenas em publicações científicas, sem a menção dos seus dados pessoais.

7 – Garantia de que o participante receberá uma via do termo de consentimento

Ao aceitar fazer parte desta pesquisa, você deverá assinar e rubricar todas as páginas de duas vias do termo de consentimento, as quais serão assinadas e rubricadas também pela pesquisadora responsável. Uma via do termo de consentimento com as

devidas assinaturas será entregue a você antes de iniciar qualquer procedimento do estudo e a outra via ficará com a pesquisadora responsável.

8 – Explicitação das garantias de ressarcimento por despesas decorrentes da pesquisa e explicitação da garantia de indenização por eventuais danos decorrentes da pesquisa

Você não terá despesas pessoais em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

9 – Armazenamento e cuidados com material biológico

Os pesquisadores se comprometem a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa. Todas amostras de sangue ficarão armazenadas na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (de acordo com a resolução 441/2011), em um freezer apropriado para o armazenamento do material.

Caso parte das amostras coletadas não seja utilizada, manteremos suas amostras sanguíneas por um período de até 7 anos após a conclusão do projeto, e então iremos descartá-las, conforme normas vigentes, após este período. Respeitamos esse prazo pois ocasionalmente revistas científicas ou a agência que financia nossa pesquisa pode nos pedir análises adicionais ou esclarecimentos.

10 - Garantia de acesso

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de dúvidas. A investigadora principal é a Dr^a. Rosa Maria Rodrigues Pereira que pode ser encontrada no endereço: Av. Dr. Arnaldo, 455 - 3º andar – sala 3193 - Cerqueira César – São Paulo – SP – CEP: 01246-000. Telefone(s) (11) 30617490, e-mail: reumatologia.fmusp@hc.fm.usp.br.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: (11) 2661-7585, (11) 2661-1548, (11) 2661-1549, das 7 às 16h de segunda a sexta feira ou por e-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br.

Fui suficientemente informada a respeito do estudo: “Avaliação de parâmetros do metabolismo ósseo por HR-pQCT e histomorfometria na artrite reumatoide e na artrite idiopática juvenil e associação com variáveis clínicas e genéticas”.

Eu discuti as informações acima com a Dra. Rosa Maria R. Pereira ou com pesquisadores da sua equipe sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim os objetivos, os procedimentos, os potenciais desconfortos e riscos e as garantias. Concordo voluntariamente em participar deste estudo, assino este termo de consentimento e recebo uma via rubricada pelo pesquisador.

_____ Data ____/____/____

Assinatura do participante/representante
legal

Nome do participante/representante legal

_____ Data ____/____/____

Assinatura do responsável pelo estudo

Nome resumido do projeto: Artrite reumatoide e metabolismo ósseo	Confidencial	
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido versão 1.0 15 de Janeiro de 2021		
Nome do Pesquisador: Rosa Maria Rodrigues Pereira Hospital Das Clínicas Da Faculdade De Medicina Da USP	_____ Rubrica do Participante da Pesquisa Representante legal	_____ Rubrica do Investigador Responsável

8. REFERÊNCIAS

- Aguilar-Ruiz, S. R., Torres-Aguilar, H., González-Domínguez, É., Narváez, J., González-Pérez, G., Vargas-Ayala, G., Meraz-Ríos, M. A., García-Zepeda, E. A., & Sánchez-Torres, C. (2011). Human CD16+ and CD16- monocyte subsets display unique effector properties in inflammatory conditions in vivo. *Journal of Leukocyte Biology*, *90*(6), 1119–1131. <https://doi.org/10.1189/jlb.0111022>
- Ahmed, A., Hollan, I., Curran, S. A., Kitson, S. M., Riggio, M. P., Mikkelsen, K., Almdahl, S. M., Aukrust, P., McInnes, I. B., & Goodyear, C. S. (2016). Brief Report: Proatherogenic Cytokine Microenvironment in the Aortic Adventitia of Patients With Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & Rheumatology*, *68*(6), 1361–1366. <https://doi.org/10.1002/art.39574>
- Aletaha, D., Neogi, T., Silman, A. J., Funovits, J., Felson, D. T., Bingham, C. O., Birnbaum, N. S., Burmester, G. R., Bykerk, V. P., Cohen, M. D., Combe, B., Costenbader, K. H., Dougados, M., Emery, P., Ferraccioli, G., Hazes, J. M. W., Hobbs, K., Huizinga, T. W. J., Kavanaugh, A., ... Hawker, G. (2010). 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis and Rheumatism*, *62*(9), 2569–2581. <https://doi.org/10.1002/art.27584>
- Anbazhagan, K., Duroux-Richard, I., Jorgensen, C., & Apparailly, F. (2014). Transcriptomic network support distinct roles of classical and non-classical monocytes in human. *International Reviews of Immunology*, *33*(6), 470–489.
- Ancuta, P., Liu, K.-Y., Misra, V., Wacleche, V. S., Gosselin, A., Zhou, X., & Gabuzda, D. (2009). Transcriptional profiling reveals developmental relationship and distinct biological functions of CD16+ and CD16- monocyte subsets. *BMC Genomics*, *10*, 403. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-403>
- Atzeni, F., Rodríguez-Carrio, J., Popa, C. D., Nurmohamed, M. T., Szűcs, G., & Szekanecz, Z. (2021). Cardiovascular effects of approved drugs for rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, *17*(5), 270–290. <https://doi.org/10.1038/s41584-021-00593-3>
- Auffray, C., Sieweke, M. H., & Geissmann, F. (2009). Blood Monocytes: Development, Heterogeneity, and Relationship with Dendritic Cells. *Annual Review of Immunology*, *27*(1), 669–692. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132557>
- Barnabe, C., Toepfer, D., Marotte, H., Hauge, E.-M., Scharmga, A., Kocijan, R., Kraus, S., Boutroy, S., Schett, G., & Keller, K. K. (2016). Definition for

- rheumatoid arthritis erosions imaged with high resolution peripheral quantitative computed tomography and interreader reliability for detection and measurement. *The Journal of Rheumatology*, 43(10), 1935–1940.
- Baron, R., & Kneissel, M. (2013). WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nature Medicine*, 19(2), 179–192. <https://doi.org/10.1038/nm.3074>
- Belge, K.-U., Dayyani, F., Horelt, A., Siedlar, M., Frankenberger, M., Frankenberger, B., Espevik, T., & Ziegler-Heitbrock, L. (2002). The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 168(7), 3536–3542. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.7.3536>
- Bouchon, A., Dietrich, J., & Colonna, M. (2000). Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 164(10), 4991–4995. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.10.4991>
- Cairns, A. P., Crockard, A. D., & Bell, A. L. (2002). The CD14+ CD16+ monocyte subset in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Rheumatology International*, 21(5), 189–192. <https://doi.org/10.1007/s00296-001-0165-8>
- Chaib, M., Chauhan, S. C., & Makowski, L. (2020). Friend or Foe? Recent Strategies to Target Myeloid Cells in Cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 351. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00351>
- Chang, T.-T., Chen, C., & Chen, J.-W. (2022). CCL7 as a novel inflammatory mediator in cardiovascular disease, diabetes mellitus, and kidney disease. *Cardiovascular Diabetology*, 21(1), 185. <https://doi.org/10.1186/s12933-022-01626-1>
- Charles, J. F., Hsu, L.-Y., Niemi, E. C., Weiss, A., Aliprantis, A. O., & Nakamura, M. C. (2012). Inflammatory arthritis increases mouse osteoclast precursors with myeloid suppressor function. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(12), 4592–4605.
- Chiu, Y. G., Shao, T., Feng, C., Mensah, K. A., Thullen, M., Schwarz, E. M., & Ritchlin, C. T. (2010). CD16 (FcRγmIII) as a potential marker of osteoclast precursors in psoriatic arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 12(1), R14. <https://doi.org/10.1186/ar2915>
- Chu, H. X., Arumugam, T. V, Gelderblom, M., Magnus, T., Drummond, G. R., & Sobey, C. G. (2014). Role of CCR2 in inflammatory conditions of the central

- nervous system. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 34(9), 1425–1429.
- Cici, D., Corrado, A., Rotondo, C., & Cantatore, F. P. (2019). Wnt Signaling and Biological Therapy in Rheumatoid Arthritis and Spondyloarthritis. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(22), 5552. <https://doi.org/10.3390/ijms20225552>
- Costenbader, K. H. (2008). Geographic Variation in Rheumatoid Arthritis Incidence Among Women in the United States. *Archives of Internal Medicine*, 168(15), 1664. <https://doi.org/10.1001/archinte.168.15.1664>
- Culemann, S., Grüneboom, A., & Krönke, G. (2019). *Origin and function of synovial macrophage subsets during inflammatory joint disease* (pp. 75–98). <https://doi.org/10.1016/bs.ai.2019.08.006>
- Davies, L. C., Jenkins, S. J., Allen, J. E., & Taylor, P. R. (2013). Tissue-resident macrophages. *Nature Immunology*, 14(10), 986–995. <https://doi.org/10.1038/ni.2705>
- de Jager, S. C. A., & Hofer, I. E. (2017). Beyond the matrix: MMP2 as critical regulator of inflammation-mediated vascular dysfunction. *Cardiovascular Research*, 113(14), 1705–1707. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvx202>
- den Broeder, N., den Broeder, A. A., Verhoef, L. M., van den Hoogen, F. H. J., van der Maas, A., & van den Bemt, B. J. F. (2023). Non-medical switching from tocilizumab to sarilumab in rheumatoid arthritis patients with low disease activity, an observational study. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. <https://doi.org/10.1002/cpt.2999>
- Dower, K., Ellis, D. K., Saraf, K., Jelinsky, S. A., & Lin, L.-L. (2008). Innate immune responses to TREM-1 activation: overlap, divergence, and positive and negative cross-talk with bacterial lipopolysaccharide. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 180(5), 3520–3534. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.5.3520>
- Falconer, J., Murphy, A. N., Young, S. P., Clark, A. R., Tiziani, S., Guma, M., & Buckley, C. D. (2018). Review: Synovial Cell Metabolism and Chronic Inflammation in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)*, 70(7), 984–999. <https://doi.org/10.1002/art.40504>
- Figueiredo, C. P., Perez, M. O., Sales, L. P., Caparbo, V. de F., & Pereira, R. M. R. (2021). Evaluation of bone erosion in rheumatoid arthritis patients by high-resolution peripheral quantitative computed tomography scans: Comparison between two semi-automated programs in a three-dimensional setting. *International Journal of Rheumatic Diseases*, 24(7), 948–953.

