

Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad
Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético

Paulo Ricardo Picon Alves

Análise metabolômica do líquido sinovial de pacientes com
osteoartrite e artrite reumatóide

Rio de Janeiro
2022

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

Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético

ANÁLISE METABOLÔMICA DO LÍQUIDO SINOVIAL DE
PACIENTES COM OSTEOARTRITE E ARTRITE REUMATÓIDE

Paulo Ricardo Picon Alves

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências

Orientador (es): Prof. Dr. Eduardo Branco de Sousa
Prof. Dr. Gilson Costa dos Santos Junior

Rio de Janeiro
Maio
2022

CATALOGAÇÃO NA FONTE
INTO/BIBLIOTECA SÉRGIO EDUARDO VIANNA

A47a Alves, Paulo Ricardo Picon.
 Análise metabólica do líquido sinovial de pacientes com osteoartrite e
 artrite reumatoide /Paulo Ricardo Picon Alves. — 2022.
 xvi,102 f.: il.

 Orientadores: Eduardo Branco de Sousa e Gilson Costa dos Santos Júnior.
 Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema
 Musculoesquelético) — Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia
 Jamil Haddad, Rio de Janeiro, 2022.

 1. Artrite reumatoide. 2. Líquido sinovial. 3. Metabólica. 4.
 Osteoartrite. 5. Ortopedia. I. Sousa, Eduardo Branco de; Santos Júnior, Gilson
 Costa dos, orient. II. Título.

NLM WE 344

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

Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético

ANÁLISE METABOLÔMICA DO LÍQUIDO SINOVIAL DE
PACIENTES COM OSTEOARTRITE E ARTRITE REUMATÓIDE

Paulo Ricardo Picon Alves

Banca examinadora:

Dra. Aline Cordeiro Fernandes Ladeira (Docente interna)

Dr. Fabrício Bolpato Loures (Docente externo)

Dr. Márcio Antônio Babinski (Docente externo)

Dra. Anneliese Fortuna de Azevedo Freire da Costa (Suplente interna)

Dr. Rodrigo Satamini Pires e Albuquerque (Revisor)

Rio de Janeiro
Maio
2022

À minha esposa, Rafa, companheira amada de longa data e principal incentivadora em todos os projetos da minha vida.

Ao meu filho, João Pedro, que, embora ainda no ventre, já é uma grande inspiração para me tornar uma pessoa e um profissional melhor.

Aos meus pais, Lina e Antônio, minha base sólida e meus mestres na vida.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Eduardo Branco, por ter me recebido e aceitado ser meu orientador, logo em minha chegada no Rio de Janeiro, quando, apesar de aprovado no processo seletivo do mestrado, eu ainda não tinha um projeto de pesquisa viável. Obrigado por todo zelo, disponibilidade e paciência com a qual me conduziste em todas as etapas dessa jornada. Além disso, agradeço por teres me estimulado a encarar a pesquisa em ciência básica, um campo que extrapola um pouco a nossa rotina profissional, mas que me fascinou e no qual pretendo seguir estudando.

Ao professor Gilson, coorientador desta pesquisa, pela oportunidade de conhecer a metabolômica e por toda sua ajuda e tranquilidade ao tentar explicar conceitos tão complexos.

Ao professor Diego Aguiar, que, apesar de não ser meu orientador neste trabalho, atuou diretamente em diversas fases do estudo, tanto com conselhos e sugestões, como, de forma ativa, no processamento e no transporte das nossas amostras.

À professora e coordenadora Ana Carolina Leal, pela disponibilidade, estímulo e justas cobranças ao longo das etapas do curso, além de sempre buscar ponderar e ajudar os alunos nas dificuldades encontradas.

Aos ilustres professores Dr. João Matheus e Dra. Maria Eugênia, por todo entusiasmo e qualidade que ministram suas aulas e guiam seus alunos, sendo grandes exemplos e fonte de inspiração para o nosso aprimoramento científico.

Às professoras Aline e Anneliese e ao professor Rodrigo, pela diligência no processo de qualificação e revisão, com diversas contribuições para o aperfeiçoamento deste trabalho.

À professora Tatiana El-Bacha, do Instituto de nutrição da UFRJ, pela ajuda no processamento de algumas amostras e na execução das análises dos espectros.

A todos os professores e colegas do curso, mestres e companheiros desta jornada, durante o tempo conturbado da pandemia.

Ao Dr. Alan Mozella, chefe do CAE do joelho, pela disponibilidade e pela ajuda durante a execução da pesquisa, estimulando a aderência do grupo do joelho, no processo de coleta das amostras no ato operatório.

A todos os cirurgiões do grupo do joelho, aos residentes do INTO, aos instrumentadores e demais funcionários do centro cirúrgico, pelo auxílio na coleta, no acondicionamento e no transporte das amostras no INTO. Um agradecimento especial ao ex-residente Augusto, que participou ativamente da pesquisa, principalmente na coleta de dados e na aplicação do TCLE.

Ao INTO, pela inestimada oportunidade de aperfeiçoamento, em um Hospital público, com estrutura de ponta e profissionais com nível técnico elevadíssimo. Aos pacientes do INTO pela confiança e pela oportunidade de seguir minha pesquisa.

Ao CENABIO I e seus funcionários, pela oportunidade de utilizar sua estrutura para esta pesquisa.

Ao Instituto de nutrição da UFRJ, e aos funcionários do laboratório, pela disponibilização do espaço, para a execução da fase final de processamento das amostras.

“Uma sociedade cresce bem quando homens velhos plantam árvores, mesmo sabendo que nunca irão usufruir de sua sombra.”

(Provérbio grego)

RESUMO

ALVES, Paulo Ricardo Picon. Análise metabolômica do líquido sinovial de pacientes com osteoartrite e artrite reumatoide. Rio de Janeiro, 2022. Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético) - Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad, Ministério da Saúde, 2022.

A osteoartrite (OA) do joelho é caracterizada pela destruição articular progressiva, afetando a articulação como um órgão, sendo influenciada pelo envelhecimento, por fatores biomecânicos e metabólicos. Já a artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune, com envolvimento genético e ambiental, cursando com inflamação crônica poliarticular, usualmente simétrica e progressiva. A análise de metabólitos ajuda na compreensão das cascatas biológicas, no contexto de consumo energético e metabólico, e o líquido sinovial é o biofluido mais apropriado para a avaliação articular. Os metabólitos constituem um grupo diverso de estruturas de baixo peso molecular e a mensuração das concentrações destes elementos permite inferir sobre o fenótipo de algumas doenças. O objetivo deste estudo foi comparar o perfil metabólico do líquido sinovial de pacientes com artrite reumatoide e com osteoartrite do joelho e tentar identificar os metabólitos que distinguem o líquido sinovial nestes dois distúrbios. Além disso, buscamos correlacionar os dados clínicos dos pacientes com osteoartrite de acordo com o perfil metabólico do líquido sinovial. Coletamos amostras de líquido sinovial do joelho de 50 indivíduos com osteoartrite e de quatro com artrite reumatoide, durante artroplastia total do joelho, no INTO, entre outubro de 2019 e dezembro de 2020. Avaliamos, para cada paciente, os dados clínicos do prontuário médico, a radiografia do joelho e a glicemia de jejum pré-operatória. As amostras foram submetidas à análise metabolômica por RNM ^1H , e os espectros foram comparados por meio de análises multivariadas e univariadas. Não houve diferenças demográficas entre os grupos e não foi possível classificar os pacientes com OA e AR de acordo com o perfil metabólico do líquido sinovial. Na osteoartrite, o sexo feminino prevaleceu (66%), a média de idade foi $67,96 \pm 7,08$ anos e a média do IMC foi de $32,51 \pm 5,25$ kg/m². Nas avaliações clínicas e metabólicas dos pacientes com OA, 88% destes eram hipertensos, e encontramos maiores níveis de valina, arginina e citrato em comparação com não hipertensos. Em relação ao grau de OA, observamos que o 3-hidroxiбутирато e a valina expressaram níveis decrescentes em função da gravidade radiográfica. Além disso, 12% apresentavam doença renal crônica e, nestes, o 3-hidroxiбутирато, a valina e a fenilalanina expressaram menores concentrações. Não foi possível distinguir o perfil metabólico pelo IMC, mas o metabólito glicose manifestou menor concentração nos obesos. A análise metabolômica do líquido sinovial não conseguiu distinguir a OA da AR, talvez pela nossa pequena amostra de pacientes reumatoides. Porém, demonstramos a estreita relação entre hipertensão e OA, e o comportamento de alguns metabólitos em situações clínicas específicas fomenta o aprofundamento no tema, na busca por biomarcadores.

Palavras-chave: Metabolômica, osteoartrite, artrite reumatoide, líquido sinovial.

ABSTRACT

ALVES, Paulo Ricardo Picon. Metabolomic analysis of synovial fluid from patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. Rio de Janeiro, 2022. Master Thesis. (Master's Degree in Applied Sciences to the Musculoskeletal System) - National Institute of Traumatology and Orthopedics Jamil Haddad, Ministry of Health, 2022.

Knee osteoarthritis (KOA) is a disease characterized by progressive articular destruction, affecting the joint as an organ, which is influenced by aging, biomechanical and metabolic factors. By contrast, rheumatoid arthritis (RA) is an auto immune disease, with genetic and environment involvement, characterized by chronic polyarticular inflammation, usually symmetric and progressive. Metabolites analysis helps to understand the biological cascades, in the context of metabolic and energetic demands, and synovial fluid is the most suitable biofluid for this purpose. Metabolites represent a diverse group of low molecular weight structures, which measurement allows to inference over some disease's phenotypes. The goal of this study was to compare the metabolic profile of KOA and RA and to identify the most relevant metabolites to differentiate these two conditions. Moreover, it was evaluated the possibility to classify KOA patients according to clinical parameters and to the synovial fluid metabolic profile. Synovial fluid samples were collected from the knee of 50 individuals with KOA and four individuals with RA, who underwent total knee replacement in the National Institute of Traumatology and Orthopedics, between October 2019 and December 2020. We evaluated, for each patient, the medical records, as well as the knee radiograph and the pre-operative level of serum glucose. Synovial fluid samples underwent ¹H NMR metabolomic analysis, and the spectra obtained were compared by univariate and multivariate analysis. There were no demographic differences between groups, and it was not possible to classify patients with KOA or RA according to synovial fluid metabolic profile. In KOA group, most patients were females (66%), mean age was 67.96 ± 7.08 years and mean BMI was 32.51 ± 5.25 kg/m². In the clinical and metabolic analysis of patients with OA, 88% had systemic arterial hypertension, and we found highest levels of valine, arginine and citrate compared to non-hypertensive. Regarding the degree of KOA, we observed that 3-hydroxybutyrate and valine levels were inversely proportion to radiographic severity. Furthermore, 12% had chronic kidney disease and, in these, 3-hydroxybutyrate, valine and phenylalanine expressed lower concentrations. It was not possible to distinguish the metabolic profile by BMI, but, unexpectedly, the glucose metabolite showed a lower concentration in the obese. Metabolomics of synovial fluid was not able to distinguish KOA from RA, possibly because of our limited rheumatoid group. However, we demonstrated the close relationship between hypertension and KOA. Beyond that, the behavior of some metabolites in specific clinical situations stimulates the improvement of research on the subject, in the search for biomarkers.

Keywords: Metabolomics, osteoarthritis, rheumatoid arthritis, synovial fluid.

SUMÁRIO

	RESUMO	VIII
	ABSTRACT	IX
	LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	XII
	LISTA DE FIGURAS	XIV
	LISTA DE QUADROS E TABELAS	XVI
1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Biologia articular	1
1.1.1	Membrana sinovial	3
1.1.2	Líquido sinovial	6
1.1.3	Cartilagem hialina	8
1.2	Osteoartrite	14
1.2.1	Fisiopatologia	15
1.2.2	Osteoartrite e envelhecimento	19
1.2.3	Osteoartrite e disfunção mitocondrial	20
1.2.4	Fenótipos da osteoartrite	22
1.2.5	Osteoartrite metabólica	23
1.3	Artrite reumatoide	26
1.3.1	Patogênese da AR	28
1.4	Metabolômica	32
1.4.1	Análise metabolômica por RNM	34
1.4.2	Metabolômica na OA e na AR	36
2	JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	41
3	OBJETIVOS	42
3.1	Objetivo principal	42
3.2	Objetivos específicos	42
4	METODOLOGIA	43
4.1	Desenho do estudo	43
4.2	Aspectos éticos	43
4.3	Pacientes	43
4.3.1	Inclusão	43
4.3.2	Exclusão	44
4.4	Avaliação clínica e laboratorial	44
4.4.1	Identificação	44
4.4.2	Aspectos demográficos	44
4.4.3	Dados antropométricos	44
4.4.4	Aspectos clínicos	44
4.4.5	Glicemia de jejum	45
4.5	Avaliação radiográfica	45
4.6	Coleta, transporte e armazenamento das amostras	46
4.7	Processamento das amostras	46
4.8	Análise metabolômica	47
4.8.1	Equipamento e preparação das amostras	47
4.8.2	Aquisição dos espectros	48
4.9	Análise estatística	49
4.9.1	Análise dos dados demográficos	49
4.9.2	Análise dos espectros	50
5	RESULTADOS	52

5.1	Caracterização da amostra	52
5.2	Perfil metabólico sinovial na OA e na AR	53
5.3	Comparação pela gravidade da OA	54
5.4	Comparação por faixas etárias	55
5.5	Comparação pelo sexo	55
5.6	Comparação pelo índice de massa corporal	56
5.7	Comparação pela glicemia de jejum	57
5.8	Comparação pelo diagnóstico de hipertensão arterial	58
5.9	Comparação pelo diagnóstico de diabetes mellitus	59
5.10	Comparação pelo diagnóstico de dislipidemia	60
5.11	Comparação pelo diagnóstico de cardiopatia	61
5.12	Comparação pelo diagnóstico de doença renal crônica	62
6	DISCUSSÃO	64
7	CONCLUSÃO	78
8	REFERÊNCIAS	79
ANEXO A	Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/INTO)	97
APÊNDICE A	Características gerais dos pacientes incluídos	101

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AA	Aminocácidos
ADAMTS	<i>A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs</i>
ADMA	dimetilarginina assimétrica
AGE	<i>Advanced glycation end products</i> (Produtos finais da glicação avançada)
AGL	Ácido graxo livre
ANOVA	Análise de variância
Anti-CCP	Anticorpo contra peptídeo citrulizado cíclico
APMk	<i>Adenosine monophosphate-activated protein kinase</i> (Proteína Quinase Ativada por Monofosfato de Adenosina)
AR	Artrite reumatóide
ATJ	Artroplastia total do joelho
ATP	Adenosina trifosfato
BCAA	<i>Branched-chain amino acids</i> (Aminoácidos de cadeia ramificada)
°C	Grau Celsius
CAE	Centro de Atenção Especializada
CENABIO	Centro Nacional de Biologia Estrutural e Bioimagem
CG	Cromatografia gasosa
CL	Cromatografia líquida
CNRMNM	Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear de Moléculas
COX-2	Ciclooxigenase 2
Da	Dáltons
DAMP	<i>Damage associated molecular patterns</i> (Padrões moleculares associados a dano)
dL	Decilitro
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
EAFTM	Espaço articular femoro-tibial medial
EM	Espectrometria de massa
FGF- β	<i>Basic fibroblast growth factor</i> (Fator de crescimento de fibroblastos básico)
FNT- α	Fator de necrose tumoral α
FR	Fator reumatóide
g	Gravidade
GAG	Glicosaminoglicanas
GLUT	<i>Glucose transporter</i> (Transportador de glicose)
^1H	Átomo de hidrogênio de massa atômica 1
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HIF	<i>Hypoxia-inducible factor</i> (Fator induzível por hipóxia)
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i> (Antígeno leucocitário humano)
IL	Interleucina
IMC	Índice de massa corporal
INF- γ	Interferon gama
INTO	Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia
K	<i>Kelvin</i>
KOA	<i>Knee osteoarthritis</i> (osteoartrite do joelho)
LCA	Ligamento cruzado anterior

LPS	Lipopolissacarídeo
M1	Macrófago do tipo 1
M2	Macrófago do tipo 2
MEC	Matrix extracelular
MHz	Mega-hertz
μL	Microlitro
mg	miligrama
mL	mililitro
mM	Milimolar
MMP	Metaloproteinases
mTORC	Mammalian target of rapamycin complex 1 (Alvo mamífero do complexo 1 de rapamicina)
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NF-κB	<i>Nuclear factor Kappa B</i> (fator nuclear Kappa B)
OA	Osteoartrite
Ob-R	Receptor de leptina
PC	<i>Principal component</i> (Componente principal)
PCA	<i>Principal component analysis</i> (Análise do componente principal)
PDGF	<i>Platelet derived fator</i> (Fator de crescimento derivado de plaquetas)
PLS	<i>Partial Least Square</i> (Mínimos quadrados parciais)
RA	<i>Rheumatoid arthritis</i>
RAGE	<i>Receptor of advanced glycation end products</i> (Receptor de produtos finais da glicação avançada)
RANKL	<i>Receptor activator of nuclear factor-κB ligand</i> (Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B)
RMN	Ressonância magnética nuclear
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (Espécies reativas de oxigênio)
RUNX-2	<i>Runt-related transcription factor 2</i> (Fator de transcrição relacionado a Runt 2)
SOX	SRY-Box transcription factor
TLR	<i>Toll like receptor</i> (Receptor do tipo toll)
TOCSY	<i>Total correlation spectroscopy</i> (Espectroscopia de correlação total)
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
VEGF	<i>Vascular endothelium growth fator</i> (Fator de crescimento de endotélio vascular)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estruturas anatômicas do joelho	2
Figura 2	Representação da camada íntima formada pelos sinoviócitos tipos A e B	4
Figura 3	Representação esquemática das camadas da cartilagem articular	11
Figura 4	Fisiopatologia da osteoartrite do joelho	18
Figura 5	Comparação histológica da cartilagem articular do joelho saudável e com e osteoartrite.	19
Figura 6	Eventos celulares decorrentes do estresse oxidativo.	22
Figura 7	Osteoartrite e síndrome metabólica	24
Figura 8	Fenótipo do condrócito em um ambiente pró-inflamatório.	26
Figura 9	Comparação entre um joelho normal e um joelho com artrite reumatoide	30
Figura 10	Esquema das etapas de uma pesquisa envolvendo a análise metabolômica	34
Figura 11	Ilustração simplificada de um espectrômetro de RNM	35
Figura 12	Descrição da classificação da osteoartrite do joelho proposta por Ahlbäck.	45
Figura 13	Esquema do processamento das amostras	47
Figura 14	Esquema com fotografias dos equipamentos utilizados.	48
Figura 15	Discriminação dos pacientes com OA e AR pelo perfil metabólico	53
Figura 16	Discriminação dos pacientes de acordo com a gravidade da osteoartrite	54
Figura 17	Discriminação dos pacientes de acordo com a idade	55
Figura 18	Discriminação dos pacientes por sexo	56

Figura 19	Discriminação dos pacientes de acordo com o índice de massa corporal	57
Figura 20	Discriminação dos pacientes de acordo com a glicemia de jejum	58
Figura 21	Discriminação dos pacientes pelo diagnóstico de hipertensão arterial	59
Figura 22	Discriminação dos pacientes pelo diagnóstico de <i>diabetes mellitus</i>	60
Figura 23	Discriminação dos pacientes pelo diagnóstico de dislipidemia	61
Figura 24	Discriminação dos pacientes pela presença de cardiopatia	62
Figura 25	Discriminação dos pacientes pela presença de doença renal crônica	63

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Principais pesquisas envolvendo análise do líquido sinovial humano na OA e na AR utilizando metabolômica	38-40
Tabela 1	Dados demográficos dos pacientes incluídos no estudo	52

1 INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide (AR) e a osteoartrite (OA) do joelho são as duas principais formas de artrite, afetando, respectivamente, ao redor de 20 e de 260 milhões de pessoas no mundo (JAMES et al., 2018). Nas últimas décadas, o tratamento da AR sofreu uma revolução, principalmente com o diagnóstico precoce e a rápida instauração terapêutica (SMOLEN et al., 2018), ao passo que na OA, apesar da evolução na compreensão na doença, ainda não existem drogas modificadoras do curso da doença clinicamente validadas (GRÄSSEL & MUSCHTER, 2020).

A metabolômica é uma ferramenta promissora para entender o contexto metabólico do ambiente articular, auxiliando na busca por um diagnóstico precoce ou por novas terapias (GUMA et al., 2016; ZHAI et al., 2018). Nesta introdução será, inicialmente, enfatizado a biologia dos tecidos mais envolvidos na fisiopatologia da OA e da AR. A seguir, serão discutidos aspectos clínicos e metabólicos, para a compreensão do metabolismo sinovial nestes distúrbios. O final desta introdução abordará a análise metabolômica e as principais pesquisas no tema.

1.1 Biologia articular

A articulação sinovial é composta por uma cavidade formada pela descontinuidade do esqueleto, constituída por tecidos especializados e pelo líquido sinovial (Figura 1), possibilitando movimentos controlados, mediante o deslizamento ósseo em superfícies de baixo atrito (KHAN et al, 2007). No joelho, diferentes estruturas compõem este complexo sistema, dentre elas: a cartilagem hialina, o osso subcondral, a cápsula articular, as bursas, os coxins

gordurosos periarticulares, os tendões, a membrana sinovial, o líquido sinovial, os ligamentos e os meniscos.

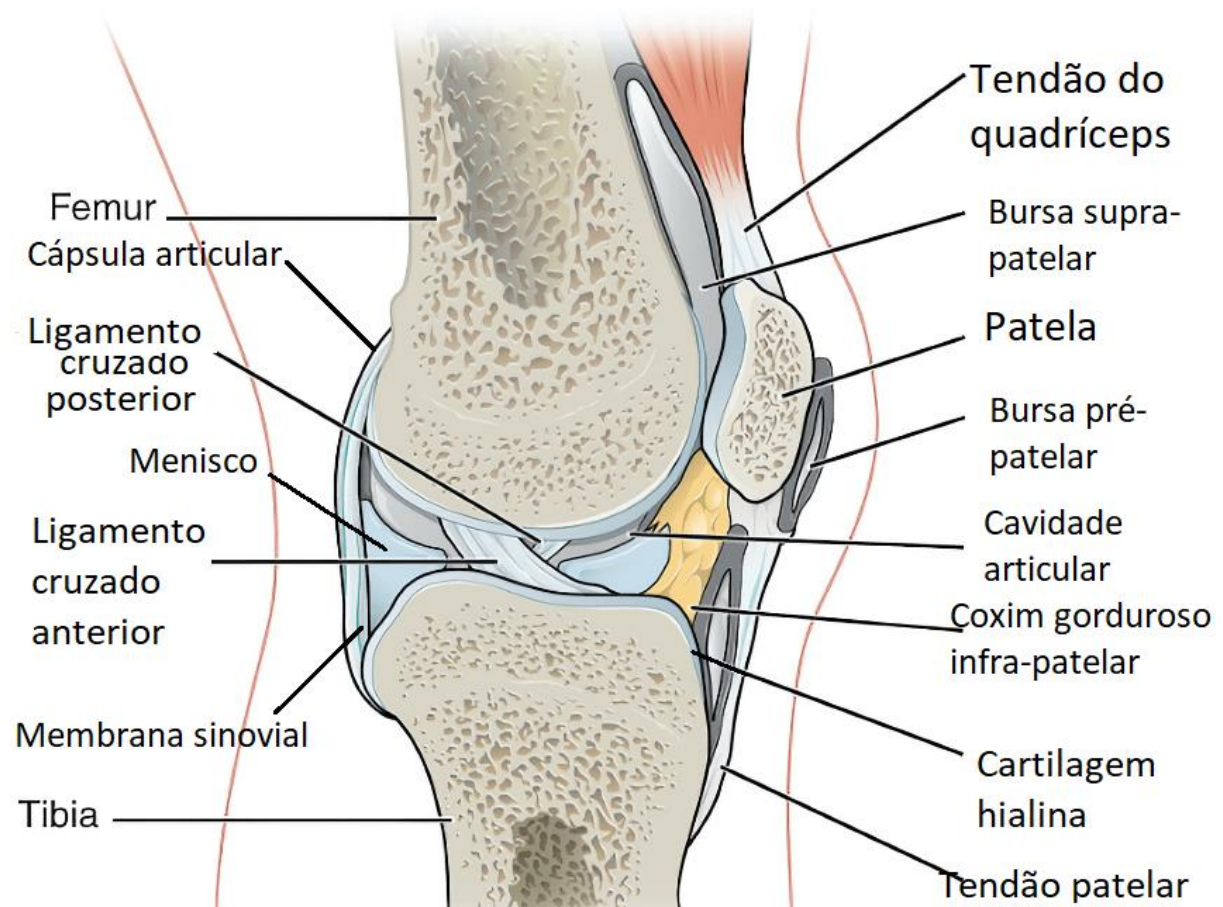


Figura 1. Estruturas anatômicas do joelho. A figura ilustra as diversas estruturas anatômicas encontradas na articulação de um joelho saudável, como ossos, ligamentos, meniscos, cápsula articular, membrana sinovial, bursas e gordura periarticular. Figura adaptada do site <https://geekymedics.com/knee-joint/>, após coleta no dia 13/09/2021.

A camada mais externa da articulação, que a envolve e a protege, é a cápsula articular. Ela é formada por tecido conjuntivo fibroso denso, que adere firmemente ao periósteo das extremidades ósseas envolvidas, limitando movimentos intempestivos. De acordo com a demanda mecânica à que está sujeita, apresenta áreas de maior espessura. Algumas zonas de espessamento podem formar ligamentos capsulares, além de poder incorporar tendões (RALPHS & BENJAMIN, 1994)

Os ligamentos são estruturas cuja função estabilizadora previne movimentos não fisiológicos, protegendo a articulação contra possíveis danos mecânicos. São constituídos por

fibras de colágeno, compactadas em orientação paralela, produzidas por fibroblastos (WOO et al., 2006). Já os meniscos são estruturas fibrocartilaginosas com formato de cunha em crescente, os quais aumentam a congruência entre os côndilos femorais, arredondados, e os planaltos tibiais, com relevo mais plano. Apresentam função de absorção de carga, de estabilização da translação tibial anterior e de guia nos movimentos rotacionais (FOX et al., 2012).

1.1.1 Membrana sinovial

Revestindo internamente a articulação existe a membrana sinovial (ou sinóvia), que filtra o plasma capilar e secreta moléculas importantes, formando o líquido sinovial. A membrana sinovial é dividida em camada íntima e subíntima (Figura 1). A íntima é a porção mais interna, que está em contato direto com o líquido sinovial, sendo formada por poucos estratos de células sinoviais. Nota-se que entre estas células e o líquido sinovial não há separação por uma membrana basal (BARLAND et al., 1962).

Os sinoviócitos são as células que constituem a camada íntima. Estas apresentam espaços intercelulares, proporcionando um contato direto entre a cavidade articular e a matriz extracelular sinovial. Desta forma, esta camada possibilita a interação entre o conteúdo vascular, linfático e sinovial. O trajeto do líquido sinovial proveniente dos capilares para a cavidade articular, ou retornando da cavidade para os vasos linfáticos subsinoviais, atravessa esses *gaps* intercelulares da íntima. Entre esses espaços existe uma matriz extracelular formada principalmente por fibras de colágeno (tipos I, III, V e VI), por ácido hialurônico e por proteoglicano. A concentração destas moléculas modifica a pressão coloidal osmótica, alterando a filtração e a drenagem dos solutos presentes no líquido sinovial (LEVICK e MCDONALD, 1995).

Duas células principais compõem a camada íntima da membrana sinovial, os sinoviócitos tipo A e tipo B, apresentando papel fundamental na formação e regulação do

líquido sinovial (Figura 2). Os sinoviócitos A são células derivadas de macrófagos, com a função de combater germes invasores, ou fagocitar eventuais debris, decorrentes de apoptose celular ou de lesões intra-articulares (IWANAGA et al., 2000). Já o sinoviócito B assemelha-se a um fibroblasto e é responsável por secretar moléculas importantes para o líquido sinovial, como o ácido hialurônico e a lubricinina, além de sintetizar os principais componentes da matriz extracelular da íntima (SMITH, 2011).

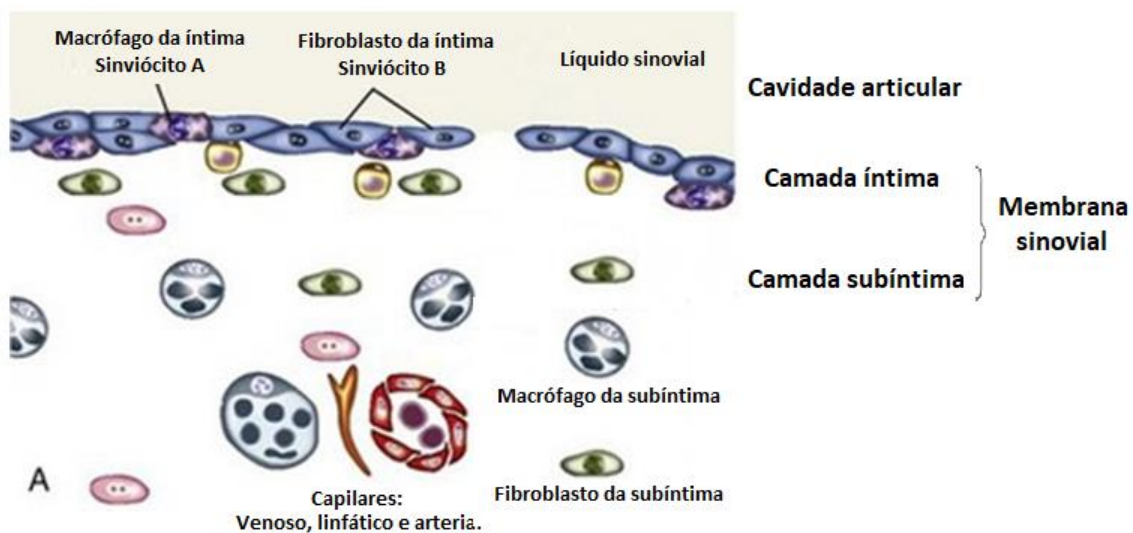


Figura 2. Representação das camadas da membrana sinovial. A figura ilustra a camada íntima, formada por estratos de sinviócitos A e B, sem uma membrana basal delimitando a íntima da cavidade articular. Mais externamente (representada mais abaixo), a camada subíntima é preenchida por matriz extracelular, capilares, fibroblastos e macrófagos. A figura demonstra a presença de espaço intercelular na camada íntima, proporcionando contato direto entre a cavidade articular e a matriz sinovial (Adaptado de EDWARDS, 2000).

Assim como os demais macrófagos, os sinoviócitos A apresentam a propriedade de modular o seu comportamento, de acordo com o meio ao redor, contribuindo para formar um ambiente hostil a agressores, ou um meio propício para a regeneração tecidual. Desta forma, são descritos dois tipos de fenótipos: inflamatório ou anti-inflamatório. O fenótipo inflamatório, tipo M1, é estimulado por um ambiente rico em interferon-gama ($\text{INF-}\gamma$), fator de necrose tumoral alfa ($\text{FNT-}\alpha$) ou lipopolissacarídeo (LPS) e induz a secreção do $\text{FNT-}\alpha$ e de algumas interleucinas (IL), dos tipos IL-1 β , IL-6, IL-12 e IL-23. Nestas circunstâncias, apresenta atividade citotóxica e antimicrobiana, dependendo da glicólise para suas demandas metabólicas (SHAPOURI-MOGHADDAM et al., 2018).

Por outro lado, quando expostos a um meio diferente, sob a influência de outras interleucinas, como a IL-10 e a IL-4, os sinoviócitos A passam a manifestar um fenótipo anti-inflamatório, conhecido como M2. Neste contexto, expressam um fenótipo regenerativo, atuando no reparo (autofagia) dos tecidos sinoviais e utilizando a fosforilação oxidativa para finalidades energéticas (MURRAY, 2017).

Os sinoviócitos B, ou fibroblastos sinoviais, são as células mais prevalentes na membrana sinovial normal, constituindo por volta de 75 a 80% dos sinoviócitos (BUSTAMANTE et al., 2017). São células de origem mesenquimal responsáveis pela síntese e pela manutenção da matriz extracelular sinovial, expressando elementos da matriz e do líquido sinovial (colágeno IV e V, fibronectina, lubricinina e ácido hialurônico), além de metaloproteinases, que degradam a matriz (NYGAARD & FIRESTEIN, 2020). Além disso, a membrana e o líquido sinovial apresentam células tronco mesenquimais, responsáveis pela manutenção e regeneração dos tecidos articulares. Acredita-se que estas células, com características fibroblastóides, sejam uma subpopulação indiferenciada dos fibroblastos sinoviais (DE BARI, 2015).

Apesar da membrana sinovial ser constituída por um tecido conjuntivo frouxo, os sinoviócitos B expressam moléculas que conferem adesão celular, dentre elas a caderina-11. Esta molécula é importante na manutenção da arquitetura tecidual da íntima, uma vez que esta camada é um conglomerado de células sinoviais (VALENCIA et al., 2004). Sua função de adesão parece ainda mais relevante quando estas células são expostas a um ambiente inflamatório. Particularmente na artrite reumatoide, é bem estabelecido o papel central dos sinoviócitos B na patogênese da doença, contribuindo para a formação do *pannus*, um tecido hiperplásico e hipertrofiado (derivado da membrana sinovial) que invade a cartilagem e o osso subcondral adjacente (BUSTAMANTE et al., 2017). Camundongos com nocaute (*knock out*)

do gene da caderina-11 apresentam uma resposta inflamatória sinovial desorganizada, reduzindo a capacidade de invasão e de formação do *pannus* (LEE et al., 2007).

A subíntima é a camada localizada externamente à íntima, formada por um tecido conjuntivo rico em capilares (vasculares, linfáticos, nervosos), em fibroblastos e em células imunológicas. Estes elementos estão distribuídos em uma matriz extracelular conjuntiva, formada principalmente por colágeno I. Esta rede microvascular apresenta capilares fenestrados, os quais permitem a passagem de água e de pequenos solutos para formar o líquido sinovial. Em condições fisiológicas, o líquido sinovial tem aspecto translúcido e apresenta poucas células inflamatórias; durante processos inflamatórios, entretanto, pode ocorrer a infiltração de células inflamatórias e o aumento de macromoléculas, tornando o aspecto turvo (PASCUAL, 2005).