- Firestein, G. S., & McInnes, I. B. (2017). Immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Immunity*, 46(2), 183. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2017.02.006>
- Florio, M., Gunasekaran, K., Stolina, M., Li, X., Liu, L., Tipton, B., Salimi-Moosavi, H., Asuncion, F. J., Li, C., Sun, B., Tan, H. L., Zhang, L., Han, C.-Y., Case, R., Duguay, A. N., Grisanti, M., Stevens, J., Pretorius, J. K., Pacheco, E., ... Ominsky, M. S. (2016). A bispecific antibody targeting sclerostin and DKK-1 promotes bone mass accrual and fracture repair. *Nature Communications*, 7(1), 11505. <https://doi.org/10.1038/ncomms11505>
- Foell, D., Wittkowski, H., Kessel, C., Lüken, A., Weinhage, T., Varga, G., Vogl, T., Wirth, T., Viemann, D., Björk, P., van Zoelen, M. A. D., Gohar, F., Srikrishna, G., Kraft, M., & Roth, J. (2013). Proinflammatory S100A12 can activate human monocytes via Toll-like receptor 4. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 187(12), 1324–1334. <https://doi.org/10.1164/rccm.201209-1602OC>
- Fonseka, C. Y., Rao, D. A., Teslovich, N. C., Korsunsky, I., Hannes, S. K., Slowikowski, K., Gurish, M. F., Donlin, L. T., Lederer, J. A., Weinblatt, M. E., Massarotti, E. M., Coblyn, J. S., Helfgott, S. M., Todd, D. J., Bykerk, V. P., Karlson, E. W., Ermann, J., Lee, Y. C., Brenner, M. B., & Raychaudhuri, S. (2018). Mixed-effects association of single cells identifies an expanded effector CD4+ T cell subset in rheumatoid arthritis. *Science Translational Medicine*, 10(463). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aag0305>
- GeneCards®: *The Human Gene Database*. (2023). <https://www.genecards.org/>
- Gibot, S., Massin, F., Marcou, M., Taylor, V., Stidwill, R., Wilson, P., Singer, M., & Bellingan, G. (2007). TREM-1 promotes survival during septic shock in mice. *European Journal of Immunology*, 37(2), 456–466. <https://doi.org/10.1002/eji.200636387>
- Gregersen, P. K., Silver, J., & Winchester, R. J. (1987). The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 30(11), 1205–1213. <https://doi.org/10.1002/ART.1780301102>
- Greisen, S. R., Einarsson, H. B., Hvid, M., Hauge, E.-M., Deleuran, B., & Kragstrup, T. W. (2015). Spontaneous generation of functional osteoclasts from synovial fluid mononuclear cells as a model of inflammatory osteoclastogenesis. *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, 123(9), 779–786. <https://doi.org/10.1111/apm.12416>

- Gren, S. T., Rasmussen, T. B., Janciauskiene, S., Håkansson, K., Gerwien, J. G., & Grip, O. (2015). A Single-Cell Gene-Expression Profile Reveals Inter-Cellular Heterogeneity within Human Monocyte Subsets. *PloS One*, *10*(12), e0144351. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144351>
- Hayashi, H., Nakahama, K., Sato, T., Tuchiya, T., Asakawa, Y., Maemura, T., Tanaka, M., Morita, M., & Morita, I. (2008). The role of Mac-1 (CD11b/CD18) in osteoclast differentiation induced by receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand. *FEBS Letters*, *582*(21–22), 3243–3248. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.08.023>
- Heinlen, L., & Humphrey, M. B. (2017). Skeletal complications of rheumatoid arthritis. *Osteoporosis International: A Journal Established as Result of Cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, *28*(10), 2801–2812. <https://doi.org/10.1007/s00198-017-4170-5>
- Hill, C. L., Schultz, C. G., Wu, R., Chatterton, B. E., & Cleland, L. G. (2010). Measurement of hand bone mineral density in early rheumatoid arthritis using dual energy X-ray absorptiometry. *International Journal of Rheumatic Diseases*, *13*(3), 230–234. <https://doi.org/10.1111/j.1756-185X.2010.01485.x>
- Ingersoll, M. A., Spanbroek, R., Lottaz, C., Gautier, E. L., Frankenberger, M., Hoffmann, R., Lang, R., Haniffa, M., Collin, M., Tacke, F., Habenicht, A. J. R., Ziegler-Heitbrock, L., & Randolph, G. J. (2010). Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. *Blood*, *115*(3), e10-9. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-07-235028>
- Kang, S., Narazaki, M., Metwally, H., & Kishimoto, T. (2020). Historical overview of the interleukin-6 family cytokine. *Journal of Experimental Medicine*, *217*(5). <https://doi.org/10.1084/jem.20190347>
- Kim, I. Y., Yi, S. S., Shin, J. H., Kim, Y. N., Ko, C.-Y., Kim, H. S., Lee, S. Y., Bae, Y. S., & Seong, J. K. (2020). Intensive morphometric analysis of enormous alterations in skeletal bone system with micro-CT for AHNAK^{-/-} mice. *Anatomical Science International*, *95*(3), 323–333. <https://doi.org/10.1007/s12565-020-00525-3>
- Klimek, E., Mikołajczyk, T., Sulicka, J., Kwaśny-Krochin, B., Korkosz, M., Osmenda, G., Wizner, B., Surdacki, A., Guzik, T., Grodzicki, T. K., & Skalska, A. (2014). Blood monocyte subsets and selected cardiovascular risk markers in rheumatoid arthritis of short duration in relation to disease activity. *BioMed Research International*, *2014*, 736853. <https://doi.org/10.1155/2014/736853>

- Koizumi, K., Saitoh, Y., Minami, T., Takeno, N., Tsuneyama, K., Miyahara, T., Nakayama, T., Sakurai, H., Takano, Y., Nishimura, M., Imai, T., Yoshie, O., & Saiki, I. (2009). Role of CX3CL1/fractalkine in osteoclast differentiation and bone resorption. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 183(12), 7825–7831. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803627>
- Kremer, J. M., Blanco, R., Brzosko, M., Burgos-Vargas, R., Halland, A.-M., Vernon, E., Ambs, P., & Fleischmann, R. (2011). Tocilizumab inhibits structural joint damage in rheumatoid arthritis patients with inadequate responses to methotrexate: Results from the double-blind treatment phase of a randomized placebo-controlled trial of tocilizumab safety and prevention of structu. *Arthritis & Rheumatism*, 63(3), 609–621. <https://doi.org/10.1002/art.30158>
- Kukurba, K. R., & Montgomery, S. B. (2015). RNA Sequencing and Analysis. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2015(11), pdb.top084970. <https://doi.org/10.1101/pdb.top084970>
- Lamb, Y. N., & Deeks, E. D. (2018). Sarilumab: A Review in Moderate to Severe Rheumatoid Arthritis. *Drugs*, 78(9), 929–940. <https://doi.org/10.1007/s40265-018-0929-z>
- Lari, R., Kitchener, P. D., & Hamilton, J. A. (2009). The proliferative human monocyte subpopulation contains osteoclast precursors. *Arthritis Research & Therapy*, 11(1), 1–6.
- Liau, N. P. D., Laktyushin, A., Lucet, I. S., Murphy, J. M., Yao, S., Whitlock, E., Callaghan, K., Nicola, N. A., Kershaw, N. J., & Babon, J. J. (2018). The molecular basis of JAK/STAT inhibition by SOCS1. *Nature Communications*, 9(1), 1558. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04013-1>
- Massey, H. M., & Flanagan, A. M. (1999). Human osteoclasts derive from CD14-positive monocytes. *British Journal of Haematology*, 106(1), 167–170. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1999.01491.x>
- Meijer, B., Gearry, R. B., & Day, A. S. (2012). The role of S100A12 as a systemic marker of inflammation. *International Journal of Inflammation*, 2012, 907078. <https://doi.org/10.1155/2012/907078>
- Miossec, P., Korn, T., & Kuchroo, V. K. (2009). Interleukin-17 and Type 17 Helper T Cells. *New England Journal of Medicine*, 361(9), 888–898. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0707449>
- Mohrin, M., Liu, J., Zavala-Solorio, J., Bhargava, S., Maxwell Trumble, J., Brito, A., Hu, D., Brooks, D., Koukos, G., Alabdulaaly, L., Paw, J. S., Hake, K., Kolumam, G., Bouxsein, M. L., Baron, R., Kutsikova, Y., & Freund, A. (2021).