1.1.2 Líquido sinovial

O líquido sinovial (LS) é um fluido viscoso, contido nas cavidades articulares, que atua principalmente na absorção de impacto e na lubrificação dos tecidos articulares. Além disso, disponibiliza nutrientes e serve como via para drenagem de detritos celulares, ações fundamentais para homeostase de alguns tecidos pobremente vascularizados, como a cartilagem hialina e os meniscos. O líquido sinovial é, basicamente, formado a partir da filtração do plasma, nos capilares sinoviais, somado ao ácido hialurônico, à lubricina e aos fosfolipídeos tensoativos, secretados, principalmente, pelos fibroblastos sinoviais (TAMER, 2013).

Além das propriedades físicas, de proteção mecânica, conferidas por estas moléculas secretadas, atribui-se a elas algumas funções na modulação inflamatória (ALTMAN et al., 2019). Com o desenvolvimento de condições articulares, como a osteoartrite, a concentração destas substâncias pode estar alterada e, em alguns indivíduos acometidos, estas

macromoléculas podem estar significativamente reduzidas, indicando uma fragilidade mecânica e uma suscetibilidade à progressão da doença (LUDWIG et al., 2012).

Outros componentes do líquido sinovial, além da água, são os eletrólitos, a glicose, as citocinas, as proteínas plasmáticas e diversos outros metabólitos. A concentração dos solutos plasmáticos no líquido articular depende de alguns fatores como o fluxo sanguíneo local, a concentração plasmática, o tamanho e a carga da molécula, a permeabilidade capilar às macromoléculas, a drenagem linfática e a degradação local (GOLDRING & GOLDRING, 2013). Eletrólitos e outros solutos leves apresentam concentração sinovial similar a encontrada no plasma. Algumas proteínas menores, como a albumina, alcançam por volta de 45% da concentração plasmática, enquanto moléculas maiores, como o fibrinogênio, praticamente não são encontradas no líquido sinovial (HUI et al., 2012).

A fisiologia da formação do líquido sinovial é compreendida a partir do conceito de fluxo transcapilar. A teoria clássica de fluxo transcapilar, proposta por Starling ainda no século XIX, postulava que a água e os pequenos solutos eram transportados, por diferenças de pressão hidrostática e coloidal osmótica entre o ambiente intravascular e intersticial, através de pequenos poros existentes entre as células endoteliais dos capilares, os quais bloqueavam o transporte de macromoléculas (STARLING, 1896). Mais tarde, definiu-se que a modulação do transporte de macromoléculas e do fluxo transcapilar é regulado pelo glicocálix, uma rede de glicosaminoglicanos conectados, presentes na membrana das células endoteliais, revestindo a superfície luminal dos capilares (LEVICK e MICHAEL, 2010).

Este modelo de transporte transcapilar é um pouco diferente nos tecidos com capilares fenestrados, como na membrana sinovial (LEVICK, 1994). A pressão coloidal osmótica, junto às fenestrações dos capilares, é menor em relação ao restante da matriz intersticial, devido tanto à diluição provocada pela filtração, como também pela secreção do ácido hialurônico na matriz intersticial pelos sinviócitos, o que estimula o fluxo em direção à cavidade.

O esvaziamento de fluídos e de moléculas da cavidade articular ocorre nos vasos linfáticos terminais, que se encontram na borda subsinovial e dependem principalmente da pressão hidrostática intra-articular (PIA). A PIA é influenciada pelo volume de líquido presente na cavidade, pela posição (decúbito ou ereta) e pelo movimento. Durante o movimento de flexão, ativa ou passiva, de um joelho saudável, ocorre a elevação da PIA, promovendo a drenagem do LS. Durante o exercício, atividade que promove o aumento da pressão intra-articular, o efeito coloidal osmótico do ácido hialurônico é responsável pela manutenção do volume de líquido intra-articular (LEVICK e MCDONALD, 1995).

Uma vez que a drenagem do líquido sinovial para os linfáticos depende principalmente da diferença de pressão hidrostática, postula-se que, em condições fisiológicas, não há grande diferença na drenagem de moléculas pequenas e grandes. Contudo, em condições como a osteoartrite, por exemplo, ocorre inicialmente um aumento nos capilares linfáticos, mas uma diminuição nos vasos linfáticos maduros, reduzindo a drenagem de macromoléculas e da drenagem global no sentido dos linfonodos ilíacos (SHI et al., 2014).

1.1.3 Cartilagem hialina

A cartilagem articular hialina é um tipo de tecido conjuntivo cartilaginoso especializado, que reveste as extremidades ósseas nas articulações. Sua composição molecular forma uma superfície complacente, lisa e deslizante, capaz de absorver cargas e de possibilitar o deslizamento harmônico durante a mecânica articular (KATTA et al., 2007).

A cartilagem hialina adulta é formada por apenas um tipo celular, o condrócito, e pela matriz extracelular (MEC). Esta é composta principalmente por água, colágeno tipo II, agrecan e ácido hialurônico. Ela é sintetizada e mantida pelos condrócitos, situado nas lacunas, dispostos como ilhas circundadas por MEC. Os condrócitos compõem apenas 1 a 5% do volume

da cartilagem hialina, mantendo intensa conexão com a matriz, regulando seu conteúdo e dependendo da difusão de nutrientes mergulhados neste meio (SCHENK et al., 1986).

O condrócito é o único tipo de célula especializada do tecido e mantém a homeostase da cartilagem hialina mediante o equilíbrio entre a atividade anabólica e catabólica. Em condições fisiológicas, a atividade mitótica dos condrócitos é praticamente inexistente e a manutenção da matriz advém de uma baixíssima taxa de renovação do colágeno, mantendo apenas remodelamento do proteoglicano, em resposta aos estímulos mecânicos. A disponibilidade de oxigênio, de nutrientes, o estímulo mecânico ou a presença de citocinas inflamatórias pode alterar esse comportamento latente (MARTEL-PELLETIER et al., 2016). A síntese dos elementos da matriz extracelular é ativada pelos fatores de transcrição SOX-9 (do inglês, *SRY-Box transcription factor 9*), SOX-6 e SOX-5, que promovem a regulação positiva dos genes *Col2A1* e *Agc1*, para a síntese do colágeno II e do aggrecan, respectivamente (IKEDA et al., 2004).

A MEC é um ambiente hidratado, no qual a água compõe mais de 70% do peso líquido da cartilagem hialina. Uma vez que a cartilagem articular é um tecido avascular, a água é fundamental para que o fluxo de oxigênio, íons, citocinas, fatores de crescimento e outras moléculas alcancem os condrócitos. Além disso, a água desempenha importante papel mecânico, ao tornar a MEC um gel viscoelástico complacente (LEES & PARTINGTON, 2016).

O colágeno é a proteína estrutural com maior relevância na resistência às cargas mecânicas, e é responsável por 2/3 do peso seco da cartilagem articular (EYRE, 2004). O colágeno tipo II é o tipo mais encontrado (por volta de 80 e 85%), formando, associado aos colágenos IX e XI, um heteropolímero. Outras moléculas do grupo colágeno também estão presentes em menor quantidade, como os tipos III, VI, XIII e XIV. O colágeno X é particularmente importante no processo de ossificação endocondral e na patogênese da

osteoartrite. Estas proteínas conectadas formam uma rede fibrilar estrutural, que, de acordo com sua disposição no tecido, pode promover resistência à formação de fissuras na camada superficial, à tensão nas zonas intermediárias, e realizar a ancoragem da cartilagem hialina na zona calcificada (SOPHIA FOX et al., 2009).

Além do colágeno, o conteúdo de proteoglicano é fundamental na biomecânica da cartilagem articular, atuando como uma mola elástica na absorção de cargas compressivas (HARDINGHAM e FOSANG, 1992). O aggrecan é o proteoglicano mais importante, formado por um complexo proteico central e inúmeras cadeias de glicosaminoglicanas (GAG) conectadas. As GAG, que se ligam nos dois lados do eixo da proteína central, são polissacarídeos sulfatados polares com cargas negativas, que se repelem entre si e atraem a água, tornando o meio um gel hidrofílico (KIANI et al., 2002). O ácido hialurônico é um GAG não sulfatado importante em diversos tecidos do organismo, o qual, na cartilagem, conecta o aggrecan à rede fibrilar de colágeno, além de se ligar aos condrócitos, através dos receptores CD44 (KNUDSON, 2004).

Como demonstra a Figura 3, a densidade celular, o conteúdo da MEC e a morfologia dos condrócitos caracterizam quatro zonas histológicas verticais na cartilagem articular: superficial, intermediária, profunda e calcificada (PEARLE et al., 2005). Na zona superficial os condrócitos estão presentes em maior densidade, apresentam formato alongado, maior atividade metabólica e um provável potencial regenerativo (DOWTHWAITE et al., 2004). Os condrócitos da zona superficial também são responsáveis pela secreção da lubricinina, uma glicoproteína que confere viscosidade e lubrifica a superfície articular. Nesta camada mais fina (entre 10 a 20% da espessura) as fibras de colágeno se dispõem paralelas à superfície articular, promovendo resistência à tensão e a potenciais fissuras que possam violar a cartilagem (PEARLE et al., 2005).

Logo abaixo da zona superficial fica a zona média, que representa entre 40 e 60% da espessura da cartilagem articular. Nesta região o condrócito vai se tornando metabolicamente menos ativo, com formato mais arredondado e em menor densidade, ocupando as lacunas circundadas pela matriz (SOPHIA FOX et al., 2009). Nesta zona as fibras de colágeno são mais espessas e apresentam distribuição irregular, enquanto há um aumento na proporção dos proteoglicanos.

A seguir, na zona profunda, que constitui por volta de 30% da espessura da cartilagem hialina, os condrócitos formam colunas paralelas à orientação das fibras colágenas e perpendiculares à superfície articular. Na base da cartilagem está a zona calcificada, na qual as fibras perpendiculares de colágeno, provenientes da camada profunda, ancoram-se na matriz calcificada (LEES & PARTINGTON, 2016). A transição entre a cartilagem calcificada e não calcificada é delimitada pela barreira *tidemark* (MILZ & PUTZ, 1994).

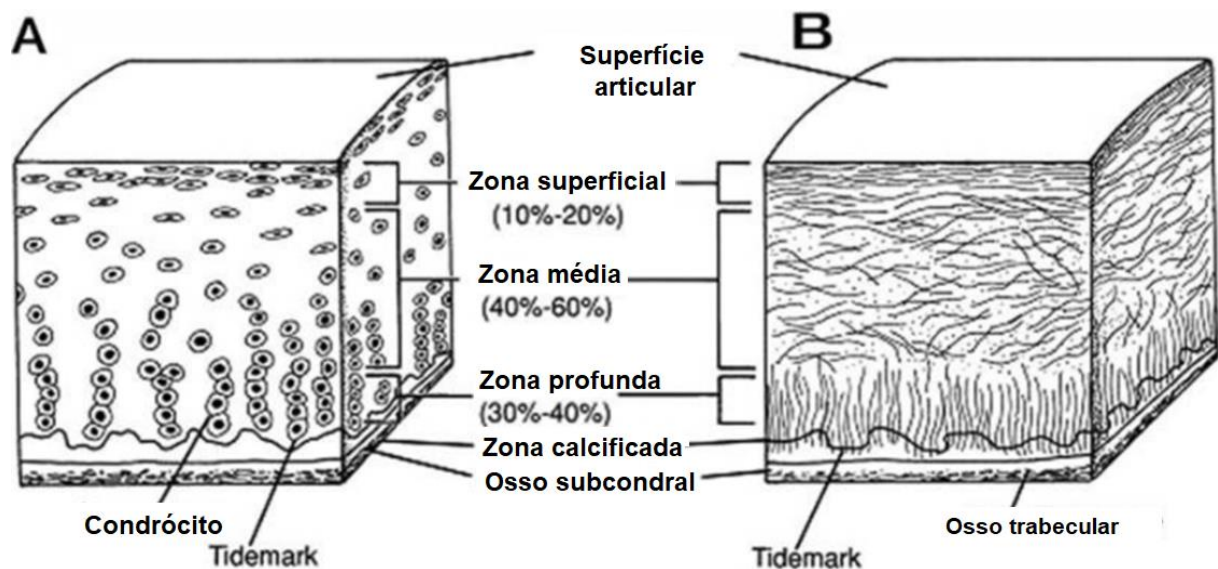


Figura 3. Representação esquemática das camadas da cartilagem articular. (A) Ilustração representativa da disposição dos condrócitos e a (B) orientação das fibras de colágeno nas quatro zonas: superficial, média, profunda e calcificada. Adaptada de BUCKWALTER et al., 1994.

Imediatamente abaixo da cartilagem calcificada está a placa óssea subcondral, similar ao osso cortical. Essa área de tecido ósseo mais compacto se mistura logo abaixo com uma rede

de osso trabecular, a qual é mais porosa e metabolicamente mais ativa. A orientação desta rede trabecular varia de acordo com as cargas a que é submetida, conforme a lei de Wolff (FROST, 2001). Esta região de transição osteocartilaginosa é extremamente adaptada e fundamental para a absorção e para a transmissão de cargas (GOLDRING & GOLDRING, 2016).

No passado, estipulava-se que esta barreira osteocondral fosse impermeável. Atualmente, no entanto, considera-se a presença de alguns canais conectando a placa subcondral à zona calcificada, por onde penetram alguns vasos (LORIES & LUYTEN, 2011). Durante a evolução da OA ocorre um aumento nas conexões entre estas camadas, em um processo de calcificação da MEC, com algumas similaridades a ossificação endocondral (DREIER, 2010).

Como na ossificação endocondral, a hipertrofia celular e a ossificação da MEC também são marcos histológicos do desenvolvimento da OA. Os condrócitos hipertróficos caracterizam-se pela expressão de colágeno X, MMP-13 (metaloproteinase 13), VEGF (fator de crescimento endotelial vascular, do inglês *vascular endothelial growth factor*) e RUNX-2 (Fator de transcrição relacionado a Runt 2, do inglês *Runt-related transcription factor 2*). Uma das diferenças nestes dois processos é que a ossificação patológica da matriz cartilaginosa, na osteoartrite, é mais dependente do HIF-2 α (fator induzível por hipóxia 2 α , do inglês *Hypoxia-inducible factor 2*) do que a ossificação endocondral fisiológica (SAITO et al., 2010). Os condrócitos hipertróficos ainda reduzem a expressão do SOX9, do colágeno II, do colágeno IX, do colágeno XI e do aggrecan, fundamentais para a manutenção da MEC saudável (RIM et al., 2020).

As cargas mecânicas também atuam na modulação da homeostase da MEC. O condrócito é cercado pela matriz pericelular, que absorve as cargas e as transmite à superfície da célula, alterando o fenótipo celular (ZHAO et al., 2020). A matriz pericelular apresenta

conteúdo distinto do restante da MEC, sendo identificada pela presença do colágeno VI, além de maior concentração de colágeno IX, de proteoglicanos e de ácido hialurônico (WILUSZ et al., 2014). A presença desta matriz peculiar impede o contato anormal dos condrócitos com o colágeno II desnudo, ou com outros componentes da MEC, ajudando a manter o estado diferenciado e de baixa atividade sintética destas células (GOLDRING & GOLDRING, 2016).

A deformação mecânica da matriz pericelular sensibiliza receptores na membrana do condrócito, como canais de íons cálcio, integrinas e cílios primários (prolongamentos do citoesqueleto), que transformam estímulos mecânicos em sinalizadores bioquímicos, modulando a transcrição celular (BLANEY DAVIDSON et al., 2007). Desta forma, as cargas mecânicas em nível ótimo contribuem para manutenção da cartilagem hialina saudável, proliferando em zonas de maior demanda, enquanto cargas excessivas, ou mesmo a ausência de estímulo mecânico, promovem a degradação articular. Um estudo *in vitro* demonstrou que danos estáticos compressivos acarretam a depleção do proteoglicano e do colágeno II, além de reduzir a atividade anabólica (GOLDRING e OTERO, 2011). Já o estímulo mecânico dinâmico, com cargas cíclicas não traumáticas, mimetizando a marcha normal, parece ser benéfico a cartilagem, aumentando a síntese da MEC e reduzindo o estímulo catabólico da IL-1b (GOLDRING e OTERO, 2011; TORZILLI et al., 2010).

1.2 Osteoartrite

A osteoartrite (OA) do joelho é uma doença crônica degenerativa, caracterizada principalmente pela destruição da cartilagem articular hialina, pela inflamação da membrana sinovial e pelo espessamento do osso subcondral (GOLDRING e GOLDRING, 2007). Além disso, ocorre degeneração dos meniscos, dos ligamentos, da cápsula articular e inflamação da gordura periarticular (POOLE, 2012). Assim, a osteoartrite pode ser entendida como uma doença que acomete a articulação como um órgão (LOESER et al., 2012). Clinicamente, os

indivíduos costumam apresentar dor, redução da amplitude de movimento, edema e prejuízo funcional, podendo evoluir para deformidade angular e para incapacidade para deambulação (LOESER et al., 2012 e ZHU et al., 2013).

Esta condição é o distúrbio articular mais comum nos Estados Unidos (MURRAY et al., 2013), sendo a principal causa de dor crônica e de incapacidade física no adulto (HUNTER & BIERMA-ZEINSTRA, 2019). A OA joelho afeta cerca de 250 milhões de pessoas em todo o mundo, com aproximadamente 27 milhões de americanos e 39 milhões de cidadãos da União Europeia, acometendo cerca de 35% dos indivíduos com idade superior a 65 anos (HUANG et al., 2017). Em relação à prevalência nacional, estima-se que 40 milhões de brasileiros sejam afetados por OA em alguma articulação, dos quais ao redor de 18 milhões apresentam OA do joelho (COIMBRA et al., 2019).

O diagnóstico da OA ainda é baseado no quadro clínico (ALTMAN et al., 1986), e a radiografia é a principal ferramenta utilizada no acompanhamento. Classicamente, os achados radiográficos são: redução do espaço articular, esclerose subcondral, presença de osteófitos, de cistos e até deformidades (KELLGREN & LAWRENCE, 1957). De acordo com a presença e a magnitude destes achados, pode-se classificar radiograficamente a OA em diferentes estágios (PETERSSON et al., 1997). A classificação proposta por Ahlbäck foca principalmente na redução do espaço articular medial durante a sustentação de carga (AHLBÄCK & RYDBERG, 1980). Mais tarde, Keyes e colaboradores complementaram esta classificação, com a avaliação da radiografia lateral, demonstrando a degeneração posterior do planalto tibial nos casos mais avançados (KEYES et al., 1992).

Junto com a descrição de Kellgren e Lawrence, a classificação de Ahlbäck apresenta a melhor correlação com a perda condral observada na cirurgia de artroplastia total do joelho (ATJ) (KEENAN et al., 2020). Porém, na OA, a radiografia costuma ser mais útil para a

visualização de modificações tardias (FAVERO et al., 2015). Além do mais, a correlação entre as alterações radiográficas e os sintomas é modesta (NEOGI, 2013).

O tratamento da OA consiste em medidas farmacológicas, não farmacológicas e intervenções cirúrgicas, de acordo com o estágio da doença. A estratégia farmacológica inclui o uso de diversas classes de medicamentos, como analgésicos, anti-inflamatórios (hormonais e não hormonais), condroproterores e antidepressivos. Estas opções auxiliam no combate aos sintomas, mas não modificam o curso da doença. Além do que, o uso frequente destes medicamentos aumenta o risco de toxicidade (ARDEN et al., 2021; OO et al., 2018).

Embora haja divergência na literatura em relação ao tratamento medicamentoso, a maioria das recomendações concorda que medidas educativas, reabilitação física e perda de peso auxiliam no controle da OA (ARDEN et al., 2021). O tratamento cirúrgico é reservado para pacientes persistentemente sintomáticos, que não respondem a medidas conservadoras. O tipo de cirurgia proposta depende da idade, da função do joelho, do nível de atividade e do estágio da doença. A cirurgia mais realizada é a ATJ, usualmente indicada para estágios terminais da condição articular, mas existem outras opções para casos selecionados, como a artroplastia unicompartimental, as osteotomias e até a artrodese. Apesar de um procedimento consagrado, a taxa de insatisfação após a ATJ se aproxima de 20% (PRICE et al., 2018).

1.2.1 Fisiopatologia

O conhecimento sobre a patogênese da OA permanece em evolução, englobando fatores genéticos e ambientais (GARSTANG & STITIK, 2006). A hipótese mais aceita na atualidade sugere que uma resposta inflamatória (das células sinoviais e dos condrócitos) inicie após algum insulto ambiental. Este pode ser um evento traumático, a elevação de citocinas inflamatórias ou a liberação de produtos da degradação do tecido cartilaginoso, os DAMPs (padrões moleculares associados a dano, do inglês *damage-associated molecular patterns*). Estas moléculas ativam

os receptores de reconhecimento de padrões, especialmente os receptores tipo Toll (TLRs, do inglês *Toll-like receptors*), nos macrófagos, que passam a expressar um fenótipo inflamatório. Por meio da transcrição do fator nuclear Kappa B (NF-Kb), os macrófagos passam a sintetizar citocinas pró-inflamatórias, como o FNT- α , a IL-1 β e a IL-6 (GOLDRING & OTERO, 2011; LOPES et al., 2017).

Este é um mecanismo fundamental para o reparo dos tecidos e, uma vez que o processo inflamatório inicial é resolvido, os macrófagos retornam ao seu estado fisiológico, reestabelecendo a homeostase (WYNN & VANNELLA, 2016). No entanto, em alguns indivíduos, essas células perpetuam um comportamento agressivo, alterando a homeostase articular em favor de processos catabólicos. Neste cenário, os condrócitos são ativados, modificando seu comportamento metabólico latente (BHATTARAM e CHANDRASEKHARAM, 2017).

O condrócito ativado também passa a sintetizar MMPs (em especial a MMP-13) e aggrecanases, como a ADAMTS (do inglês *disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*), que degradam a matriz ao redor. Além disso, os condrócitos também secretam citocinas pró-inflamatórias, como o FNT- α e a IL-1 β . Estas vias catabólicas são ativadas principalmente por meio do NF-kB e da proteína quinase ativada por mitógeno, acarretando a síntese de mais proteases, da ciclooxigenase 2 (COX-2), de prostaglandinas e da enzima óxido nítrico sintase induzível. De forma concomitante, este cenário inflamatório favorece a ativação dos sinviócitos B, que também participam deste processo, ao secretarem metaloproteinases e desintegrinas, agravando a degradação da MEC (GOLDRING & MARCU, 2009).

Além disso, embora em escala muito menor do que na AR, ocorre a disfunção endotelial, conjuntamente à liberação de quimiocinas, que possibilitam o aumento no número de células inflamatórias na sinóvia (BHATTARAM e CHANDRASEKHARAM, 2017). Na OA, a

infiltração sinovial é principalmente de linfócitos T e de monócitos (SELLAM & BERENBAUM, 2010). O aumento da vascularização local e da infiltração de monócitos, que se diferenciam em macrófagos, promove a elevação de proteases, de espécies reativas de oxigênio e de citocinas (WOODELL-MARY & SOMMERFELD, 2020). Este ambiente favorece o aumento da angiogênese local, a síntese de citocinas inflamatórias e de proteases, retroalimentando e perpetuando a degradação articular (BERENBAUM, 2013). A Figura 4 ilustra a fisiopatologia da OA.

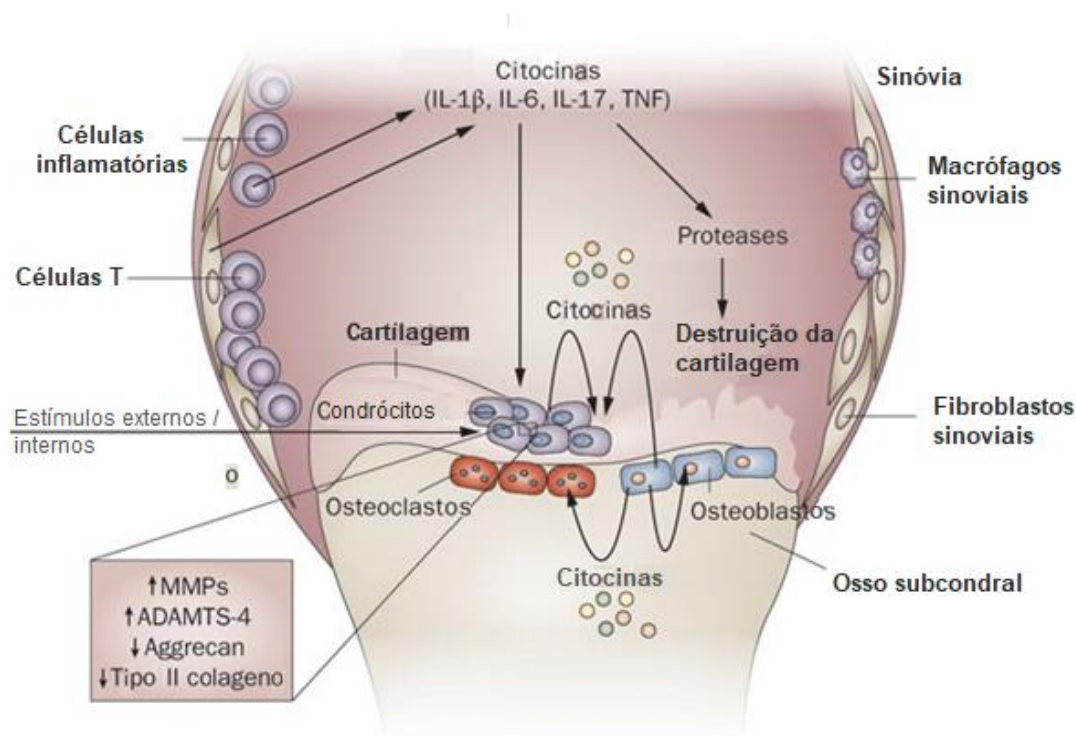


Figura 4. Fisiopatologia da osteoartrite do joelho. Ilustração representando a participação das células residentes da articulação e das células inflamatórias na patogênese da osteoartrite, por meio da liberação de citocinas e de proteases. Os fibroblastos sinoviais e as células T infiltradas na sinóvia liberam citocinas inflamatórias, que estimulam a secreção de proteases, degradando o colágeno e o proteoglicano da matriz extracelular dos tecidos articulares. Este contexto de citocinas pró-inflamatórias e de proteases despertam os condrócitos da camada superficial de seu estado metabólico latente, passando a expressar um estado inflamatório, com redução da síntese dos elementos da matriz (aggrecan e colágeno II) e com aumento da síntese de proteases (MMPs e ADAMTS-4). De forma simultânea, ocorre uma desregulação do remodelamento subcondral, o que, junto com a degradação da cartilagem hialina, prejudica a capacidade biomecânica de absorção de carga do joelho. Adaptado de KAPOOR et al., 2011.

Nas fases iniciais da OA, os condrócitos ativados da camada superficial exibem aumento na atividade sintética, acelerando o turnover da MEC, refletindo uma tentativa de reparação do tecido (LORENZO, 2004). Além disso, ocorre um estímulo à proliferação, formando agrupamentos (*clusters*) celulares na zona superficial (LOESER, 2014). Com a evolução da doença, a MEC vai sendo delaminada, podendo expor áreas de osso subcondral. Essas alterações são acompanhadas pela expansão da zona calcificada, substituindo a matriz não calcificada, e pela duplicação da barreira histológica (*tidemark*) junto da transição osteocondral, como demonstrado na Figura 5. Nesta unidade, vão se formando rachaduras, por onde penetram elementos medulares, propiciando a infiltração vascular (MARTEL-PELLETIER et al., 2016). Além disso, acentua-se o remodelamento ósseo subcondral, promovendo o espessamento cortical, a formação de cistos e de osteófitos (ZHOU et al., 2020).

Os novos canais vasculares formados, que atravessam a barreira osteocondral, também são acompanhados pelo crescimento de tecido nervoso, o que possivelmente contribui para a dor articular nos estágios avançados da doença (MAPP et al., 2012). Ademais, a infiltração vascular proporciona a deposição óssea ao redor dos canais vasculares, e os condrócitos adjacentes sofrem diferenciação hipertrófica, em um processo que remete à ossificação endocondral (MARTEL-PELLETIER et al., 2016).

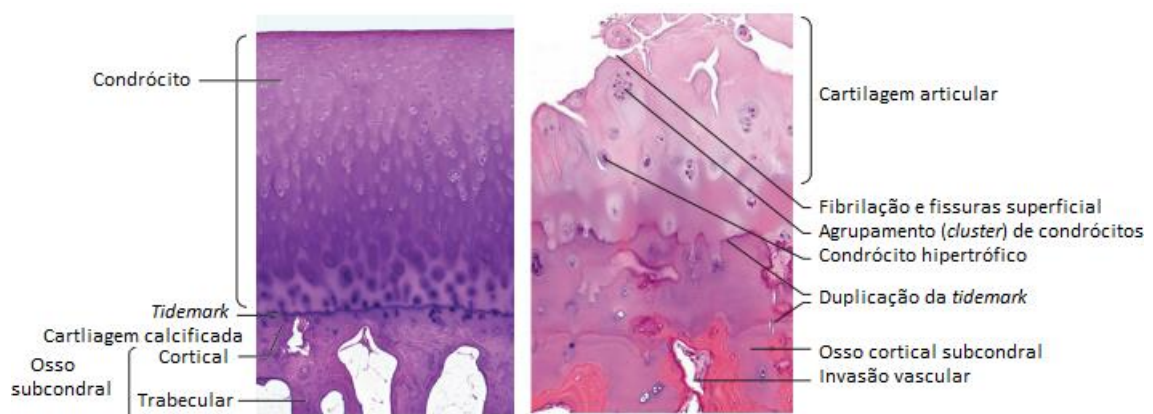


Figura 5. Comparação histológica da cartilagem articular do joelho saudável e com osteoartrite. Imagens histológicas de cortes transversais de uma cartilagem hialina normal (à esquerda) e de uma cartilagem hialina com

osteoartrite avançada (à direita). A cartilagem hialina normal apresenta as zonas bem delimitadas com a superfície íntegra, condrócitos em tamanho e densidade normais, uma espessa área de cartilagem não calcificada e uma linha (*tidemark*) única, separando a cartilagem calcificada da cartilagem não calcificada. Já na osteoartrite avançada observa-se a fragmentação da superfície, a delaminação da cartilagem não calcificada, a redução da densidade de condrócitos, a presença de condrócitos hipertróficos e em aglomerados, a duplicação da *tidemark* e a invasão vascular. Adaptada de MARTEL-PELLETIER et al., 2016.

1.2.2 Osteoartrite e envelhecimento

Dentre os diversos fatores de risco associados ao desenvolvimento da OA, o envelhecimento é um dos mais relevantes (LOESER, 2017). O envelhecimento é caracterizado pela perda progressiva da integridade fisiológica, prejudicando a função e aumentando a suscetibilidade às doenças (LÓPEZ-OTÍN et al., 2013). Durante o envelhecimento da cartilagem articular, ocorrem algumas alterações bioquímicas e biomecânicas, mas de forma distinta do que acontece na OA. A cartilagem hialina de pessoas idosas saudáveis apresenta menor espessura (e aspecto marrom na visualização histológica) em relação à cartilagem de jovens saudáveis. Estas alterações se devem ao acúmulo de produtos finais da glicação avançada (AGE, do inglês *advanced glycation end products*) (VERZIIL et al., 2003). Todavia, a superfície articular mantém-se lisa e intacta (LOESER, 2017). O acúmulo destes AGE parece repercutir no comportamento biomecânico, tornando a cartilagem articular do idoso mais suscetível ao desenvolvimento da OA (VERZIIL et al., 2002).

Além disso, a biomecânica da articulação do idoso também é prejudicada pela redução da proteção conferida pela musculatura esquelética. Com o avançar da idade, a proporção de gordura visceral aumenta e há infiltração gordurosa muscular, provocando perda de força e instabilidade, além da elevação na concentração local de adipocinas (DELMONICO et al., 2009).

1.2.3 Osteoartrite e disfunção mitocondrial

O processo degenerativo articular está vinculado ao desequilíbrio da homeostase em favor da atividade catabólica. Um dos fatores que interferem nesse balanço são as espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*), moléculas instáveis e hiper-reativas, que interagem com as estruturas celulares e extracelulares. Estes elementos são produzidos pelas células residentes dos tecidos, principalmente na mitocôndria, mediante a redução incompleta do O₂ consumido, transformado em superóxido (O₂⁻), em vez de água. O estresse oxidativo manifesta-se, quando a produção das ROS supera a capacidade antioxidativa celular (ZAHAN et al., 2020).

As ROS excedentes provocam danos ao DNA e a outras macromoléculas celulares, prejudicando mecanismos fisiológicos (Figura 6). Além disso, este ambiente de estresse oxidativo pode induzir os condrócitos à senescência e a apoptose (ZAHAN et al., 2020). A senescência é um estado no qual a célula perde a capacidade replicativa, enquanto mantém um fenótipo inflamatório, ao secretar citocinas e proteases (RIM et al., 2020).

A manifestação do estresse oxidativo na OA já foi demonstrada, mediante a redução do antioxidante glutatona na forma reduzida, em comparação com a forma oxidada (CARLO e LOESER, 2003). O aumento do estresse oxidativo altera a resposta anabólica dos condrócitos sob o estímulo de fatores de crescimento, reduzindo a síntese de proteoglicano (LOESER et al., 2014).

O declínio da função mitocondrial está diretamente relacionado com o desenvolvimento da OA. Apesar do tecido cartilaginoso ser avascular, com menor disponibilidade de oxigênio em relação a outros tecidos, a mitocôndria exerce papel importante no metabolismo do condrócito, especialmente nas camadas superficial e média (OEGEMA e THOMPSON, 1986), estimando-se que a fosforilação oxidativa represente mais de 25% da produção de ATP (adenosina trifosfato) (LEE e URBAN, 1997). Os condrócitos dos indivíduos com OA apresentam menor número de mitocôndrias (JOHNSON et al., 2004). Além do que, nesta

doença, a função mitocondrial apresenta menor eficiência energética, devido à redução na atividade dos complexos enzimáticos I, II e III (MANEIRO et al, 2003). Desta forma, ocorre uma redução, ao redor de 50%, na produção de ATP, com aumento compensatório da glicólise (JOHNSON et al., 2004).