- Inhibition of longevity regulator PAPP-A modulates tissue homeostasis via restraint of mesenchymal stromal cells. *Aging Cell*, 20(3). <https://doi.org/10.1111/accel.13313>
- Patel, A. A., Zhang, Y., Fullerton, J. N., Boelen, L., Rongvaux, A., Maini, A. A., Bigley, V., Flavell, R. A., Gilroy, D. W., Asquith, B., Macallan, D., & Yona, S. (2017). The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation. *The Journal of Experimental Medicine*, 214(7), 1913–1923. <https://doi.org/10.1084/jem.20170355>
- Peruzzi, B., Cappariello, A., Del Fattore, A., Rucci, N., De Benedetti, F., & Teti, A. (2012). c-Src and IL-6 inhibit osteoblast differentiation and integrate IGFBP5 signalling. *Nature Communications*, 3(1), 630. <https://doi.org/10.1038/ncomms1651>
- Petrovská, N., Prajzlerová, K., Vencovský, J., Šenolt, L., & Filková, M. (2021). The pre-clinical phase of rheumatoid arthritis: from risk factors to prevention of arthritis. *Autoimmunity Reviews*, 20(5), 102797.
- Puchner, A., Saferding, V., Bonelli, M., Mikami, Y., Hofmann, M., Brunner, J. S., Caldera, M., Goncalves-Alves, E., Binder, N. B., Fischer, A., Simader, E., Steiner, C.-W., Leiss, H., Hayer, S., Niederreiter, B., Karonitsch, T., Koenders, M. I., Podesser, B. K., O’Shea, J. J., ... Blüml, S. (2018). Non-classical monocytes as mediators of tissue destruction in arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 77(10), 1490–1497. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2018-213250>
- Rabelo, F. de S., da Mota, L. M. H., Lima, R. A. C., Lima, F. A. C., Barra, G. B., de Carvalho, J. F., & Amato, A. A. (2010). The Wnt signaling pathway and rheumatoid arthritis. *Autoimmunity Reviews*, 9(4), 207–210. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2009.08.003>
- Rana, A. K., Li, Y., Dang, Q., & Yang, F. (2018). Monocytes in rheumatoid arthritis: Circulating precursors of macrophages and osteoclasts and, their heterogeneity and plasticity role in RA pathogenesis. *International Immunopharmacology*, 65, 348–359.
- Rao, D. A., Gurish, M. F., Marshall, J. L., Slowikowski, K., Fonseka, C. Y., Liu, Y., Donlin, L. T., Henderson, L. A., Wei, K., Mizoguchi, F., Teslovich, N. C., Weinblatt, M. E., Massarotti, E. M., Coblyn, J. S., Helfgott, S. M., Lee, Y. C., Todd, D. J., Bykerk, V. P., Goodman, S. M., ... Brenner, M. B. (2017). Pathologically expanded peripheral T helper cell subset drives B cells in rheumatoid arthritis. *Nature*, 542(7639), 110–114. <https://doi.org/10.1038/nature20810>

- Rossini, M., Bagnato, G., Frediani, B., Iagnocco, A., LA Montagna, G., Minisola, G., Caminiti, M., Varenna, M., & Adami, S. (2011). Relationship of focal erosions, bone mineral density, and parathyroid hormone in rheumatoid arthritis. *The Journal of Rheumatology*, 38(6), 997–1002. <https://doi.org/10.3899/jrheum.100829>
- Rossol, M., Kraus, S., Pierer, M., Baerwald, C., & Wagner, U. (2012). The CD14(bright) CD16+ monocyte subset is expanded in rheumatoid arthritis and promotes expansion of the Th17 cell population. *Arthritis and Rheumatism*, 64(3), 671–677. <https://doi.org/10.1002/art.33418>
- Rudan, I., Sidhu, S., Papan, A., Meng, S.-J., Xin-Wei, Y., Wang, W., Campbell-Page, R. M., Demaio, A. R., Nair, H., Sridhar, D., Theodoratou, E., Dowman, B., Adeloje, D., Majeed, A., Car, J., Campbell, H., Wang, W., Chan, K. Y., & Global Health Epidemiology Reference Group (GHERG). (2015). Prevalence of rheumatoid arthritis in low- and middle-income countries: A systematic review and analysis. *Journal of Global Health*, 5(1), 010409. <https://doi.org/10.7189/jogh.05.010409>
- Rump, L., Matthey, D. L., Kehoe, O., & Middleton, J. (2017). An initial investigation into endothelial CC chemokine expression in the human rheumatoid synovium. *Cytokine*, 97, 133–140. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.05.023>
- Sampath, P., Moideen, K., Ranganathan, U. D., & Bethunaickan, R. (2018). Monocyte subsets: phenotypes and function in tuberculosis infection. *Frontiers in Immunology*, 9, 1726.
- Sato, K., Suematsu, A., Okamoto, K., Yamaguchi, A., Morishita, Y., Kadono, Y., Tanaka, S., Kodama, T., Akira, S., Iwakura, Y., Cua, D. J., & Takayanagi, H. (2006). Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *Journal of Experimental Medicine*, 203(12), 2673–2682. <https://doi.org/10.1084/jem.20061775>
- Schultz, H. S., Guo, L., Keller, P., Fleetwood, A. J., Sun, M., Guo, W., Ma, C., Hamilton, J. A., Bjørkdahl, O., & Berchtold, M. W. (2016). OSCAR-collagen signaling in monocytes plays a proinflammatory role and may contribute to the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *European Journal of Immunology*, 46(4), 952–963.
- Scott, D. L., Wolfe, F., & Huizinga, T. W. J. (2010). Rheumatoid arthritis. *Lancet (London, England)*, 376(9746), 1094–1108. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60826-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60826-4)
- Smolen, J. S., Aletaha, D., Barton, A., Burmester, G. R., Emery, P., Firestein, G. S., Kavanaugh, A., McInnes, I. B., Solomon, D. H., Strand, V., & Yamamoto,

- K. (2018). Rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Disease Primers* 2018 4:1, 4(1), 1–23. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.1>
- Stok, K. S., Finzel, S., Burghardt, A. J., Conaghan, P. G., & Barnabe, C. (2017). The SPECTRA collaboration OMERACT special interest group: current research and future directions. *The Journal of Rheumatology*, 44(12), 1911–1915.
- Takahashi, N., Akatsu, T., Udagawa, N., Sasaki, T., Yamaguchi, A., Moseley, J. M., Martin, T. J., & Suda, T. (1988). Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. *Endocrinology*, 123(5), 2600–2602. <https://doi.org/10.1210/endo-123-5-2600>
- Takeuchi, T., Yoshida, H., & Tanaka, S. (2021). Role of interleukin-6 in bone destruction and bone repair in rheumatoid arthritis. *Autoimmunity Reviews*, 20(9), 102884. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2021.102884>
- Udagawa, N., Koide, M., Nakamura, M., Nakamichi, Y., Yamashita, T., Uehara, S., Kobayashi, Y., Furuya, Y., Yasuda, H., Fukuda, C., & Tsuda, E. (2021). Osteoclast differentiation by RANKL and OPG signaling pathways. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 39(1), 19–26. <https://doi.org/10.1007/s00774-020-01162-6>
- Udagawa, N., Takahashi, N., Akatsu, T., Tanaka, H., Sasaki, T., Nishihara, T., Koga, T., Martin, T. J., & Suda, T. (1990). Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(18), 7260–7264. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.18.7260>
- Wei, X., Yang, R., Wang, C., Jian, X., Li, L., Liu, H., Yang, G., & Li, Z. (2017). A novel role for the Krüppel-like factor 14 on macrophage inflammatory response and atherosclerosis development. *Cardiovascular Pathology*, 27, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.carpath.2016.11.003>
- Weng, J., Wu, J., Chen, W., Fan, H., & Liu, H. (2020). KLF14 inhibits osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells by downregulating WNT3A. *American Journal of Translational Research*, 12(8), 4445–4455. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32913518>
- Wong, K. L., Yeap, W. H., Tai, J. J. Y., Ong, S. M., Dang, T. M., & Wong, S. C. (2012). The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunologic Research*, 53(1–3), 41–57. <https://doi.org/10.1007/s12026-012-8297-3>