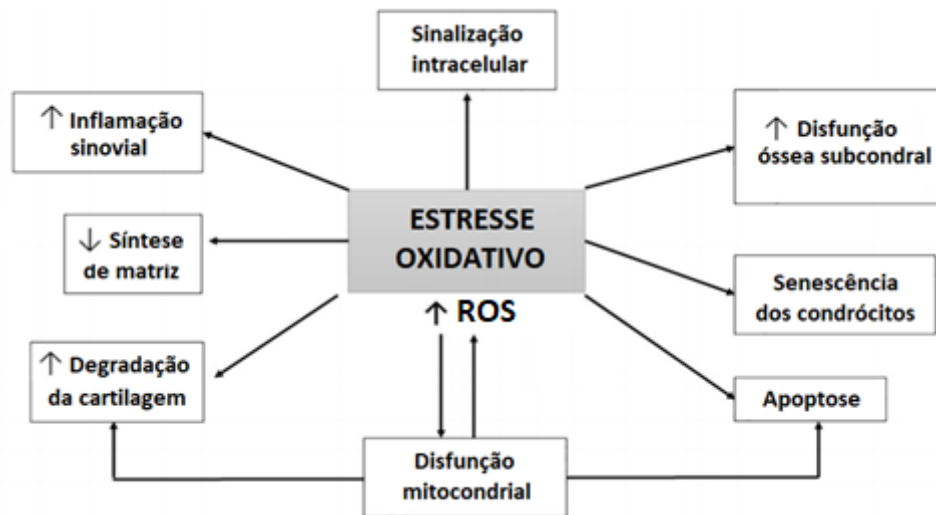


Figura 6. Eventos celulares decorrentes do estresse oxidativo. O estresse oxidativo está associado a um processo de disfunção mitocondrial e atua no condrócito por vias de sinalização, que promovem a inflamação sinovial, a disfunção subcondral, o aumento da atividade catabólica e a redução da atividade anabólica. Além disso o estresse oxidativo induz a senescência celular e a apoptose. Estas vias acarretam a redução do conteúdo de matriz extracelular hialina e a redução da densidade de condrócitos. ROS: espécies reativas de oxigênio, do inglês *reactive oxygen species*. Adaptado de ZAHAN et al., 2020

1.2.4 Fenótipos da osteoartrite

Com a evolução da compreensão sobre a OA, esta não é mais entendida como a simples erosão mecânica da cartilagem articular, mas sim como uma doença complexa, multifatorial, com um importante componente inflamatório (ROBINSON et al., 2016). Um marcador clínico e patológico do grau inflamatório articular é a sinovite. Diferente da inflamação sinovial de caráter autoimune, que ocorre na AR, na OA a sinovite comporta-se como uma inflamação crônica de baixo grau, mediada pela imunidade inata (ORLOWSKY & KRAUS, 2015).

Anteriormente, acreditava-se que a sinovite desenvolvia-se tardiamente em resposta à formação de debris, relacionado ao dano articular cumulativo. Na atualidade, há ampla evidência de que, em alguns pacientes, a inflamação sinovial está presente em todos os estágios

da OA, associada a dor, a severidade e a progressão, inferindo-se que possa ser um dos fatores precursores da doença (ATUKORALA et al., 2016). Apesar de não ser uma condição necessária para o desenvolvimento da OA, a sinovite está claramente envolvida na degradação da cartilagem e na progressão da doença (SELLAM & BEREONBAUM, 2010). Contudo, não são todos os pacientes que desenvolvem quadros de sinovite. Em relação a isto, a propósito, existe uma grande variabilidade entre os indivíduos com OA (AYRAL et al., 2005).

Ainda não é bem entendida esta ampla variabilidade clínica, não somente sobre a sinovite, mas também sobre outros aspectos da doença. De fato, a OA é uma moléstia muito heterogênea, com um vasto espectro de manifestações e de prognósticos (FELSON, 1993). Somado a isso, os efeitos modestos dos diversos tratamentos já empregados clamam por uma melhor elucidação desta condição (BIERMA-ZEINSTRA & VERHAGEN, 2011). Atualmente, alguns autores propõem que a OA não seja considerada uma única doença, mas uma síndrome, com manifestações e até etiologias distintas. Neste sentido, uma questão latente é a classificação desta síndrome em subgrupos, conhecidos como fenótipos, que podem indicar novos caminhos para o aprimoramento nos métodos diagnósticos e terapêuticos (DEVEZA & LOESER, 2018).

Desta forma, algumas pesquisas têm procurado subdividir a OA em alguns fenótipos (DEVEZA et al., 2017; MOBASHERI et al., 2019). Entretanto, há dificuldade nessa classificação em aspectos clínicos, radiológicos, ou metabólicos, porque muitos desses fatores se sobrepõem (BIERMA-ZEINSTRA & MIDDELKOOP, 2017). Atualmente, uma das ferramentas promissoras utilizadas para essa subclassificação em fenótipos é a metabolômica (ZHANG et al., 2014; CARLSON et al., 2019).

1.2.5 Osteoartrite metabólica

Dentre os possíveis fenótipos em discussão, a osteoartrite metabólica é a OA associada à síndrome metabólica (ZHUO et al., 2012). A síndrome metabólica é um conjunto de

perturbações clínicas e metabólicas que aumentam o risco de doença cardiovascular e de mortalidade. Neste contexto de alterações biométricas e laboratoriais participam: a obesidade, a hipertensão arterial, a dislipidemia, a intolerância à glicose e um estado pró-inflamatório (KAUR, 2014). Assim, como ilustrado na Figura 7, postula-se que na OA metabólica ocorra um processo inflamatório crônico de baixo grau, e a manifestação articular é apenas mais uma faceta de uma síndrome sistêmica (VELASQUEZ & KATZ, 2010).

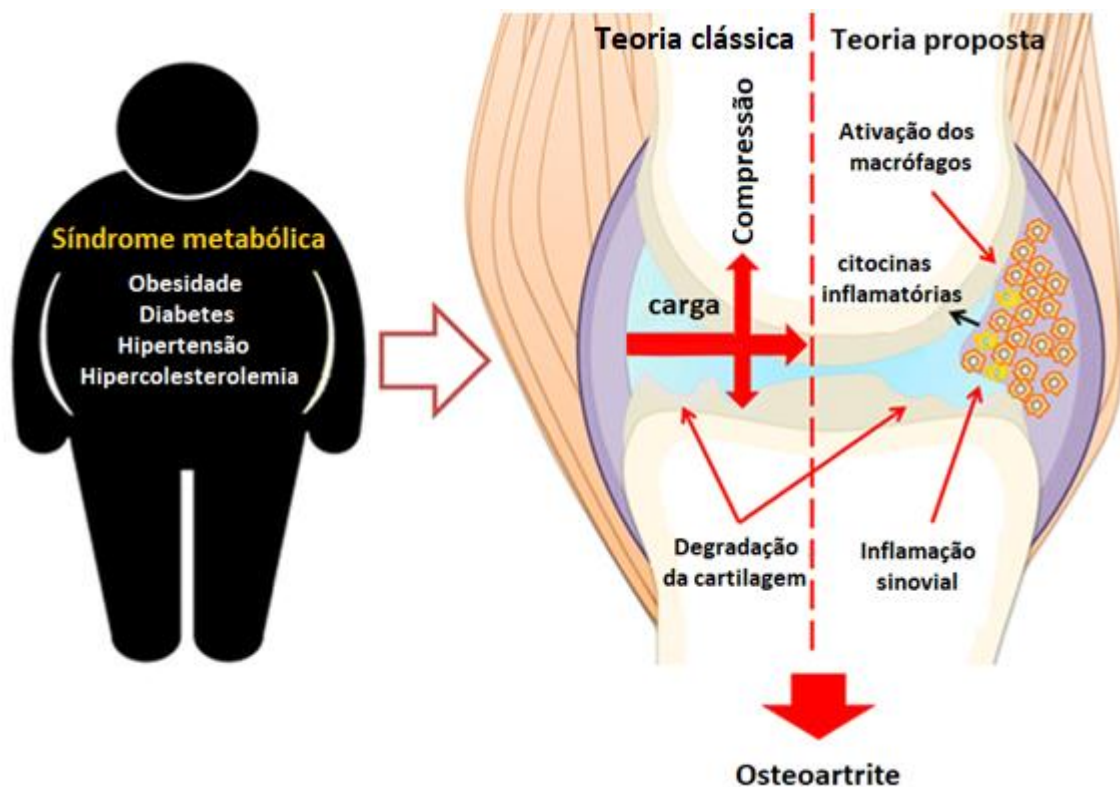


Figura 7. Osteoartrite e síndrome metabólica. A osteoartrite apresentada como uma das manifestações da síndrome metabólica, em um indivíduo obeso. A ilustração articular compara a teoria clássica, no qual a degradação articular era exclusivamente vinculada ao aumento da carga no compartimento, com a teoria proposta, em que se sugere uma resposta inflamatória sinovial ao contexto de síndrome metabólica, como um dos fatores determinantes na degeneração articular. O gatilho do processo de inflamação sinovial é a ativação dos macrófagos sinoviais para um fenótipo inflamatório, respondendo a um distúrbio metabólico sistêmico. Adaptado de SUN et al., 2016.

No passado, a obesidade era considerada um fator de risco para o desenvolvimento da OA nas articulações de carga, como joelho e quadril, simplesmente por aspectos mecânicos. Sabe-se que a obesidade está relacionada à OA do joelho e que aumenta o risco de progressão do dano articular (COOPER et al., 2000). A observação, no entanto, da correlação entre

obesidade e OA em outros sítios, como nas articulações das mãos, despertou a atenção dos pesquisadores para a busca de outros mecanismos subjacentes (YUSUF et al., 2010).

Atribui-se ao tecido adiposo, na atualidade, além da função de estoque energético, um papel endócrino. Este tecido é responsável pela liberação de hormônios e de outros fatores. As adipocinas são um grupo de mediadores solúveis secretados pelas células de gordura, que estão envolvidas na regulação do metabolismo energético, bem como na resposta inflamatória (LAGO et al., 2007). Deste modo, a obesidade parece exercer papel importante na inflamação sistêmica. Além disso, o tecido adiposo local, como a gordura infrapatelar, também pode ser fonte de fatores inflamatórios e catabólicos para a articulação (FAVERO et al., 2017).

Na osteoartrite metabólica, a polarização dos macrófagos sinoviais parece ser um dos gatilhos do processo (DICKSON et al., 2019). Os condrócitos também são diretamente afetados pelo aumento da circulação de moléculas glicosadas, os AGE. Estas moléculas interagem com receptores de AGEs, promovendo o estresse oxidativo e a expressão de mediadores inflamatórios (PEPPA & VLASSARA, 2005). Os ácidos graxos livres também podem estar aumentados na circulação dos pacientes com síndrome metabólica. Em condrócitos humanos, a elevação dos ácidos graxos livres induz a secreção de citocinas pró-inflamatórias e um estado de estresse oxidativo (MEDINA-LUNA et al., 2017). A Figura 8 demonstra inúmeros fatores que ativam o condrócito para um fenótipo pró-inflamatório.

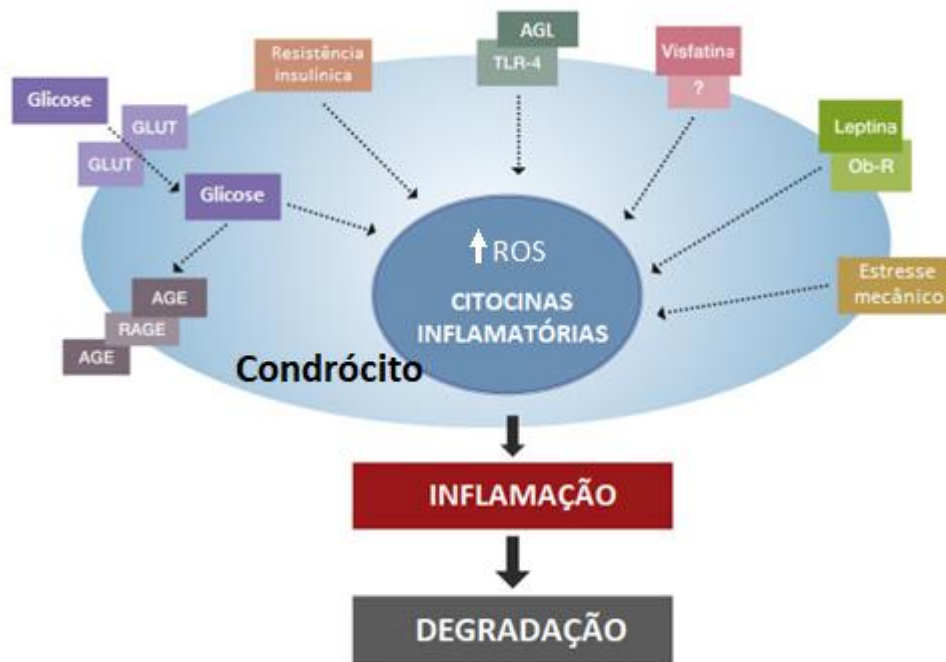


Figura 8. Fenótipo do condrócito em um ambiente pró-inflamatório. Múltiplos fatores podem estar aumentados na circulação de indivíduos com síndrome metabólica, como ácidos graxos livres, leptina, visfatina, glicose e moléculas glicadas. Somado a isto, um cenário de resistência insulínica e de aumento do estresse mecânico (pela obesidade), promovem no condrócito, mediante a ativação de receptores, a expressão de um fenótipo inflamatório, com aumento da expressão de citocinas inflamatórias e de ROS. AGE: produtos finais da glicação avançada (do inglês, *advanced glycation end products*); AGL: ácido graxo livre; GLUT: Transportador de glicose, do inglês *glucose transporter*; Ob-R: receptor de leptina; RAGE: receptor produtos finais da glicação avançada; ROS: espécies reativas de oxigênio, do inglês *reactive oxygen species*; TLR-4: receptor do tipo Toll 4. Adaptado de COURTIES et al., 2015.

1.3 Artrite reumatoide

A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória autoimune sistêmica que pode acometer diversos órgãos, mas manifesta-se sobretudo nas articulações. É uma das doenças inflamatórias crônicas mais prevalentes, afetando por volta de 0,5 a 1% da população, e é duas a três vezes mais frequente em mulheres (TOBON et al., 2010; NGO et al., 2014).

Como outras doenças autoimunes, fatores genéticos e ambientais contribuem para a redução do limiar de tolerância imunológica, desenvolvendo autoanticorpos, os quais induzem uma resposta inflamatória crônica (MCINNES & SCHETT, 2017). Na maioria das vezes, após um período pré-clínico da doença, a membrana sinovial é infiltrada por células inflamatórias,

formando o *pannus*, um tecido proliferativo que age como um tumor, invadindo e destruindo a cartilagem e o osso subcondral (YOU et al., 2018).

Os indivíduos acometidos pela AR costumam desenvolver dor crônica e edema em diversas articulações, usualmente em caráter simétrico, podendo apresentar manifestações extra articulares (ALETAHA et al., 2010). O dano articular acumula-se com o tempo, acarretando sinovite crônica, degradação da cartilagem, erosão óssea e, se não tratada, costuma evoluir para deformidades (KHURANA & BERNEY, 2005). Além disso, os indivíduos acometidos apresentam aumento do risco de mortalidade (WOLFE, 1996).

O diagnóstico é baseado em critérios clínicos e laboratoriais, como a detecção dos autoanticorpos fator reumatoide (FR) e do anticorpo contra peptídeo citrulinizado cíclico (anti-CCP), os mais comumente encontrados nestes doentes, chamados soropositivos (ALETAHA et al., 2010). Uma proporção cada vez maior de indivíduos, entretanto, desenvolvem um quadro de “AR soronegativa”. Estes não apresentam anticorpos conhecidos identificados no soro, apesar de um quadro clínico característico da doença (MYASOEDOVA et al., 2020).

Em relação à predisposição genética, sabe-se que uma história familiar positiva para a doença aumenta em três a cinco vezes o risco de desenvolvê-la (SMOLEN et al., 2016). O principal fator genético apontado é a presença de um grupo de alelos responsável por codificar o epítopo compartilhado. Estes alelos, da sub-região HLA-DR1, codificam uma sequência comum de cinco aminoácidos, na terceira região hiper variável da molécula HLA-DR (GREGERSEN et al., 1987). A presença do epítopo compartilhado confere o principal fator de risco genético para susceptibilidade e para a progressão da doença, nos indivíduos soropositivos para o anticorpo anti-CCP (AREND & FIRESTEIN, 2012).

Nas últimas décadas, a literatura vem ampliando o reconhecimento de outros fatores genéticos associados à doença, a maioria relacionado a mecanismos imunológicos, como: alterações no reconhecimento de autoantígenos pelas células T, estímulo de vias inflamatórias,

enzimas responsáveis por modificações pós-traducionais e vias reguladoras intracelulares. Todos estes mecanismos parecem contribuir para uma redução no limiar de tolerância e início de atividade autoimune (MCINNES & SCHETT, 2017).

1.3.1 Patogênese da AR

Embora a AR seja uma doença autoimune, conhecida pela desregulação do sistema imune adaptativo, a patogênese da doença envolve a interação entre células residentes do tecido (fibroblastos sinoviais), células do sistema imune inato (macrófagos, neutrófilos, células dendríticas) e do sistema imune adaptativo (linfócitos T e B). Todas estas células interagem em um contexto de vias metabólicas inflamatórias, produção de autoanticorpos, secreção de citocinas, de quimiocinas, de fatores de crescimento e de fatores pró-inflamatórios (ANGELOTTI et al., 2017).

Em geral a AR acomete indivíduos geneticamente predispostos, expostos a fatores ambientais como o tabagismo, a inalação de poeira ou a infecções. De acordo com essa hipótese, o gatilho patológico inicia nas células mais suscetíveis (principalmente em mucosas), as quais desenvolvem modificações pós-traducionais, precipitando uma resposta alterada do sistema inato contra estes neoantígenos. Após esta resposta inicial, ocorre uma correção aberrante entre as células T e as células B, culminando na produção de autoanticorpos contra esses neoantígenos (McINNES & SCHETT, 2017).

Em geral, existe um período subclínico entre a produção de autoanticorpos e a manifestação dos primeiros sintomas, o que pode durar até alguns anos. Nesta janela, além dos autoanticorpos, quimiocinas, citocinas e fatores pró-inflamatórios podem estar elevados na circulação até 10 anos antes do início dos sintomas (SMOLEN et al., 2018).

Com a progressão de um estado subclínico para o acometimento sinovial ocorrem, inicialmente, duas alterações importantes. Na camada íntima, os macrófagos e os fibroblastos

sinoviais iniciam um intenso processo proliferativo e secretivo. Os macrófagos ativados liberam principalmente a IL-1, IL-6 e o FNT- α . Já os fibroblastos sinoviais produzem metaloproteinases e prostaglandinas. Além disso, os fibroblastos sinoviais assumem um comportamento invasor, aderindo e gerando lesões à cartilagem e o osso subcondral (BARTOK & FIRESTEIN, 2010).

O segundo evento marcante é a infiltração de células inflamatórias, do sistema inato e adaptativo, na camada subíntima. Estas células secretam citocinas, fatores pró-inflamatórios, fatores de crescimento e enzimas, que degradam a matriz extracelular. Os linfócitos invasores podem, inclusive, formar centros de germinação ectópicos, onde as células B podem proliferar, culminando com a produção local de autoanticorpos (WEYAND & GORONZY, 2003).

A grande invasão de células inflamatórias, com alta atividade metabólica, torna o ambiente hipóxico. Aliado a isto, a grande abundância de citocinas e de fatores de crescimento, estimula a angiogênese, o que retroalimenta um ciclo de infiltração e inflamação crônica. Grande parte dos fatores pró-angiogênicos, como o VEGF (fator de crescimento endotelial vascular, do inglês vascular *endothelial growth factor*), o FGF- β (fator crescimento de fibroblastos básico, do inglês *basic fibroblast growth factor*) e o HIF-1 α (fator induzível por hipóxia 1 α , do inglês *hypoxia inducible factor 1 α*), são secretados pelos fibroblastos e pelos macrófagos sinoviais, ativados em um estado inflamatório. Isto reflete a importância das células sinoviais na neovascularização e na manutenção da inflamação crônica (ELSHABRAWY et al., 2015).

Durante o desenvolvimento da AR, os fibroblastos sinoviais proliferam e são uma das células mais prevalentes no *pannus*. Fatores como hipóxia, FNT- α , e PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas, do inglês *platelet-derived growth factor*) modificam seu estado quiescente, para um comportamento agressivo. O ambiente hipóxico, com aumento dos níveis do HIF-1 α , ajuda a regular o metabolismo da glicose, estimulando a glicólise (DEL REY et al., 2017). Neste estado ativado, os sinviócitos B liberam citocinas (IL-1 β), que perpetuam a

inflamação, e secretam enzimas, que destroem a matriz extracelular da cartilagem hialina (BARTOK & FIRESTEIN, 2010; BUSTAMANTE et al., 2017). Estas células são particularmente importantes na interface *pannus*-cartilagem, onde secretam grandes quantidades de MMPs, que danificam o colágeno, permitindo a invasão destas células no local (MILLER et al., 2009). Como exemplificado na Figura 9, os sinviócitos B ainda induzem a reabsorção óssea periarticular, estimulando a ação osteoclástica mediante a liberação do fator RANKL (ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B, do inglês *receptor activator of nuclear factor- κ B ligand*) (NYGAARD & FIRESTEIN, 2020).

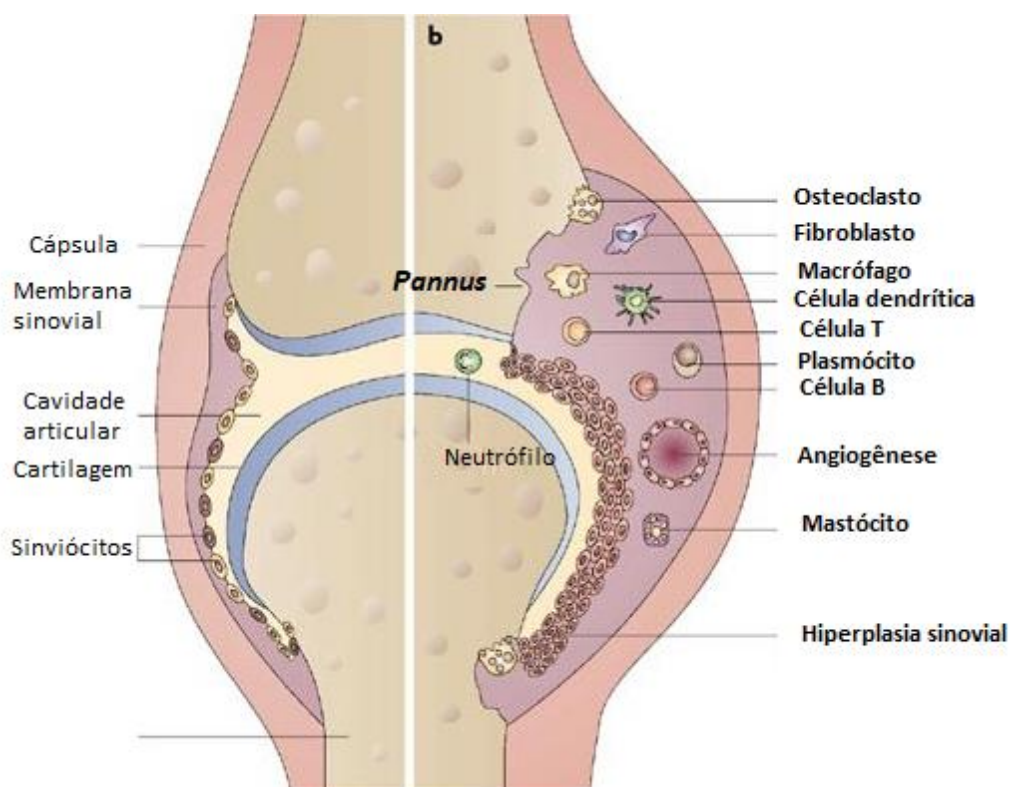


Figura 9. Comparação entre as características de um joelho normal (figura esquerda) e de um joelho com artrite reumatóide (figura direita). Representação comparativa de uma articulação sadia e de outra acometida por artrite reumatoide. Observe, na figura da direita, a hiperplasia dos sinviócitos na camada íntima e a angiogênese associada à infiltração de diversas células inflamatórias na subíntima. A invasão destas células inflamatórias, com alta atividade metabólica e secretiva pró-inflamatória, culmina na formação do *pannus*, um tecido invasor que destrói a cartilagem articular e promove a reabsorção óssea periarticular pela ação dos osteoclastos. Adaptado de STRAND et al., 2007.

Na AR as células imunológicas e residentes do tecido apresentam alterações no seu metabolismo, direcionadas para um comportamento de sobrevivência e de proliferação. O microambiente de uma articulação inflamada é um meio com baixa oferta de nutrientes e de oxigênio. Assim, alguns fatores pró-inflamatórios e a hipóxia, principalmente mediante o HIF-1 α , ativam cascatas de sinalização, alterando a expressão destas células (GABER et al., 2005). Estas alterações metabólicas se assemelham às características das células tumorais (CAIRNS et al., 2011). Um marco do metabolismo das células tumorais é a utilização da glicólise aeróbia, descrita como o efeito de Warburg (WARBURG, 1956).

Embora a glicólise seja um método ineficiente para produção de ATP, ela proporciona uma vantagem para a proliferação celular, ao incorporar os produtos (carbonos do lactato) como precursores da síntese de macromoléculas (VANDER HEIDEN et al., 2009). Além disto, as células ativadas em um estado inflamatório tornam-se habituadas a ambientes ácidos e hipóxicos, conferindo uma vantagem adaptativa (GATENBY & GILLIES, 2004).

Na AR os fibroblastos sinoviais apresentam propriedades metabólicas similares às células tumorais. Diversos estudos abordam o aumento da captação e a desregulação do metabolismo da glicose na AR (BUSTAMANTE et al., 2017). Além disso, existe uma correlação direta entre a captação de glicose sinovial e a atividade da doença (MATSUI et al., 2009; LEE et al., 2019). Em fibroblastos sinoviais de modelos de artrite em camundongos, a expressão do transportador de glicose GLUT 1 e de outras moléculas envolvidas na glicólise estão elevadas (GARCIA-CARBONELL et al., 2016). Recentemente, as enzimas reguladoras da glicólise passaram a ser apontadas como potenciais alvos terapêuticos (SONG et al., 2019).

Desta forma, na AR há a substituição do delicado tecido da íntima, formado por poucos estratos de células sinoviais, por um tecido hiperplásico, densamente povoado por macrófagos e por fibroblastos sinoviais ativados num estado inflamatório. Na camada subíntima, ocorre uma excessiva proliferação vascular e infiltração de células inflamatórias. Este tecido com

intensa atividade proliferativa, chamado de *pannus*, comporta-se como um tumor, que invade e destrói os tecidos articulares (BOTTINI & FIRELSTEIN, 2013).

1.4 Metabolômica

A análise metabolômica visa compreender as interações biológicas celulares mediante a identificação das moléculas presentes em uma amostra biológica. A metabolômica pode ser considerada o estágio final da cascata das *ômicas* (genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica) (PATTI et al., 2012). Distinta das outras áreas no campo das *ômicas*, que buscam identificar fenômenos genéticos e epigenéticos do que é expresso nas células, a metabolômica avalia a resultante destes fenômenos, interagindo com as ações do ambiente (LI et al., 2020).

Os metabólitos são todas as moléculas (endógenas e exógenas) de baixa massa molecular, usualmente abaixo de 1.500 Da (Dalton), encontradas nos sistemas biológicos (ZHANG et al., 2012). Eles constituem os substratos e os produtos de inúmeras reações enzimáticas encontradas nos tecidos, determinados por fatores genéticos, processos celulares e estímulos do meio. Além de intermediários nas reações, eles podem exercer funções reguladoras no organismo. Assim, o aumento ou a diminuição de metabólitos específicos pode refletir em um distúrbio fisiológico. Desta maneira, a análise metabolômica opera como uma fotografia, revelando as complexas interações metabólicas teciduais em uma determinada condição (DUNN et al., 2011).

O estudo metabolômico pode ser global ou alvo direcionado. A análise global busca detectar todos os metabólitos possíveis em uma amostra, podendo inclusive identificar moléculas ainda desconhecidas, demonstrando o perfil metabólico de um sistema. Já o método alvo direcionado procura, seletivamente, assinalar metabólitos pré-determinados. Embora a análise alvo possa apresentar maior sensibilidade na busca de metabólitos específicos, ela

possibilita o viés de, eventualmente, negligenciar moléculas potencialmente relevantes em um determinado contexto (RATNESWARAN et al., 2020).

As plataformas analíticas mais empregadas são a espectroscopia por ressonância nuclear magnética (RNM) e a espectrometria de massa (EM). A RNM e a EM requerem uma quantidade mínima de amostra, menos de 1mL (mililitro) para líquidos e de 1mg (miligrama) para sólidos, oferecendo um perfil metabólico composto de dezenas ou centenas de metabólitos (FITZPATRICK e YOUNG, 2013).

A RNM apresenta algumas vantagens perante a EM, como a reprodutibilidade, a independência de preparo prévio e a indestrutibilidade da amostra durante a análise. Esta última característica favorece a realização de inúmeras análises com o mesmo material. Além disso, a ressonância caracteriza melhor a estrutura química das moléculas, mas requer a utilização de equipamentos de alta resolução, com um custo elevado (GOWDA et al., 2008).

Por outro lado, a EM possui uma sensibilidade maior, já que seu limite de detecção é menor, identificando moléculas em menor concentração. Sua análise pode ser direta ou acoplada a técnicas de separação, como a cromatografia líquida (CL), a cromatografia gasosa (CG) e a eletroforese capilar. As análises que utilizam métodos de pré-separação ganham sensibilidade, mas tornam a técnica mais dispendiosa e com menor potencial de reprodutibilidade (PRIORI et al., 2013; HAGGARTY & BURGESS, 2017).

A metabolômica demanda uma metodologia complexa até a interpretação biológica dos resultados. Uma série de passos são necessários neste caminho (Figura 10), desde a coleta das amostras até a identificação de rotas metabólicas alteradas e a formulação de hipóteses metabólicas (JAGGARD et al., 2020).

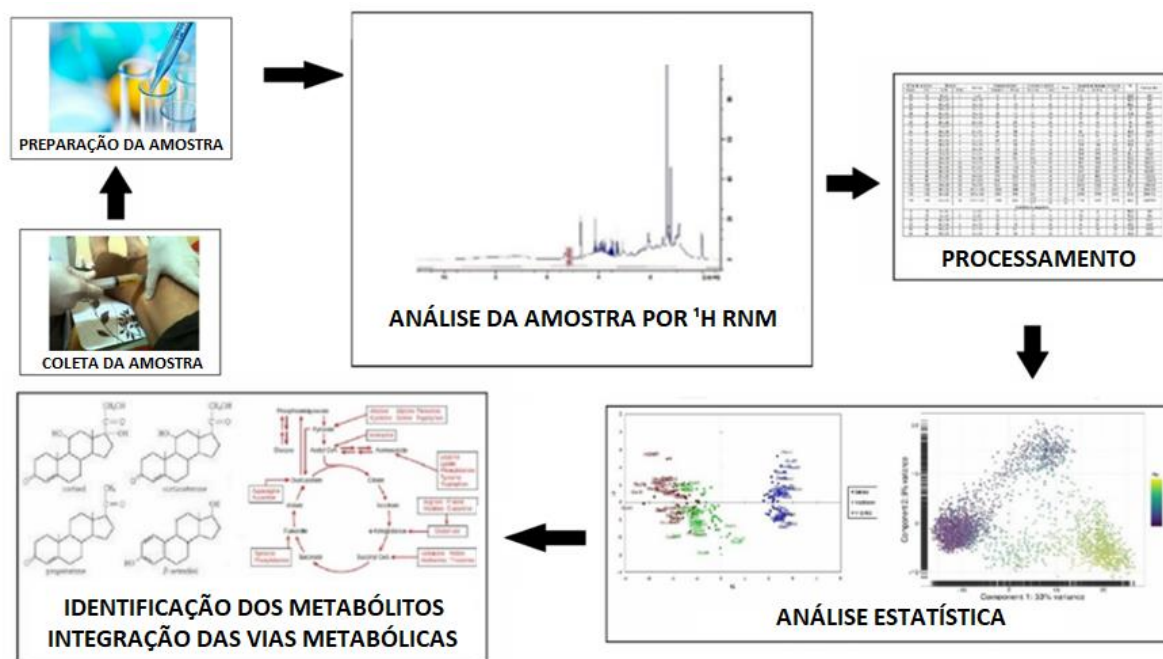


Figura 10. Esquema das etapas de uma pesquisa envolvendo a análise metabolômica. Após a coleta da amostra do biofluido a ser analisado, no caso do presente estudo líquido sinovial, a mesma é preparada através da filtragem e adição de outros compostos que irão auxiliar na sua análise. Após aquisição dos espectros, ocorre o processamento e análise estatística, para a identificação dos compostos e das vias metabólicas nas quais estão envolvidos. Imagem adaptada de JAGGARD et al., 2020

1.4.1 Análise metabolômica por RNM

Na análise por RNM, a amostra é exposta a um campo magnético e é, então, estimulada por um pulso de radiofrequência. A partir do fenômeno de ressonância magnética dos núcleos de hidrogênio, presentes nas moléculas da amostra, forma-se um espectro de RNM, no qual os metabólitos podem ser identificados e quantificados (SHOWIHEEN et al., 2019).

O núcleo dos átomos com massa ímpar, como o átomo de hidrogênio com massa 1 (^1H), apresentam uma propriedade física chamada *spin*, em que comportam-se como estivessem girando, gerando um momento magnético nuclear (TOGNARELLI et al., 2015). Quando estes núcleos são submetidos a um campo magnético forte, os momentos magnéticos nucleares se alinham paralelos ou antiparalelos ao campo magnético, expressando, respectivamente, um menor ou maior estado *spin* de energia. Estes núcleos podem ser induzidos a absorver energia, em um processo quantizado (ao receber estímulo com a frequência exata à diferença de energia

moléculas presentes na amostra são calibrados pelos picos gerados pelos prótons do padrão interno, um composto adicionado a amostra como referência, com estrutura química e concentração conhecida (PAVIA et al., 2009).

Em amostras com composição complexa, contendo inúmeras moléculas em concentrações distintas, identificar e quantificar os elementos constituintes é um desafio. Cada amostra analisada irá gerar um espectro, com múltiplas variáveis quantitativas, representando a concentração de cada metabólito detectado naquela amostra. Uma vez que os espectros são gerados, forma-se uma matriz de dados, no qual as colunas representam as variáveis (concentração dos metabólitos) e as linhas representam as amostras do estudo (BLECKHERMAN et al., 2011).