- Yoshida, H., Suzuki, M., Tanaka, K., Takeda, S., Yogo, K., & Matsumoto, Y. (2018). Anti-interleukin-6 receptor antibody prevents loss of bone structure and bone strength in collagen-induced arthritis mice. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 47(5), 384–391. <https://doi.org/10.1080/03009742.2017.1416667>
- Yuan, S., Hu, H., Wang, X., Yang, J., Zhou, R., Bai, X., & Lai, P. (2022). Bindarit Reduces Bone Loss in Ovariectomized Mice by Inhibiting CCL2 and CCL7 Expression via the NF-κB Signaling Pathway. *Orthopaedic Surgery*, 14(6), 1203–1216. <https://doi.org/10.1111/os.13252>
- Zardab, M., Stasinou, K., Grose, R. P., & Kocher, H. M. (2022). The Obscure Potential of AHNK2. *Cancers*, 14(3), 528. <https://doi.org/10.3390/cancers14030528>
- Zhang, F., Wei, K., Slowikowski, K., Fonseka, C. Y., Rao, D. A., Kelly, S., Goodman, S. M., Tabechian, D., Hughes, L. B., Salomon-Escoto, K., Watts, G. F. M., Jonsson, A. H., Rangel-Moreno, J., Meednu, N., Rozo, C., Apruzzese, W., Eisenhaure, T. M., Lieb, D. J., Boyle, D. L., ... Raychaudhuri, S. (2019). Defining inflammatory cell states in rheumatoid arthritis joint synovial tissues by integrating single-cell transcriptomics and mass cytometry. *Nature Immunology*, 20(7), 928–942. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0378-1>
- Zhang, L., Yuan, X., Zhou, Q., Shi, J., Song, Z., Quan, R., & Zhang, D. (2017). Associations Between TNFAIP3 Gene Polymorphisms and Rheumatoid Arthritis Risk: A Meta-analysis. *Archives of Medical Research*, 48(4), 386–392. <https://doi.org/10.1016/J.ARCMED.2017.08.003>
- Zhao, L., Huang, L., & Zhang, X. (2016). Osteoimmunology: memorandum for rheumatologists. *Science China. Life Sciences*, 59(12), 1241–1258. <https://doi.org/10.1007/s11427-016-5105-7>
- Zhou, M., Qin, S., Chu, Y., Wang, F., Chen, L., & Lu, Y. (2014). Immunolocalization of MMP-2 and MMP-9 in human rheumatoid synovium. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 7(6), 3048–3056. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25031723>
- Ziegler-Heitbrock, L. (2014). Reprint of: Monocyte subsets in man and other species. *Cellular Immunology*, 291(1–2), 11–15. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2014.06.008>
- Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D. N., Leenen, P. J. M., Liu, Y.-J., MacPherson, G., Randolph, G. J., Scherberich, J., Schmitz, J., Shortman, K., Sozzani, S., Strobl, H., Zembala, M., Austyn, J. M., & Lutz, M. B. (2010). Nomenclature of monocytes and dendritic cells

in blood. *Blood*, 116(16), e74–e80. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-02-258558>

9. APÊNDICES

Apêndice A. Submissão do artigo para a revista *Frontiers in Immunology*.

Dear Dr Sales

We are pleased to inform you that we have received the manuscript "Transcriptomic characterization of classical monocytes highlights the involvement of immuno-inflammation in bone erosion in Rheumatoid Arthritis" to be considered for publication in *Frontiers in Immunology*, section Autoimmune and Autoinflammatory Disorders - Autoimmune Disorders.

You can access the review forum and track the progress of your manuscript using the following link:

<https://www.frontiersin.org/Journal/MySubmission.aspx?stage=100>

Your manuscript is now in the initial validation stage to determine its suitability for peer review. Should your manuscript be sent out for peer review, you will receive a notification once we receive the reports from reviewers and the interactive review forum is activated. You will then be able to read the review reports and exchange directly with the reviewers in the interactive review forum as well as submit a revised manuscript, if appropriate. If the required number of reviewers endorse your manuscript in the Independent Review stage, their tabs will be closed and the manuscript will be forwarded to the Review Finalized stage, where you will be able to interact with the handling editor via the Editor tab.

Best regards,

Your *Frontiers in Immunology* Team,

Frontiers | Editorial Office - Collaborative Peer Review Team

www.frontiersin.org

Avenue du Tribunal Fédéral 34

1005 Lausanne Switzerland

Apêndice B. Pôster apresentado durante o *European Congress of Rheumatology 2023*.



Kilchberg, 11 March 2023

European Congress of Rheumatology **EULAR 2023**

Milan, Italy – 31 May - 3 June 2023

Dear Lucas Peixoto Sales,

Thank you for having submitted an abstract for **EULAR 2023** to be held on-site on 31 May – 3 June 2023.

On behalf of the **EULAR** Congress Committee, we have the great pleasure to inform you that the following abstract has been accepted for a **Poster View presentation** at **EULAR 2023**.

Submission N°: 2096

Title: **RNA-Sequencing of classical monocytes from rheumatoid arthritis patients with and without bone erosion.**

[Here](#) is a message from our Abstract Chair, Prof. Caroline Ospelt.

Your abstract has been renumbered and will appear on the congress programme as: **POS1047**

Apêndice C. Prêmio recebido durante o 28º Encontro de Reumatologia Avançada.



Certificamos que a comunicação oral **CO.01** intitulado **“SEQUENCIAMENTO EM LARGA ESCALA (RNA-seq) DE MONÓCITOS CLÁSSICOS DE PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE COM E SEM EROÇÃO ÓSSEA.”** de autoria de Sales LP, Hounkpe BW, Figueiredo CP, Perez MO, Caparbo VF, Pereira RM recebeu o **2º lugar na categoria Temas Livres** no **28º Encontro de Reumatologia Avançada**, realizado de 30 de junho a 2 de julho de 2022, no Royal Palm Hall, em Campinas-SP.


Nafice Costa Araújo
Presidente SPR - Biênio 2022-2023


Charles Helden de Moura Castro
Diretor Científico SPR - Biênio 2022-2023



Apêndice D. Trabalho oral apresentado no 10º BRADOO.

CERTIFICADO



Certificamos que

Lucas P Sales, Bidossessi W Hounkpe, Camille P Figueiredo, Mariana O Perez, Valéria F Caparbo, Rosa MR Pereira.,

Participaram do **10º Congresso Brasileiro de Densitometria, Osteoporose e Osteometabolismo (10º BRADOO)**, realizado no período de 19 a 22 de outubro de 2022, na cidade do Rio de Janeiro, como autores do Trabalho Científico: **SEQUENCIAMENTO EM LARGA ESCALA (RNA-seq) DE MONÓCITOS CLÁSSICOS DE PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE COM E SEM EROSÃO ÓSSEA..**

Rio de Janeiro, 22 de outubro de 2022.


Francisco José Albuquerque de Paula
Presidente da ABRASSO


João Lindolfo Cunha Borges
Presidente do Congresso


Maria Celeste Osorio Wender
Diretora Científica

Apêndice E. Trabalhos publicados em colaboração durante o período de doutorado.

MODERN RHEUMATOLOGY
<https://doi.org/10.1080/14397595.2020.1804669>

MODERN RHEUMATOLOGY
 Taylor & Francis
 Taylor & Francis Group

REVIEW ARTICLE

Check for updates

HR-pQCT *in vivo* imaging of periarticular bone changes in chronic inflammatory diseases: Data from acquisition to impact on treatment indications

Camille P. Figueiredo^a, Mariana O. Perez^a, Lucas Peixoto Sales^a, Georg Schett^b and Rosa M. R. Pereira^a

^aBone Metabolism Laboratory, Rheumatology Division, Faculdade de Medicina, FMUSP da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil; ^bDepartment of Internal Medicine 3, Rheumatology and Immunology, University of Erlangen-Nuremberg and Universitätsklinikum, Erlangen, Germany

ABSTRACT

Imaging is essential for the assessment of bone and inflammatory joint diseases. There are several imaging techniques available that differ regarding resolution, radiation exposure, time expending, precision, cost, availability or ability to predict disease progression. High-resolution peripheral quantitative computed tomography (HR-pQCT) that was introduced in 2004 allows the *in vivo* evaluation of peripheral bone microarchitecture and demonstrated high precision in assessing bone changes in inflammatory musculoskeletal diseases. This review summarizes the use of HR-pQCT for the evaluation of the hand skeleton in inflammatory joint diseases. We conducted a review of the literature regarding the protocols that involve hand joints assessment and evaluation of bone changes as erosions and osteophytes in chronic inflammatory diseases. Apart from measuring bone density and structure of the radius and the tibia, HR-pQCT has contributed to assessment of bone erosions and osteophytes, considered the hallmark of diseases as rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis, respectively. In this way, there are some conventions recently established by rheumatic study groups that we just summarized here in order to standardize HR-pQCT measurements.

ARTICLE HISTORY

Received 29 May 2020
 Accepted 25 July 2020

KEYWORDS

Arthritis; bone erosion;
 bone spur;
 computed tomography

Introduction

Imaging is a crucial technology to evaluate bone. Several different techniques have been developed to assess bone *in vivo* that differ in methodology (being based on X-ray, magnetic resonance imaging or ultrasound), assessable dimensions (producing either two- or three-dimensional [3D] images), spatial resolution, radiation exposure, acquisition time, parameters assessed, region of interest (ROI) analyzed, accuracy, precision, cost, availability and ability in predicting clinical outcomes [1,2]. One of the most exciting advances to assess bone microarchitecture over the past 10 years has been the introduction of high-resolution peripheral quantitative computed tomography (HR-pQCT), an innovative and advanced imaging technology available since 2004 [3] which has been used to study bone micro-architecture in humans *in vivo* [4–8].

In this review, the use of HR-pQCT in assessing the hand skeleton in patients with inflammatory joint diseases is described. The characteristics of HR-pQCT image acquisition, reconstruction and evaluation as well as the methods to evaluate local bone changes such as erosions and osteophytes are reported, showing the potential of HR-pQCT in rheumatology research and potential future use in routine clinical practice.

Methods

Search strategy and selection criteria

Articles included in this review were searched and limited full-text English language articles of PubMed with combination or isolate of following items: 'HR-pQCT', 'bone erosions', 'osteophytes', 'hand bone destruction', 'bone proliferations', 'imaging', 'metacarpal joint space', 'rheumatoid arthritis', 'psoriatic arthritis', 'osteoarthritis', 'SPECTRA group', 'OMERACT', 'inflammatory disease'. The search strategy was done from 31 March 2019 until 30 September 2019.

Study selection

There were selected the most important papers regarding acquisition of images, standardized methods of evaluation from study groups (SPECTRA and OMERACT), as well as different methods that might be use to peripheral bone erosion and bone spur analysis. Moreover, some literature evidences of its use in treatment follow-ups were also included.