Esse grande volume de informações demanda cálculos estatísticos complexos e *softwares* para interpretação destes dados de alta dimensão (JAGGARD et al., 2020). As análises multivariadas como o PCA (do inglês, *Principal Component Analysis*) e o PLS (do inglês, *Partial Least Square*) buscam a redução destes dados multidimensionais, além de organizar e classificar os dados obtidos (TRYGG et al., 2007; MADSEN et al., 2010). Já as análises univariadas costumam ser utilizadas para discriminar um metabólito específico entre os grupos. Há atualmente diversos *softwares* disponíveis para tratamento de dados metabolômicos, além de *sites* com bases de dados para correlações de rotas metabólicas (MISRA & VAN DER HOOFF, 2016).

1.4.2 Metabolômica na OA e na AR

Apesar da grande prevalência e dos custos em saúde pública relacionados à OA, nas últimas décadas, houve pouco progresso no diagnóstico e no manejo da doença (CHARLESWORTH, et al. 2019). A introdução do uso rotineiro de melhores equipamentos de

imagem na prática clínica, como a ressonância magnética, permitiu uma melhor avaliação e acompanhamento da deteriorização dos tecidos articulares (BRAUN e GOLD, 2012). Estes exames, todavia, demonstram apenas alterações estruturais, sem informar aspectos metabólicos, que possibilitem o anúncio precoce de alterações na fisiologia local.

Além disso, tendo em vista a natureza complexa e heterogênea da OA, a metabolômica parece se enquadrar bem para os propósitos de pesquisa nesta área. Reconhecendo que a OA é uma doença heterogênea, que parece percorrer múltiplas vias patofisiológicas, é possível que no futuro sejam desenvolvidas estratégias de tratamento personalizadas, a partir de características individuais dos portadores da doença (BLANCO et al., 2018). Neste cenário, não é provável que um único biomarcador possa trazer luz ao tema, mas a formulação de painéis de biomarcadores, a partir da contribuição de muitos estudos (AKHBARI et al., 2020). Desta forma, a metabolômica é uma ferramenta promissora, para melhorar a compreensão sobre os mecanismos que atuam na doença, auxiliando na busca por um diagnóstico precoce ou por novas terapias (GUMA et al., 2016; ZHAI et al., 2018).

O líquido sinovial é o meio que disponibiliza nutrientes para a cartilagem hialina e por onde os dejetos celulares são drenados, tornando este biofluido um interessante substrato para a identificação de biomarcadores (JAGGARD et al., 2020). Contudo, a coleta de líquido sinovial é um procedimento invasivo e não é isenta de riscos, o que limita o número de trabalhos que o utilizam e torna inviável a comparação com controles saudáveis.

A principal vantagem do uso de amostras de sangue (soro ou plasma) para experimentos metabolômicos é a acessibilidade para coleta, favorecendo o uso de sangue como método de *screening*. Além disso, a análise do sangue também pode fornecer informações sistêmicas que possam, porventura, estar associadas à doença articular, como também outras condições independentes à OA podem influenciar o comportamento metabólico no sangue. Como desvantagem, alguma eventual alteração metabólica expressiva no ambiente articular pode estar

diluída na circulação sistêmica e, assim, não ser assinalada. Embora muitas pesquisas metabolômicas utilizem amostras de sangue para analisar doenças articulares, a correlação entre a concentração dos metabólitos no sangue e no líquido sinovial é modesta (ZHANG et al., 2015). O Quadro 1 ilustra as principais pesquisas metabolômicas no líquido sinovial envolvendo a OA e a AR.

Quadro 1. Principais análises metabolômicas do líquido sinovial na OA e na AR.

Autor (ano)	Biofluido	Método analítico	Grupos	Número de participantes	Principais achados	Vias metabólicas alteradas
Kim et al. (2017)	Líquido sinovial (joelho)	EM-CG	OA inicial vs OA avançada	15	22 metabólitos alterados	ácidos graxos; glicólise; glicerolipídios; ciclo de Krebs; glicerofosfolipídeos
Mickiewicz et al. (2015)	Líquido sinovial (joelho)	¹ H RNM e EM-CG	OA vs controle (cadáver)	68 55 OA 13 controle	11 metabólitos alterados ↑ Frutose e Citrato) ↓ Hidroxibutirato, creatina, etanol, etanolamina, acetil-carnitina, malato, metionina, N-felanilacetilglicina)	ciclo de Krebs; lipídeos; ácidos graxos
Carlson et al. (2019)	Líquido sinovial (joelho)	EM-CL (global)	OA inicial OA avançada Controle (sem OA) (todas as amostras de cadáveres)	75 55 OA inicial 14 OA avançada 6 sem OA	Conseguiu distinguir em fenótipos: E1 - inicial inflamatório (ácido araquidônico e butirato) E2 - inicial estrutural (degradação de GAG) L1 - tardio inflamatório (inflamação e estresse oxidativo); L2- tardio estrutural (degradação de GAG)	Inflamação (metabolismo dos leucotrienos) Dano estrutural / metabolismo dos componentes da MEC (sulfato de queratina e de glicosamina) Estresse oxidativo (metabolismo da glutatona, vitamina E, vitamina C)
Zheng et al. (2017)	Líquido sinovial (joelho)	EM-CG	OA vs controle (amputação)	35 - 25 OA -10 controles	↑ Gluconolactona ↑ Anidroglicitol ↓ Glutamina	Estresse oxidativo Metabolismo da glutamina

Zhang et al. (2014)	Líquido sinovial (joelho e quadril)	EM (alvo)	Indivíduos com OA do quadril e / ou do joelho	80	Distinguiu em dois grupos: - Grupo A (11) ↑ Acilcarnitinas ↓ carnitina livre ↓ Acetilcarnitina - Grupo B (69) ↓ Acilcarnitinas ↑ carnitina livre	Metabolismo dos ácidos graxos
Williamson et al. (1989)	Líquido sinovial (joelho)	¹ H RNM	AR; OA e derrame articular traumático.	39 AR (18) OA (10) Traumático (11)	Grupo traumático: ↑ Ácidos graxos saturados Grupo OA: ↓ Ácidos graxos saturados	Metabolismo dos ácidos graxos
Meshitsuka et al. (1999)	Líquido sinovial (joelho)	¹ H RNM	AR e OA	30 AR (14) OA (16)	Razão lactato / alanina: ↑ AR ↓ OA	Glicólise
Marshall et al. (2000)	Líquido sinovial (joelho)	¹ H RNM (alvo)	OA leve e severa	Não descrito	Alterações na OA severa: ↑ Lactato e citrato. ↓ Treonina, açúcares / polióis	Metabolismo dos ácidos graxos Glicólise Ciclo de Krebs
Anderson et al. (2018)	Líquido sinovial (joelho)	¹ H RNM (global)	AR e OA	24 AR (14) OA (10)	OA: ↓ Razão lactato / glicose ↑ glicose, piruvato, manose, citrato, glutamina, tirosina, glicerol, taurina, hidroxibutirato AR: ↑ Razão lactato / glicose ↑ acetato, leucina, isoleucina, treonina	Glicólise Metabolismo dos aminoácidos Metabolismo da taurina
Yang et al. (2015)	Líquido sinovial (joelho)	EM-CG	AR e controles (amputação)	35 AR (25) Controle (10)	AR: ↑ Lactato ↓ Glicose, citrato, valina, gluconolactona, G6P, manose	Glicólise Ciclo de Krebs Metabolismo dos aminoácidos
Wang et al. (2020)	Líquido sinovial (joelho)	EM-CL	AR e OA	40 AR (20) OA (20)	22 metabólitos	Metabolismo da purina e da pirimidina Metabolismo ácidos graxos

Kang et al. (2015)	Líquido sinovial (joelho)	EM-CL	AR e OA	20 AR (10) OA (10)	21 metabólitos OA: ↑ Carnitina ↓ Taurina ↑ Metabólitos degradação triptofano AR: ↑ metabólitos lipídicos (prostaglandinas e fosfolipídeos)	OA: ↑ Metabolismo da carnitina, fenilamina, triptofano, ácido araquidônico e glicofosfolipídeos. AR: ↑ Metabolismo taurina, ester colesterol, β- oxidação dos ácidos linolêicos e fosfolipídeos.
-----------------------	------------------------------	-------	---------	----------------------------------	--	--

Quadro comparativo entre os principais estudos em humanos, avaliando o metabolismo do líquido sinovial do joelho em indivíduos com osteoartrite ou com artrite reumatoide. EM-CG: espectrometria de massa com cromatografia gasosa; OA: osteoartrite; ¹H RNM ressonância nuclear magnética; EM-CL: espectrometria de massa com cromatografia líquida; GAG: glicosaminoglicanas; MEC: matriz extracelular; EM: espectrometria de massa; AR: artrite reumatoide.

2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

O Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia (INTO) é o órgão de referência do Ministério da Saúde no tratamento das doenças ortopédicas, e a OA e a AR são as causas mais comuns de artrite do joelho. A OA é a principal causa de incapacidade nos adultos, representando a maior parcela da demanda do centro de cirurgia do joelho do INTO. A AR, por sua vez, apesar de menos prevalente, costuma trazer maior morbidade aos indivíduos, por acometer pacientes em uma faixa etária mais jovem, além de envolver simultaneamente outras articulações. Apesar do grande impacto destas condições na saúde pública, nas últimas décadas, houve pouco progresso no diagnóstico e no tratamento da OA.

A metabolômica é uma técnica analítica que vem crescendo na atualidade, a qual possibilita a inferência sobre o fenótipo dos sistemas biológicos nas amostras, a partir do ambiente molecular encontrado. Esta perspectiva metabólica apresenta potencial para ampliar o conhecimento sobre a OA, na busca por biomarcadores e por alvos terapêuticos. Deste modo, é relevante estudar de forma mais aprofundada no que estas doenças diferem e se há pontos em comum, para que se possa rastrear possíveis biomarcadores para o diagnóstico precoce da OA, permitindo que o tratamento seja iniciado em fases anteriores às alterações irreversíveis.

Esse projeto é uma ramificação de uma linha de pesquisa já bem-sucedida, que estudou o perfil celular e metabólico de pacientes com e sem OA do joelho. Como a AR apresenta fisiopatologia diferente da OA, hipotetizamos que existam diferenças no perfil metabólico do líquido sinovial do joelho nos pacientes acometidos por tais doenças.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Comparar o perfil metabólico do líquido sinovial de pacientes com osteoartrite e com artrite reumatoide do joelho.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar os metabólitos, presentes no líquido sinovial, mais representativos para a distinção entre a osteoartrite e a artrite reumatoide.

Correlacionar o perfil metabólico do líquido sinovial dos pacientes com osteoartrite com aspectos clínicos, laboratorial e radiográfico.

4 METODOLOGIA

4.1 Desenho do estudo

Estudo observacional, analítico e transversal.

4.2 Aspectos éticos

Todos os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e a pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do INTO, conforme parecer 3.662.937 emitido em 25/10/2019 (ANEXO A).

4.3 Pacientes

4.3.1 Inclusão

A população foi composta por pacientes em acompanhamento no Centro de Atenção Especializada (CAE) de Cirurgia do Joelho do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia (INTO), submetidos à artroplastia total do joelho (ATJ), entre o período de outubro de 2019 à dezembro de 2020. Os participantes foram divididos em dois grupos:

- a) GRUPO A (OA): Composto por pacientes com diagnóstico de osteoartrite do joelho conforme os critérios diagnósticos clínico radiográficos do Colégio Americano de Reumatologia (ALTMAN et al., 1986);
- b) GRUPO B (AR): Composto por pacientes com diagnóstico de artrite reumatoide, conforme os critérios do Colégio Americano de Reumatologia (ALETAHA et al., 2010).

4.3.2 Exclusão

Foram excluídos do estudo os pacientes com infecção ativa no membro operado; pacientes submetidos à cirurgia prévia no mesmo joelho; pacientes com outras doenças autoimunes, ou com síndromes genéticas; pacientes com teste sorológico positivo para hepatite B, C e/ou HIV; pacientes com neoplasias malignas ou em uso de quimioterápicos antineoplásicos; pacientes em uso de imunossupressores ou de glicocorticóides; pacientes com volume de líquido sinovial coletado inferior a 1 mL, considerado insuficiente para as análises.

4.4 Avaliação clínica e laboratorial

Para os pacientes que cumpriram os critérios de seleção, foram analisados os prontuários dos participantes, o banco de dados do laboratório de análises clínicas do INTO, para a coleta das seguintes informações:

4.4.1. Identificação: Iniciais do nome de cada participante e o número do prontuário no INTO.

4.4.2. Aspectos demográficos: Sexo, idade e lateralidade do joelho operado, a partir do prontuário.

4.4.3. Dados antropométricos: massa, expresso em quilograma (kg); altura, em metro (m). A partir destas informações foi calculado o índice de massa corpórea (IMC), em kg/m^2 . De acordo com as diretrizes da sociedade brasileira de obesidade (ABESO, 2016), cada participante foi classificado como normal / eutrófico (IMC entre 18,5 e 24,9), sobrepeso (IMC entre 25 e 29,9) ou obeso (IMC $\geq$ 30).

4.4.4. Aspectos clínicos, coletado a partir da ficha anestésica da cirurgia: presença ou ausência de hipertensão arterial sistêmica (HAS), diabetes mellitus tipo 2 (DM2), dislipidemia, cardiopatia e insuficiência renal crônica.

4.4.5. Glicemia de jejum: Resultado do nível sérico, pré-operatório, de glicose de jejum, expresso mg/dL (miligramas por decilitro), extraído do banco de dados do laboratório de análises clínicas do INTO.

O instrumento de coleta de dados dos participantes foi resumido em uma ficha, devidamente identificada para cada participante. Todos estes dados foram tabulados em uma planilha Microsoft Excel.

4.5 Avaliação radiográfica

As radiografias pré-operatórias dos joelhos operados foram avaliadas e classificadas, conforme a classificação de Ahlbäck modificada por Keyes e GoodFellow (Figura 12), mediante concordância entre dois médicos ortopedistas (um cirurgião de joelho experiente e um aluno do curso de aperfeiçoamento em cirurgia do joelho) (KEYES et al., 1992). As imagens foram avaliadas a partir do arquivo de dados de exames de imagem do INTO.

GRAU	RADIOGRAFIA AP	RADIOGRAFIA PERFIL
1	Redução do EAFTM (< 3 mm)	-
2	Obliteração do EAFTM	-
3	Atrito ósseo < 5mm	Platô posterior preservado
4	Atrito ósseo 5-10mm	Atrito posterior
5	Subluxação da tíbia	Subluxação anterior da tíbia



Figura 12. Descrição da classificação da osteoartrite do joelho proposta por Ahlbäck. Imagem de radiografias do joelho, coletadas do banco de imagens do INTO, com gravidade progressiva na visualização AP e perfil. AP : antero-posterior ; EAFTM: espaço articular femoro-tibial medial.

4.6 Coleta, transporte e armazenamento das amostras

Cada amostra de líquido sinovial foi coletada pelo cirurgião, de forma estéril, durante o procedimento de ATJ. Após a abordagem cirúrgica do joelho, e antes da abertura da cápsula articular, foi realizada a punção aspirativa do líquido sinovial. Após a coleta, cada amostra foi mantida na seringa da coleta, sendo acondicionada em bolsa térmica a 4°C (Celsius) e transportada até o Centro de Processamento Celular do INTO. A seguir, as amostras foram transferidas para microtubos e, após identificadas, as alíquotas foram centrifugadas a 2000 g (gravidade), durante 5 minutos, e decantadas. Os sobrenadantes, contendo líquido sinovial livre de células, foram congelados a -80° C. Para evitar qualquer tipo de interferência externa, o líquido não foi diluído em qualquer tipo de solução.

4.7 Processamento das amostras

As análises foram realizadas no Centro Nacional de Biologia Estrutural e Bioimagem (CENABIO), da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Assim, algumas horas antes das análises metabolômicas, as amostras de líquido sinovial foram descongeladas em temperatura ambiente, em séries de 20 a 24 por vez (enquanto as outras amostras permaneceram congeladas), uma vez que o amostrador do espectrômetro utilizado dispõe de 24 posições. Após descongeladas, as amostras foram centrifugadas a 7168 g, por 20 minutos. A seguir, 500 µL (microlitro) do sobrenadante foram misturados com 1500 µL do tampão fosfato, a 50 mM (milimolar), em pH 7.4. Para eliminar a interferência de moléculas grandes, as misturas de líquido sinovial com tampão fosfato foram filtradas em membranas Amicon Ultra-2 (MERK-Millipore®), com malha de 3 kDa (#UFC200324), e foram centrifugadas à 4032 g, por 20 minutos. Após a centrifugação, 540 µL da solução filtrada foi transferida para um novo microtubo e foi adicionado 60 µL de uma solução, contendo 1mM de DSS (2,2-dimetil-silapentano-2-5-sulfonato) e água deuterada (D2O), como

esquemático na Figura 13. Para verificar o efeito de outros compostos presentes no tampão e no filtro, foi preparada uma amostra controle, no qual o líquido sinovial foi trocado por tampão fosfato. Os microtubos, contendo as misturas, foram acondicionados em bolsa térmica a 4°C, para serem transportados até o laboratório de bioquímica nutricional da UFRJ, local escolhido para finalização do preparo, por se localizar a apenas alguns metros do CENABIO. No laboratório de bioquímica nutricional da UFRJ, foram transferidos manualmente os 600 µL dos tubos eppendorfs para os tubos de RMN, de 5mm (milímetro) de diâmetro. Durante todos os passos citados acima, os tubos foram devidamente identificados.