Main outcome variables

All analyzed topics reviewed here, they were chosen according to authors specialists in HR-pQCT technique, after

CONTACT Camille P. Figueiredo figueiredocamille@gmail.com; Rosa M. R. Pereira rosamariarp@yahoo.com Av. Dr. Arnaldo 455, 3^o andar, sala 3193, São Paulo, 01246-903, Brazil
 © 2020 Japan College of Rheumatology



Influence of vitamin D status on hospital length of stay and prognosis in hospitalized patients with moderate to severe COVID-19: a multicenter prospective cohort study

Bruna Z Reis,¹ Alan L Fernandes,¹ Lucas P Sales,¹ Mayara D Santos,¹ Caroline C dos Santos,¹ Ana J Pinto,² Karla F Goessler,² Andre S Franco,¹ Camila SC Duran,¹ Carla BR Silva,¹ Marina B Macêdo,¹ Henrique HH Dalmolin,¹ Janaina Baggio,¹ Guilherme GM Balbi,¹ Leila Antonangelo,³ Valeria F Caparbo,¹ Bruno Gualano,^{2,4} Igor H Murai,¹ and Rosa MR Pereira¹

¹Rheumatology Division, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil; ²Applied Physiology and Nutrition Research Group, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil; ³Clinical Pathology Division, Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil; and ⁴Food Research Center, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

ABSTRACT

Background: Vitamin D acts as a mediator in the immune system regulating antiviral mechanisms and inflammatory processes. Vitamin D insufficiency has been suggested as a potential risk factor for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection, although its impact on the prognosis of hospitalized patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19) remains unclear. **Objective:** This multicenter prospective cohort study was designed to investigate whether serum 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] concentration is associated with hospital length of stay and prognosis in hospitalized patients with COVID-19.

Methods: Patients with moderate to severe COVID-19 ($n = 220$) were recruited from 2 hospitals in São Paulo, Brazil. Serum 25(OH)D concentrations were categorized as follows: <10 ng/mL, 10 to <20 ng/mL, 20 to <30 ng/mL, and ≥ 30 ng/mL, and <10 ng/mL and ≥ 10 ng/mL. The primary outcome was hospital length of stay and the secondary outcomes were the rate of patients who required invasive mechanical ventilation and mortality.

Results: There were no significant differences in hospital length of stay when the 4 25(OH)D categories were compared ($P = 0.120$). Patients exhibiting 25(OH)D <10 ng/mL showed a trend ($P = 0.057$) for longer hospital length of stay compared with those with 25(OH)D ≥ 10 ng/mL [9.0 d (95% CI: 6.4, 11.6 d) vs. 7.0 d (95% CI: 6.6, 7.4 d)]. The multivariable Cox proportional hazard models showed no significant associations between 25(OH)D and primary or secondary outcomes.

Conclusions: Among hospitalized patients with moderate to severe COVID-19, those with severe 25(OH)D deficiency (<10 ng/mL) exhibited a trend for longer hospital length of stay compared with patients with higher 25(OH)D concentrations. This association was not significant in the multivariable Cox regression model. Prospective studies should test whether correcting severe 25(OH)D deficiency could improve the prognosis of patients with COVID-19. *Am J Clin Nutr* 2021;00:1–7.

Keywords: SARS-CoV-2 infection, COVID-19, mortality, nutritional status, 25-hydroxyvitamin D

Introduction

As of 30 March 2021, 127 million people have been infected and 2.7 million people have died in the coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic (1). The predictors of COVID-19 severity remain to be fully clarified.

Subclinical vitamin D deficiency has been shown to negatively affect the function of the immune system and increase the risk of severe infection (2–4), including COVID-19 (3, 4). In this sense, vitamin D emerges in its recognized immunomodulatory role since it is involved in the upregulation of the immune system through effects on both dendritic and T cells (5–7). It can also enhance antiviral mechanisms in epithelial cells by producing antimicrobial peptides and autophagy, as well

Supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (grants 2005752-4, 19/24782-4, 20/11102-2, 16/00006-7, 17/13552-2, 15/26937-4, 19/18039-7), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (305556/2017-7), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—CAPES (88887.507119/2020-00).

Supplemental Figure 1 is available from the “Supplementary data” link in the online posting of the article and from the same link in the online table of contents at <https://academic.oup.com/ajcn/>.

BZR and ALF contributed equally to this work.

Address correspondence to RMRP (e-mail: rosamariarp@yahoo.com).

Abbreviations used: COVID-19, coronavirus disease 2019; CYP27B1, 1 α -hydroxylase; SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; 25(OH)D, 25-hydroxyvitamin D.

Received January 4, 2021. Accepted for publication April 9, 2021.

First published online 0, 2021; doi: <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqab151>.

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

Journal of Sport and Health Science 10 (2021) 690–696



Original article

No independent associations between physical activity and clinical outcomes among hospitalized patients with moderate to severe COVID-19

Ana J. Pinto^{a,†}, Karla F. Goessler^{a,†}, Alan L. Fernandes^b, Igor H. Murai^b, Lucas P. Sales^b,
Bruna Z. Reis^b, Mayara Diniz Santos^b, Hamilton Roschel^a, Rosa M.R. Pereira^b,
Bruno Gualano^{a,c,*}

^a Applied Physiology and Nutrition Research Group, School of Physical Education and Sport, Clinical Hospital HCFMUSP, School of Medicine FMUSP, University of Sao Paulo, Sao Paulo, SP 01246903, Brazil

^b Rheumatology Division, Clinical Hospital HCFMUSP, School of Medicine FMUSP, University of Sao Paulo, Sao Paulo, SP 01246903, Brazil

^c Food Research Center, University of Sao Paulo, Sao Paulo, SP 05508080, Brazil

Received 21 April 2021; revised 22 May 2021; accepted 16 July 2021

Available online 12 August 2021

2095-2546/© 2021 Published by Elsevier B.V. on behalf of Shanghai University of Sport. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license. (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

Abstract

Background: Regular physical activity (PA) has been postulated to improve, or at least maintain, immunity across the life span. However, the link between physical (in)activity and coronavirus disease 2019 (COVID-19) remains to be established. This small-scale prospective cohort study is nested within a randomized controlled trial aimed to investigate the possible associations between PA levels and clinical outcomes among hospitalized patients with moderate to severe COVID-19.

Methods: Hospitalized patients with COVID-19 (mean age: 54.9 years) were recruited from the Clinical Hospital of the School of Medicine of the University of Sao Paulo (a quaternary referral teaching hospital) and from Ibirapuera Field Hospital, both located in Sao Paulo, Brazil. PA level was assessed using the Baecke Questionnaire of Habitual Physical Activity. The primary outcome was hospital length of stay. The secondary outcomes were mortality, admission to the intensive care unit (ICU), and mechanical ventilation requirement.

Results: The median hospital length of stay was 7.0 ± 4.0 days, median \pm IQR; 3.3% of patients died, 13.8% were admitted to the ICU, and 8.6% required mechanical ventilation. Adjusted linear regression models showed that PA indices were not associated with hospital length of stay (work index: $\beta = -0.57$ (95% confidence interval (95%CI): -1.80 to 0.65), $p = 0.355$; sport index: $\beta = 0.43$ (95%CI: -0.94 to 1.80), $p = 0.536$; leisure-time index: $\beta = 1.18$ (95%CI: -0.22 to 2.59), $p = 0.099$; and total activity index: $\beta = 0.20$ (95%CI: -0.48 to 0.87), $p = 0.563$). None of the PA indices were associated with mortality, admission to the ICU, or mechanical ventilation requirement (all $p > 0.050$).

Conclusion: Among hospitalized patients with COVID-19, PA did not independently associate with hospital length of stay or any other clinically relevant outcomes. These findings should be interpreted as meaning that, among already hospitalized patients with more severe forms of COVID-19, being active is a potential protective factor likely outweighed by a cluster of comorbidities (e.g., type 2 diabetes, hypertension, weight excess) and older age, suggesting that the benefit of PA against the worsening of COVID-19 may vary across stages of the disease.

Keywords: Hospital length of stay; Lifestyle; Physical inactivity; Prognosis; SARS-CoV-2

1. Introduction

Physical inactivity has been considered a predisposing factor to acquired infections in several cohorts.¹ A solid body of literature provides biological plausibility for the negative impact of physical inactivity on the immune system. For

instance, chronic inactivity has been linked to increased systemic inflammation, impaired natural killer cell cytolytic activity, and reduced T-cell proliferation and cytokine production, which can ultimately lead to a loss of viral control.²

The immunoregulatory role of physical activity (PA) is also well-known. Regular PA has been postulated to improve, or at least maintain, immunity across the life span.² There is also evidence that PA reduces the incidence as well as the number and severity of symptoms associated with acute respiratory infections (e.g., upper respiratory tract infection).³

Peer review under responsibility of Shanghai University of Sport.

* Corresponding author.

E-mail address: gualano@usp.br (B. Gualano).

[†] These two authors have contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.jshs.2021.08.001>

Cite this article: Pinto AJ, Goessler KF, Fernandes AL, et al. No independent associations between physical activity and clinical outcomes among hospitalized patients with moderate to severe COVID-19. *J Sport Health Sci* 2021;10:690–6.



OPEN ACCESS

EDITED BY
Laurel M. Wentz,
Appalachian State University,
United States

REVIEWED BY
Diego Fernández Lázaro,
University of Valladolid, Spain
Evelyn Frias-Toral,
Catholic University of Santiago
de Guayaquil, Ecuador

*CORRESPONDENCE
Rosa M. R. Pereira
rosamariarp@yahoo.com

SPECIALTY SECTION
This article was submitted to
Clinical Nutrition,
a section of the journal
Frontiers in Nutrition

RECEIVED 27 June 2022
ACCEPTED 15 August 2022
PUBLISHED 13 September 2022

CITATION
Fernandes AL, Sales LP, Santos MD,
Caparbo VF, Mural IH and Pereira RMR
(2022) Persistent or new symptoms 1
year after a single high dose of vitamin
D₃ in patients with moderate to severe
COVID-19.
Front. Nutr. 9:979667.
doi: 10.3389/fnut.2022.979667

COPYRIGHT
© 2022 Fernandes, Sales, Santos,
Caparbo, Mural and Pereira. This is an
open-access article distributed under
the terms of the [Creative Commons
Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use,
distribution or reproduction in other
forums is permitted, provided the
original author(s) and the copyright
owner(s) are credited and that the
original publication in this journal is
cited, in accordance with accepted
academic practice. No use, distribution
or reproduction is permitted which
does not comply with these terms.

Persistent or new symptoms 1 year after a single high dose of vitamin D₃ in patients with moderate to severe COVID-19

Alan L. Fernandes, Lucas P. Sales, Mayara D. Santos,
Valeria F. Caparbo, Igor H. Mural and Rosa M. R. Pereira*

Rheumatology Division, Faculdade de Medicina HCFMUSP, Hospital das Clínicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Purpose: The aim of this study was to investigate the reported persistent or new symptoms 1 year after a single dose of 200,000 IU of vitamin D₃ and hospitalization in patients with moderate to severe COVID-19.



Methods: This is a *post-hoc*, exploratory analysis from a multicenter, double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial from two hospitals in São Paulo, Brazil, registered in [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT04449718), NCT04449718. Discharged patients were followed for up to 1 year and evaluated by telephone interviews at 6 and 12 months. The primary and secondary outcomes were previously published. These *post-hoc* exploratory secondary outcomes are the persistent or new symptoms and quality of life (QoL) at the post-viral stage of COVID-19. Generalized estimating equations (GEE) for repeated measures with Bonferroni's adjustment were used for testing outcomes.

Results: Between 2 June and 27 August 2020, we randomized 240 patients of which 144 were included in this study [the vitamin D₃ ($n = 71$) or placebo ($n = 73$) group]. The mean (SD) age was 54.3 (13.1) years, and body mass index (BMI) was 32.4 (6.5) kg/m². Fever demonstrated a significant main effect of time ($P < 0.001$) with a reduction from baseline to 6 (52–0) and 12 months (52–0). No significant differences between groups were observed for fever, cough, fatigue, fever, myalgia, joint pain, runny nose, nasal congestion, sore throat, hypertension, diabetes, cardiovascular disease, rheumatic disease, asthma, chronic obstructive pulmonary, chronic kidney disease, QoL, and new or persistent symptoms up to 1-year of follow-up.

Conclusion: The findings do not support the use of 200,000 IU of vitamin D₃ compared to placebo for the management of persistence or new symptoms, and QoL reported by moderate to severe patients after hospitalization for COVID-19.

Social impact of disease parameters and damage accrual in adult Brazilian patients with childhood-onset Systemic Lupus Erythematosus

Lupus
2022, Vol. 0(0) 1-9
© The Author(s) 2022
Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-permissions
DOI: 10.1177/09612033221097798
journals.sagepub.com/home/lup
SAGE

Nicolas Y Tanigava¹, Ana P Sakamoto², André S Franco¹, Gabriela GM Balbi²,
Lucas P Sales¹, Nadia E Aikawa¹ , Maria T Terrieri² and Rosa MR Pereira¹ 

Abstract

Objectives: To describe the frequency and investigate potential associations of unemployment, need of financial assistance and health-related quality of life in adult patients with childhood-onset Systemic Lupus Erythematosus (cSLE).

Methods: In this multicenter cross-sectional retrospective cohort study including cSLE adult patients, questionnaires were applied evaluating demographic characteristics, medical history, treatment, receipt of government financial assistance, work status, quality of life, economic classification, disease activity, and damage accrual. Disease activity and disease damage were measured at the study visit.

Results: Sixty-nine cSLE patients with a median age of 21 years from two Brazilian tertiary centers were included (median disease duration 9 years). Twenty-eight (40.6%) patients were unemployed and 16 (23.2%) were receiving financial assistance or retirement pension. Work unemployment was associated with higher damage scores (OR 1.83, 95% CI 1.08 to 3.09, $p = 0.024$), and the need of financial assistance was associated with longer disease duration (OR 1.15, 95% CI 1.00 to 1.31, $p = 0.045$) and worse economic score (OR 0.87, 95% CI 0.77 to 0.99, $p = 0.038$). Emotional health and body image perception were the most compromised domains of quality of life but showed no association with disease parameters. Disease activity, on the other hand, was inversely associated with symptoms scores ($\beta = -1.377$, $p = 0.014$) and scores of adverse effects of medications ($\beta = -1.286$, $p = 0.020$).

Conclusion: cSLE is a disease with severe outcomes and high social burden that profoundly impacts patients. Damage accrual is a major contributor to unemployment during adulthood and its prevention must be central in the management of cSLE.

Keywords

Childhood-onset systemic lupus erythematosus, damage, unemployment, quality of life, cost of illness

Introduction

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is a chronic multi-systemic autoimmune disease with variable and unpredictable course. It predominantly affects young individuals, especially women, during their prime working years, yet up to 20% are diagnosed during the childhood, prior to the age of 18, which is classified as childhood-onset Systemic Lupus Erythematosus (cSLE).¹

The clinical manifestations of cSLE are generally more severe than what is observed in adult-onset SLE (aSLE).^{2,3} It has a higher risk of disease flares and higher rates of organ damage, lupus nephritis, and renal transplant, as well as a need of more medications to maintain disease remission.^{4,5}

¹Rheumatology Division, Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, SP, Brazil

²Hospital Sao Paulo, Universidade Federal de Sao Paulo, Sao Paulo, SP, Brazil

Corresponding authors:

Nicolas Y Tanigava, Rheumatology Division, Faculdade de Medicina FMUSP da Universidade de Sao Paulo, Av Dr Arnaldo, Sao Paulo 01246903, Brazil.

Email: nicolas.t@fm.usp.br

Rosa MR Pereira, Rheumatology Division, Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de Sao Paulo, Av Dr Arnaldo, 455, 3o andar Reumatologia, Sao Paulo, SP 01246-903, Brazil.

Email: rosamariarp@yahoo.com

Received: 25 March 2022 | Revised: 27 May 2022 | Accepted: 17 June 2022

DOI: 10.1111/1756-185X.14376

ORIGINAL ARTICLE

International Journal of
Rheumatic Diseases

WILEY

Lower hand grip in rheumatoid arthritis patients is associated with low finite element analysis using high resolution peripheral quantitative computed tomography scan of the 2nd metacarpophalangeal joint

Camille Pinto Figueiredo¹ | Mariana Ortega Perez¹ | Lucas Peixoto Sales¹ |
Diogo Souza Domiciano² | Marília M. Sampaio-Barros¹ | Valeria de Falco Caparbo¹ |
Rosa Maria Rodrigues Pereira^{1,2}

¹Bone Metabolism Laboratory, Rheumatology Division, Faculdade de Medicina FMUSP Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

²Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo HCFMUSP, Sao Paulo, Brazil

Correspondence

Camille Pinto Figueiredo, Bone Metabolism Laboratory, Rheumatology Division, Faculdade de Medicina FMUSP Universidade de Sao Paulo, Av. Dr. Arnaldo 455, 3^o andar, sala 3193, Sao Paulo 01246-903, Brazil.
Email: figueiredocamille@gmail.com

Funding information

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Grant/Award Number: 2016/00006-7 and 2018/01315-9

Abstract

Aim: To evaluate hand function by hand grip test in rheumatoid arthritis (RA) patients, and its association with bone erosions and the estimated bone strength (finite element - FE analysis) through the analysis of the 2nd metacarpal head of the dominant hand using high resolution peripheral quantitative computed tomography (HR-pQCT).

Method: Eighty-two female RA patients between 18-50 years old were selected. Demographic data, Health Questionnaire Assessment Disability Index (HAQ), Disease Activity Score of 28 joints (DAS)-28, simplified disease activity index (SDAI) and the hand grip test were set. The HR-pQCT scans of 2nd metacarpophalangeal joints of the dominant hand of all patients were performed according to SPECTRA group protocols. The images were used to assess bone erosions and FE analysis. The hand grip test was categorized in 2 groups and separately compared (<18 vs ≥18 kgf). A logistic regression was performed using hand grip test <18 kgf as a dependent variable.

Results: A significant difference was found between the 2 groups regarding HAQ, inflammatory markers (erythrocyte sedimentation rate, C-reactive protein), DAS-28, SDAI, total volume of erosion and bone strength parameter (FE analysis - Failure Load [F.Load]). The logistic regression analysis showed that the risk factors associated with hand grip test <18 kgf were higher SDAI (odds ratio [OR] 0.912; 95% CI 0.837-0.993) and lower values of bone strength parameter (F.Load) (OR 1.007; 95% CI 1.002-1.012).

Conclusion: Lower values of hand grip test were associated with higher disease activity score-SDAI and lower bone strength of 2nd metacarpal bone head of the dominant hand evaluated here through a FE analysis using HR-pQCT scan.

KEYWORDS

finite element, hand grip strength, HR-pQCT, metacarpophalangeal joint, rheumatoid arthritis

JAMA | Original Investigation

Effect of a Single High Dose of Vitamin D₃ on Hospital Length of Stay in Patients With Moderate to Severe COVID-19

A Randomized Clinical Trial

Igor H. Murali, PhD; Alan L. Fernandes, PhD; Lucas P. Sales, MSc; Ana J. Pinto, BSc; Karla F. Goessler, PhD; Camila S. C. Duran, MD; Carla B. R. Silva, MD; André S. Franco, MD; Marina B. Macedo, MD, MSc; Henrique H. H. Dalmolin, MD; Janaina Baggio, MD; Guilherme G. M. Baboi, MD; Bruna Z. Reis, PhD; Leila Antonangelo, MD, PhD; Valeria F. Caparbo, PhD; Bruno Gualano, PhD; Rosa M. R. Pereira, MD, PhD

IMPORTANCE The efficacy of vitamin D₃ supplementation in coronavirus disease 2019 (COVID-19) remains unclear.

OBJECTIVE To investigate the effect of a single high dose of vitamin D₃ on hospital length of stay in patients with COVID-19.

DESIGN, SETTING, AND PARTICIPANTS This was a multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled trial conducted in 2 sites in Sao Paulo, Brazil. The study included 240 hospitalized patients with COVID-19 who were moderately to severely ill at the time of enrollment from June 2, 2020, to August 27, 2020. The final follow-up was on October 7, 2020.

INTERVENTIONS Patients were randomly assigned to receive a single oral dose of 200 000 IU of vitamin D₃ (n = 120) or placebo (n = 120).

MAIN OUTCOMES AND MEASURES The primary outcome was length of stay, defined as the time from the date of randomization to hospital discharge. Prespecified secondary outcomes included mortality during hospitalization; the number of patients admitted to the intensive care unit; the number of patients who required mechanical ventilation and the duration of mechanical ventilation; and serum levels of 25-hydroxyvitamin D, total calcium, creatinine, and C-reactive protein.

RESULTS Of 240 randomized patients, 237 were included in the primary analysis (mean [SD] age, 56.2 [14.4] years; 104 [43.9%] women; mean [SD] baseline 25-hydroxyvitamin D level, 20.9 [9.2] ng/mL). Median (interquartile range) length of stay was not significantly different between the vitamin D₃ (7.0 [4.0-10.0] days) and placebo groups (7.0 [5.0-13.0] days) (log-rank *P* = .59; unadjusted hazard ratio for hospital discharge, 1.07 [95% CI, 0.82-1.39]; *P* = .62). The difference between the vitamin D₃ group and the placebo group was not significant for in-hospital mortality (7.6% vs 5.1%; difference, 2.5% [95% CI, -4.1% to 9.2%]; *P* = .43), admission to the intensive care unit (16.0% vs 21.2%; difference, -5.2% [95% CI, -15.1% to 4.7%]; *P* = .30), or need for mechanical ventilation (7.6% vs 14.4%; difference, -6.8% [95% CI, -15.1% to 1.2%]; *P* = .09). Mean serum levels of 25-hydroxyvitamin D significantly increased after a single dose of vitamin D₃ vs placebo (44.4 ng/mL vs 19.8 ng/mL; difference, 24.1 ng/mL [95% CI, 19.5-28.7]; *P* < .001). There were no adverse events, but an episode of vomiting was associated with the intervention.

CONCLUSIONS AND RELEVANCE Among hospitalized patients with COVID-19, a single high dose of vitamin D₃ compared with placebo, did not significantly reduce hospital length of stay. The findings do not support the use of a high dose of vitamin D₃ for treatment of moderate to severe COVID-19.

TRIAL REGISTRATION ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04449718

JAMA. doi:10.1001/jama.2020.26848
Published online February 17, 2021.

 Editorial
 Supplemental content

Author Affiliations: Author affiliations are listed at the end of this article.

Corresponding Author: Rosa Maria Rodrigues Pereira, MD, PhD, Rheumatology Division, Faculdade de Medicina FMUSP, 3^o andar, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, SP, BR. Av. Dr. Arnaldo, 455, Pacaembu, Sao Paulo, SP, Brazil. 0046-903 (rosamariarp@yahoo.com).

E1



Effect of a single high dose of vitamin D₃ on cytokines, chemokines, and growth factor in patients with moderate to severe COVID-19

Alan L. Fernandes,¹ Igor H. Murai,¹ Bruna Z. Reis,¹ Lucas P. Sales,¹ Mayara D. Santos,¹ Ana J. Pinto,² Karla F. Goessler,² Camila SC. Duran,¹ Carla BR. Silva,¹ André S. Franco,¹ Marina B. Macedo,¹ Henrique HH. Dalmolin,¹ Janaina Baggio,¹ Guilherme GM. Bulbi,¹ Leila Antonangelo,³ Valeria F. Caparbo,¹ Bruno Gualano,^{2,4} and Rosa MR. Pereira¹

¹Rheumatology Division, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil; ²Applied Physiology & Nutrition Research Group, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil; ³Clinical Pathology Division, Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil; and ⁴Food Research Center, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

ABSTRACT

Background: The modulating effect of vitamin D on cytokine concentrations in severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) remains unknown.

Objectives: We aimed to investigate the effect of a single high dose of vitamin D₃ on cytokines, chemokines, and growth factor in hospitalized patients with moderate to severe COVID-19.

Methods: This is a post hoc, ancillary, and exploratory analysis from a multicenter, double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial. Patients with moderate to severe COVID-19 were recruited from 2 hospitals in São Paulo, Brazil. Of 240 randomly assigned patients, 200 were assessed in this study and randomly assigned to receive a single oral dose of 200,000 IU vitamin D₃ ($n = 101$) or placebo ($n = 99$). The primary outcome was hospital length of stay, which has been published in our previous study. The prespecified secondary outcomes were serum concentrations of IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , and 25-hydroxyvitamin D. The post hoc exploratory secondary outcomes were IL-4, IL-12p70, IL-17A, IFN- γ , granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), IL-8, IFN-inducible protein-10 (IP-10), macrophage inflammatory protein-1 β (MIP-1 β), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), vascular endothelial growth factor (VEGF), and leukocyte count. Generalized estimating equations for repeated measures, with Bonferroni's adjustment, were used for testing all outcomes.

Results: The study included 200 patients with a mean \pm SD age of 55.5 \pm 14.3 y and BMI of 32.2 \pm 7.1 kg/m², of which 109 (54.5%) were male. GM-CSF concentrations showed a significant group-by-time interaction effect ($P = 0.04$), although the between-group difference at postintervention after Bonferroni's adjustment was not significant. No significant effects were observed for the other outcomes.

Conclusions: The findings do not support the use of a single dose of 200,000 IU vitamin D₃, compared with placebo, for the improvement of cytokines, chemokines, and growth factor in hospitalized patients with moderate to severe COVID-19. This trial was registered at clinicaltrials.gov as NCT04449718. *Am J Clin Nutr* 2022;115:790–798.

Keywords: immune response, SARS-CoV-2, inflammation, acute-phase reactants, vitamin D

Introduction

Vitamin D has arisen as a mediator of the innate (1–3) and adaptive immune responses (4, 5). The active form of vitamin D, 1,25-dihydroxyvitamin D [1,25(OH)₂D], could contribute to the induction of viral neutralization and recruitment of neutrophils, monocytes, macrophages, and dendritic cells (6). Furthermore, 1,25(OH)₂D may avoid chronic activation of the innate immune response by limiting maturation of dendritic cells, inducing immune tolerance, downregulating toll-like receptors, and adjusting both the TNF- α /NF- κ B and

Supported Supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) grants 2020/11102-2 (to ALF), 2019/24782-4 (to IHM), 2019/18039-7 (to KFG), and 2020/05752-4 (to RMRP), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) grant 305556/2017-7 (to RMRP). The funders had no role in the design and conduct of the study; collection, management, analysis, and interpretation of the data; preparation, review, or approval of the manuscript; and decision to submit the manuscript for publication.

ALF and IHM contributed equally to this work.

Address correspondence to RMRP (e-mail: rosamariarp@yahoo.com).

Abbreviations used: BMI, body mass index; COVID-19, coronavirus disease 2019; GEE, generalized estimating equation; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; ICU, intensive care unit; IFN- γ , interferon γ ; IP-10, interferon-inducible protein-10; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; MIP-1 β , macrophage inflammatory protein-1 β ; NF- κ B, nuclear factor κ B; PCR, polymerase chain reaction; SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; TNF- α , tumor necrosis factor α ; VEGF, vascular endothelial growth factor; 1,25(OH)₂D, 1,25-dihydroxyvitamin D; 25(OH)D, 25-hydroxyvitamin D.

Received August 6, 2021. Accepted for publication December 27, 2021.

First published online January 10, 2022; doi: <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqab426>.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Bone erosion in the 2nd metacarpophalangeal head: association with its bone mineral density by HR-pQCT in rheumatoid arthritis patients

Camille P. Figueiredo^{1*}, Mariana O. Perez¹, Lucas Peixoto Sales¹, Ana Cristina Medeiros², Valeria F. Caparbo¹ and Rosa M. R. Pereira^{1,2*}**Abstract**

Background: Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic autoimmune disease depicted by synovial inflammation leading to local and systemic bone loss. The aim of this study was to evaluate by a HR-pQCT (High Resolution Peripheral Quantitative Computed Tomography) study which parameters are associated with volume of bone erosions including bone mineral density (BMD) around erosions (VOI 1 to 4 = volume of interest), BMD of metacarpophalangeal (MCP) head, BMD of radius, presence of osteophytes and joint space width (JSW).

Methods: Fifty female RA patients (18–50 years) were enrolled in this study. Demographic and disease-specific data, laboratory inflammatory parameters and handgrip test were performed. All patients underwent HR-pQCT of 2nd and 3rd MCP joints and distal radius, according to established protocols. The volume of bone erosions was evaluated by MIAF (Medical Image Analysis Framework) software. Osteophytes were analyzed by manual method.

Results: The mean of age and disease duration were 40.0 ± 6.0 yrs. and 10.8 ± 4.8 yrs., respectively. According to DAS-28 (Disease Activity Score), 54% (27) of the sample were in remission. However, when SDAI (Simplified Disease Activity Index) was used, only 18% (9) were under remission. The mean of HAQ (Health Assessment Questionnaire), ESR (Erythrocyte sedimentation rate) and CRP (C reactive protein) were 0.9 ± 0.7 , 13.9 ± 12.2 mm and 5.6 ± 7.5 mg/mL, respectively. Forty-six bone erosions (0.9 ± 1.2 erosion/patient) and 14 osteophytes (0.3 ± 0.7 osteophyte/patient) were found in 2nd MCP head. The median (IQR-Interquartile range) of volume of erosion and volume of osteophytes were 14.9 (5.7 ; 35.9) mm³ and 3.1 (2.1 , 4.3) mm³, respectively. The mean of JSW was 80.5 ± 34.2 mm³. The volume of bone erosions was negatively correlated with BMD of 2nd MCP head, VOI-4 and JSW; and it was positively correlated with osteophytes number. Regarding absence or presence of erosion in 2nd MCP head, a significant difference was found between BMD of MCP head, osteophyte number and JSW. Multiple linear regression analysis showed that only BMD of 2nd MCP head was independently associated with volume of bone erosions.

(Continued on next page)

* Correspondence: figueiredocamille@gmail.com; rosamariap@yahoo.com¹Bone Metabolism Laboratory, Rheumatology Division, Faculdade de Medicina FMUSP Universidade de Sao Paulo, Av. Dr. Arnaldo 455, 3^o andar, sala 3105, Sao Paulo 01246-903, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2021 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.



Original articles

Anti-SARS-CoV-2 inactivated vaccine in patients with ANCA-associated vasculitis: Immunogenicity, safety, antibody decay and the booster dose



Rosa M.R. Pereira^a, Marília A. Dagostin^{a,*}, Valeria F. Caparbo^a, Lucas P. Sales^{a,b}, Sandra G. Pasoto^a, Clovis A. Silva^b, Emily F.N. Yuki^a, Carla G.S. Saad^a, Ana C. Medeiros-Ribeiro^a, Leonard V.K. Kupa^a, Solange R.G. Fusco^a, Victor A.O. Martins^a, Carolina C.M.F. Martins^a, Carmen Valente Barbas^a, Samuel K. Shinjo^a, Nadia E. Aikawa^{a,b}, Eloisa Bonfa^a

^a Rheumatology Division, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (HCFMUSP), São Paulo, SP, Brazil

^b Pediatric Rheumatology Unit, Instituto da Criança e do Adolescente, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (HCFMUSP), São Paulo, Brazil

^c Pulmonary Division, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (HCFMUSP), São Paulo, SP, Brazil

HIGHLIGHTS

- This study provides evidence that CoronaVac, an inactivated virus vaccine against SARS-CoV-2, is safe and has a moderate immunogenicity in AAV.
- The authors identified that immunogenicity is negatively influenced by glucocorticoids.
- A mild antibody decay occurs in 6-months with a good response with a booster dose, although lower than health controls.

ARTICLE INFO

Keywords:
ANCA-associated vasculitis
Vaccine
SARS-CoV-2
Immunogenicity

ABSTRACT



Objective: To evaluate inactivated CoronaVac prime vaccination, antibody decay, booster dose, and safety in ANCA-Associated Vasculitis (AAV) patients.

Methods: Fifty-three AAV patients and 106 Controls (CG) received CoronaVac on days: D0 (first dose), D28(second dose), and D210 (booster dose, 32 AAV; 32 CG). The primary outcome was immunogenicity after the second vaccine dose (day 69) assessed by Seroconversion Rates (SC) of anti-SARS-CoV-2 S1/S2 IgG and Neutralizing Antibodies (NAb). Secondary outcomes were safety, immunogenicity (D28/D240), 6-months antibody decay (D210) and the booster dose response (D240).

Results: At D69 SC (65.1% vs. 96.8%, $p = 0.0001$), GMT (21.3 UA/mL vs. 67.7 UA/mL, $p < 0.001$) and NAb-positivity (53.7% vs. 80.6%, $p = 0.001$) were moderate but lower in naïve-AAV patients than CG. Patients without SC used more often IS (93.3% vs. 53.3%, $p = 0.015$), mycophenolate mofetil (20% vs. 0%, $p = 0.037$) and prednisone (60.0% vs. 28.6%, $p = 0.057$) than seroconverted. NAb negativity in AAV patients was associated with prednisone treatment (57.9% vs. 18.2%, $p = 0.015$) and IS (84.2% vs. 55.0%, $p = 0.046$). Logistic regression analysis models showed that only prednisone was associated with lower seroconversion (OR = 0.2, 95% CI 0.05–0.86, $p = 0.030$) and with lower NAb positivity (OR = 0.2, 95% CI 0.05–0.88, $p = 0.034$). After six months (D69–D210) a decrease in IgG positivity occurred in 32 AAV patients (15.7%, $p = 0.074$) and 32 CG (18.7%, $p = 0.041$). For the NAb positivity, the 6-month decrease was not significant ($p = 0.114$) whereas a major reduction occurred for CG ($p < 0.001$). A booster dose (D240) resulted in an increment in IgG-positivity (21.9%, $p = 0.023$) and NAb-positivity (34.4%, $p = 0.006$) in AAV patients. No moderate/severe adverse events attributable to the vaccine were observed.

Conclusion: This study provides novel data on the excellent safety and moderate immunogenicity of CoronaVac in AAV patients. A six-month mild antibody waning was observed with a good response to the booster dose, although levels remained lower than CG (CoronaRheum-NCT04754698).

Association of Bone Erosions and Osteophytes With Systemic Bone Involvement on High-Resolution Peripheral Quantitative Computed Tomography in Premenopausal Women With Longstanding Rheumatoid Arthritis

Mariana O. Perez, Camille P. Figueiredo,  Lucas P. Sales, Ana Cristina Medeiros-Ribeiro, Liliam Takayama, Diogo S. Domiciano, Karina Bonfiglioli, Valeria F. Caparbo, and Rosa M. R. Pereira 

Objective. To evaluate premenopausal women with longstanding rheumatoid arthritis (RA) for potential associations between parameters of localized bone involvement and parameters of systemic bone involvement in the affected joints.

Methods. Eighty consecutively evaluated premenopausal women with RA were included in the study, along with 160 healthy female control subjects who were matched to the patients by age and body mass index. Volumetric bone mineral density (vBMD), bone microarchitecture, and finite elements of biomechanical bone strength (bone stiffness and estimated failure load) at the distal radius and distal tibia were analyzed by high-resolution peripheral quantitative computed tomography (HR-pQCT) in patients with RA compared to healthy controls. In addition, in patients with RA, localized bone involvement in the metacarpophalangeal and proximal interphalangeal joints was analyzed by HR-pQCT, to identify bone erosions and osteophytes.

Results. Among the 80 premenopausal women with longstanding RA, the mean \pm SD age was 39.4 ± 6.7 years and mean \pm SD disease duration was 9.8 ± 5.3 years. Trabecular and cortical bone parameters and bone strength at the distal radius and distal tibia were all impaired in patients with RA compared to healthy controls (each $P < 0.05$). In total, 75% of RA patients had evidence of bone erosions, and 41.3% of RA patients had detectable osteophytes on HR-pQCT. RA patients with bone erosions, as compared to RA patients without bone erosions, had lower cortical vBMD (at the distal radius, mean \pm SD 980 ± 72 mg HA/cm³ versus $1,021 \pm 47$ mg HA/cm³ [$P = 0.03$]; at the distal tibia, 979 ± 47 mg HA/cm³ versus $1,003 \pm 34$ mg HA/cm³ [$P = 0.04$]) and higher cortical bone porosity (at the distal radius, mean \pm SD $2.8 \pm 2.5\%$ versus $1.8 \pm 1.6\%$ [$P = 0.04$]; at the distal tibia, $3.7 \pm 1.6\%$ versus $2.7 \pm 1.6\%$ [$P = 0.01$]). In patients with RA, osteophyte volume at the distal radius was positively correlated with trabecular vBMD ($r = 0.392$, $P = 0.02$), trabecular number ($r = 0.381$, $P = 0.03$), and trabecular stiffness ($r = 0.411$, $P = 0.02$), and negatively correlated with trabecular separation ($r = -0.364$, $P = 0.04$), as determined by Pearson's or Spearman's correlation test.

Conclusion. The findings show that premenopausal women with longstanding RA have systemic bone fragility at peripheral joint sites. Moreover, the presence of bone erosions is mainly associated with cortical bone fragility at the distal radius and tibia, and presence of osteophytes is associated with repair of trabecular bone at the distal radius.