Figura 13. Esquema do processamento das amostras. Ilustração esquemática da mistura do líquido sinovial com o tampão fosfato. Na sequência, a foto do filtro Amicon, retirada do site do fabricante (https://www.merckmillipore.com/BR/pt/product/Amicon-Ultra-2-Centrifugal-Filter-Unit,MM_NF-UFC200324), no dia 13/06/2021. Por fim, 60 µL de uma solução contendo a substância padrão (DSS) é adicionada à 540 µL da solução filtrada, totalizando 600 µL.

4.8 Análise metabolômica

4.8.1 Equipamento e preparação das análises

Os experimentos metabolômicos foram realizados na unidade I (CNRNMN, Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear de Macromoléculas) do CENABIO, da UFRJ. No CENABIO I, o aparelho utilizado foi o espectrômetro Bruker Avance III™ HD (Bruker Biospin,

Alemanha) (Figura 14A), que operou a 500 MHz (mega-hertz), com a temperatura da sonda controlada a 300 K (Kelvin). Cada tubo de RNM de 5mm foi acoplado a um dispositivo chamado rotor da amostra (*sample spinner*, 14B) e posicionado na altura correta do tubo, com auxílio de um medidor, para que, durante a análise, o nível da amostra no tubo correspondesse adequadamente com o da bobina (*coil*) de raquiofrequência do espectrômetro. Os tubos de RNM, acoplados nos rotores, foram inseridos nas 24 posições (*holders*) do amostrador do aparelho, para iniciar as análises (Figura 14C).

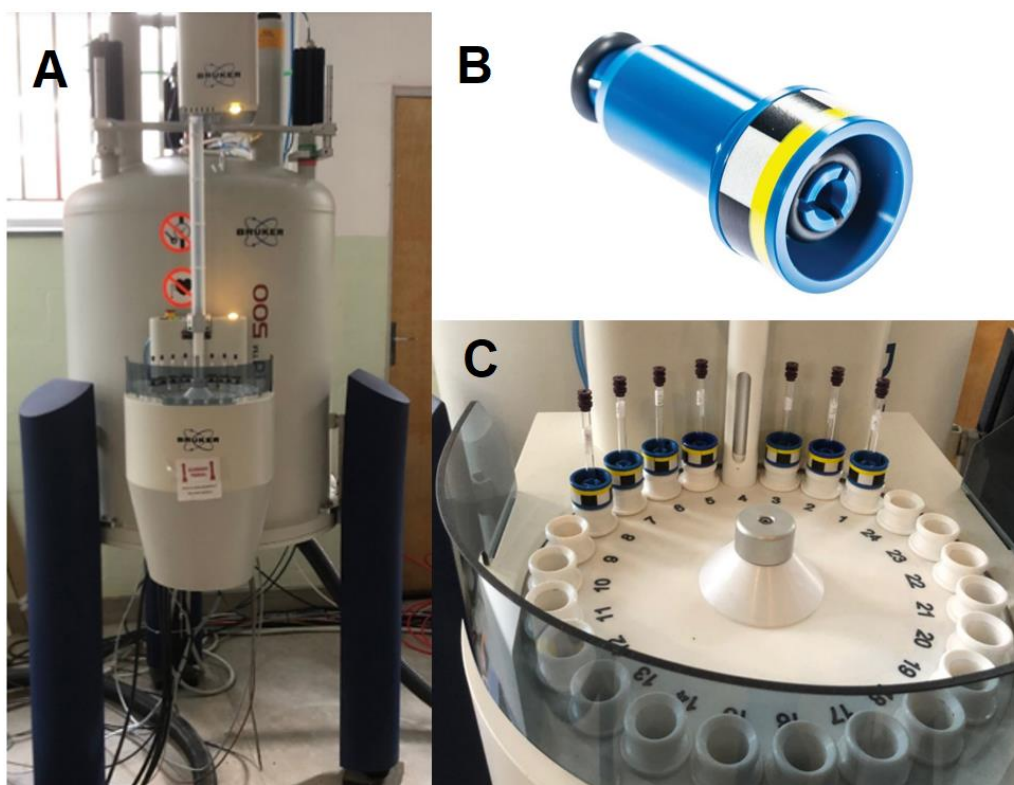


Figura 14. Esquema com fotografias dos equipamentos utilizados. (A) Imagem do aparelho Bruker Avance III™ HD 500 MHz, do CENABIO I /UFRJ, utilizado para as análises metabolômicas. O aparelho opera a 500 MHz com temperatura de da sonda controlada a 300 K. (B) Fotografia do mesmo rotor (*sample spinner*) utilizado nesta pesquisa. A fotografia foi coletada do site <https://cortecnet.com/5-mm-pom-spinner-500-mhz.html>, no dia 13/06/2021. (C) Visualização do amostrador do aparelho, durante preparação para as análises. Observe que as amostras já foram inseridas nas oito primeiras posições. Cada amostra, contida em um tubo de 5mm, é acoplada ao rotor, para ser inserida nas posições do amostrador.

4.8.2 Aquisição dos espectros

O perfil metabólico das amostras de líquido sinovial foi analisado mediante a aquisição de espectros unidimensionais de ^1H , utilizando as sequências pulso com supressão de água, *excitation sculpting* (zgesgp), número de pontos de 64K, número de acumulações de 1K, largura espectral de 20 ppm, D1=1,40s, O1P= 4,7 ppm. Além da água, foram removidas dos espectros as regiões de alguns picos do DSS (não o pico majoritário em 0,00 ppm), glicerol e regiões com intensidade negativa. A quantificação relativa dos metabólitos foi realizada por meio da normalização pelo DSS. Para o assinalamento, foram adquiridos espectros bidimensionais TOCSY (do inglês, *total correlation spectroscopy*) H-H, utilizando a sequência *mlevesgp*. Os espectros foram processados no programa TopSpin 4.0, onde foi ajustada a fase e a linha base de cada um. O Bucket table (0,02 ppm – Mnova) foi realizado no programa AMIX (Bruker Corporation, Alemanha), e as análises multivariadas foram realizadas na interface metaboanalyst (<https://www.metaboanalyst.ca>).

4.9 Análise estatística

4.9.1 Análise dos dados clínicos e demográficos

Os dados coletados dos prontuários foram tabulados em planilha Microsoft Excel®. Para a análise estatística foi utilizando o software *GraphPad Prism for Windows* 9.0. Os dados correspondentes à idade, à massa, à altura e ao IMC foram apresentados sob a forma de média e de desvio padrão. Já os dados referentes à presença de hipertensão arterial, de dislipidemia, de cardiopatia, de diabetes e de doença renal foram apresentados em frequência absoluta e em frequência relativa.

Para a comparação, entre os grupos, dos dados de idade, de massa, de altura e de IMC foi utilizado o teste *t* de *Student* não pareado bicaudal. Já para os dados quanto à frequência de distribuição por sexo, hipertensão arterial, dislipidemia, cardiopatia, diabetes e doença renal foi utilizado o teste exato de Fisher. A comparação entre os dados de frequência de gravidade da OA, de lateralidade e de

obesidade utilizou o teste do Qui-quadrado. Foram consideradas significativas as comparações cujo valor de p foi inferior a 0,05.

4.9.2 Análise dos dados

A avaliação dos dados obtidos dos espectros foi realizada pela análise do componente principal (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*), que não leva em consideração a separação entre os grupos, sendo uma análise indiscriminada, e livre de *overfitting*. Esta análise permite a geração de dois gráficos, sendo um gráfico de pontuação (do inglês *Score Plot*) e o outro com o fator de carga (do inglês *Loading Plot*), possibilitando assim uma redução do tamanho da complexidade dos dados e uma representação mais compacta. O gráfico tipo *Score Plot* mostra a separação entre as classes dos pacientes em virtude do perfil metabólico, de modo que, quanto mais distantes se dispõem os pontos nos gráficos, mais discrepantes são os seus perfis metabólicos. A elipse que envolve as classes é chamada de elipse de *Hotelling* e mostra o intervalo de confiança, onde se encontram 95% das observações. Já o gráfico tipo *Loading Plot* mostra quais foram os metabólitos (por valor de deslocamento químico na escala de ppm) que foram mais influentes na separação das classes do *Score Plot*. Isso significa que, quando um ponto (representando um metabólito) se distancia do agrupamento dos demais, maior a relevância deste metabólito para a separação das classes. Muitas vezes, isso possibilita a identificação de metabólitos marcadores com capacidade para discriminar grupos.

Posteriormente, os dados foram submetidos à análise por múltiplos testes t para a identificação de pares de dados significativos entre os grupos. Já os metabólitos assinalados na análise do PCA foram submetidos à análise univariada com teste t de *Student* não pareado bicaudal para avaliação da significância estatística da diferença entre dois grupos. As análises univariadas em mais de dois grupos foram realizadas pela análise de variância (ANOVA). Foram consideradas significativas as comparações cujo valor de p foi inferior a 0,05.

A representação gráfica das análises univariadas foi ilustrada mediante gráficos do tipo *boxsplot*, que demonstra a estimativa da concentração de um determinado metabólito avaliado, encontrada em cada amostra, nos diferentes grupos. O gráfico forma, para cada grupo, uma caixa alongada em um eixo vertical, no qual este eixo (eixo Y) apresenta uma escala de valores. A base da caixa representa o valor do metabólito para a amostra do primeiro quartil, e o teto da caixa o valor encontrado na amostra no terceiro quartil, agrupando 50% dos dados. Dentro da caixa, uma linha horizontal simboliza a mediana. Acima e abaixo da caixa segue uma reta vertical, representando os valores até o máximo e o mínimo, respectivamente, de todas as amostras daquele grupo, até um limite estipulado de 1,5 vezes a altura da caixa. No caso de alguma (ou mais de uma) amostra ter apresentado valor discrepante, acima ou abaixo do valor estipulado para a reta, esta foi representada por um ponto (podendo corresponder a *outliers*), alinhado com a reta no eixo vertical, distante do segmento de acordo com a escala.

5.1 Caracterização da amostra

Foram incluídos no estudo 4 participantes com AR e 50 com OA do joelho, submetidos ao tratamento cirúrgico com ATJ e que aceitaram fornecer amostra de líquido sinovial para análise. A **Tabela 1** resume as características clínicas dos participantes do estudo.

Tabela 1. Dados demográficos dos pacientes incluídos no estudo

Variável		Osteoartrite (n= 50)	Artrite Reumatóide (n=4)	p valor
Sexo	Masculino	17 (34%)	2 (50%)	0,60 #
	Feminino	33 (66%)	2 (50%)	
Idade		67,96 ± 7,08	65,5 ± 9,95	0,51 *
Peso (kg)		84,07 ± 14,91	88,0 ± 17,66	0,61 *
Altura (m)		1,61 ± 0,1	1,65 ± 0,03	0,38 *
IMC (kg/m ²)		32,51 ± 5,25	32,10 ± 6,03	0,88 *
Obesidade	Normal	4 (8%)	0 (0%)	0,84 £
	Sobrepeso	12 (24%)	1 (25%)	
	Obeso	34 (68%)	3 (75%)	
Gravidade da OA	Ahlbäck III	3 (6%)	0 (0%)	0,55 £
	Ahlbäck IV	7 (14%)	1 (25%)	
	Ahlbäck V	40 (80%)	3 (75%)	
Lateralidade	Direito	22 (44%)	3 (75%)	0,32 £
	Esquerdo	28 (56%)	1 (25%)	
Hipertensão	Sim	44 (88%)	3 (75%)	0,43 #
	Não	6 (12%)	1 (25%)	
Diabetes	Sim	11 (22%)	1 (25%)	>0,99 #
	Não	39 (78%)	3 (75%)	
Dislipidemia	Sim	4 (8%)	0 (0%)	>0,99 #
	Não	46 (92%)	4 (100%)	
Cardiopatia	Sim	3 (6%)	1 (25%)	0,27 #
	Não	47 (94%)	3 (75%)	
Doença Renal	Sim	6 (12%)	1 (25%)	0,43 #
	Não	44 (88%)	3 (75%)	

Dados absolutos de idade, peso, altura e IMC apresentados sob a forma de média e desvio padrão. Demais dados apresentados em frequência absoluta e frequência relativa. * teste t não pareado; # teste exato de Fisher; £ teste do Qui-quadrado. OA: osteoartrite; IMC: índice de massa corporal.

5.2 Perfil metabólico do líquido sinovial na OA e na AR

Inicialmente, para verificar se o perfil metabólico do líquido sinovial seria capaz de distinguir pacientes com OA e com AR, foi realizada a análise do PCA. A análise demonstrou que não foi

possível distinguir os grupos de pacientes com OA e AR através do perfil metabólico (Figura 15 A). Também não foi demonstrado comportamento distinto de metabólitos específicos, mediante as análises multivariadas (Figura 15 B).

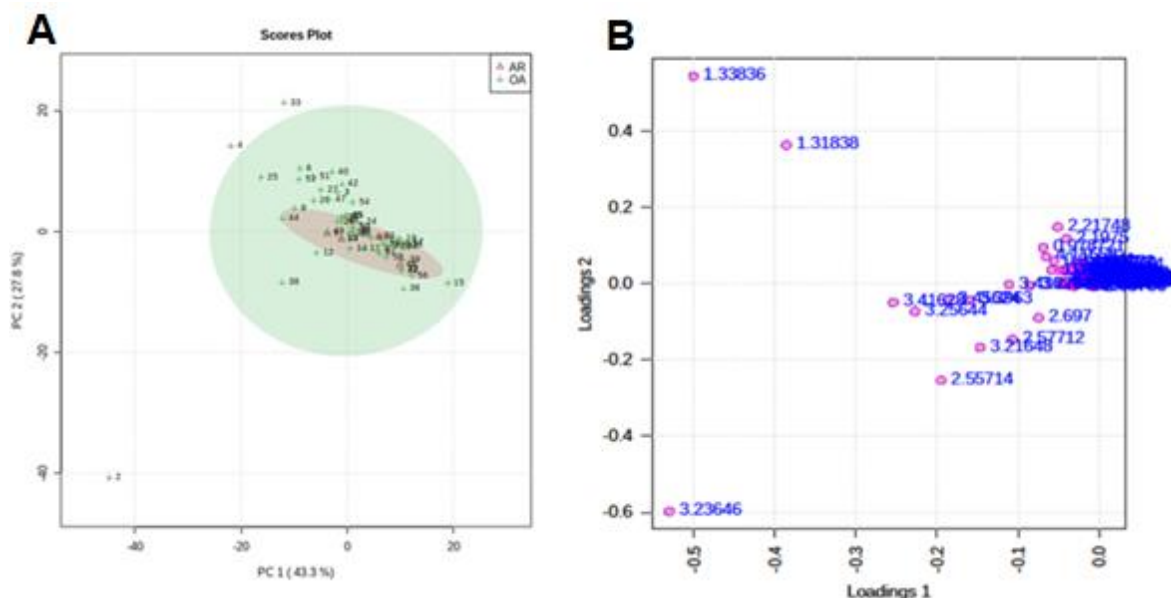


Figura 15. Discriminação dos pacientes com OA e AR pelo perfil metabólico. A análise *pelo Principal Component Analysis* dos grupos OA (diagrama verde) e AR (diagrama vermelho) através do perfil metabólico. (A) Score-Plot, de PC 2 versus PC 1, onde cada ponto corresponde a um paciente. A porcentagem entre parênteses significa que o PC1 consegue “explicar” 43,3% das variáveis, e o PC2 somente 27,8%. As elipses representam o intervalo de confiança de 95%. (B) Loading-Plot (fator de carga), demonstra vários pontos, onde cada ponto rosa corresponde a um metabólito, expresso pelo deslocamento químico, representando metabólitos específicos (sabe-se, por exemplo, que o bucket 1.338 representa o lactato). De acordo com a variabilidade global encontrada, alguns buckets (metabólitos) são mais relevantes na formação dos componentes principais e acabam se dispondo mais afastados do grupo. O *software metaboloanalysis* sinaliza quando uma determinada variável (metabólito), de acordo com seu valor, é estatisticamente capaz de discriminar os grupos. Neste gráfico acima (B), apesar de algumas variáveis apresentarem localização periférica, não foram estatisticamente capazes de discriminar os grupos.

Assim, em sequência, foram realizadas análises do líquido sinovial dos pacientes com OA, visando verificar se seria possível distinguir os pacientes com OA pelo perfil metabólico conforme a gravidade da osteoartrite, a idade, o sexo, o índice de massa corporal, a medida da glicemia de jejum e quanto à presença de comorbidades como hipertensão arterial, diabetes, cardiopatia, dislipidemia e doença renal.

5.3 Comparação pela gravidade da OA

Uma vez que a amostra foi composta apenas por pacientes submetidos ao tratamento cirúrgico da OA com artroplastia total do joelho, todos os pacientes possuíam gravidade da osteoartrite grau III ou superior, conforme a classificação de Ahlbäck. A análise por PCA não foi capaz de classificar os indivíduos de acordo com os graus III, IV e V de Ahlbäck, pelo perfil metabólico (Figura 16A), pois houve uma nítida interseção dos perfis metabólicos no *Score Plot*. Por sua vez, a análise univariada encontrou diferenças na concentração dos metabólitos L-valina ($p=0,06$; Figura 16B) e 3-hidroxibutirato ($p=0,039$; Figura 16C) entre os grupos.

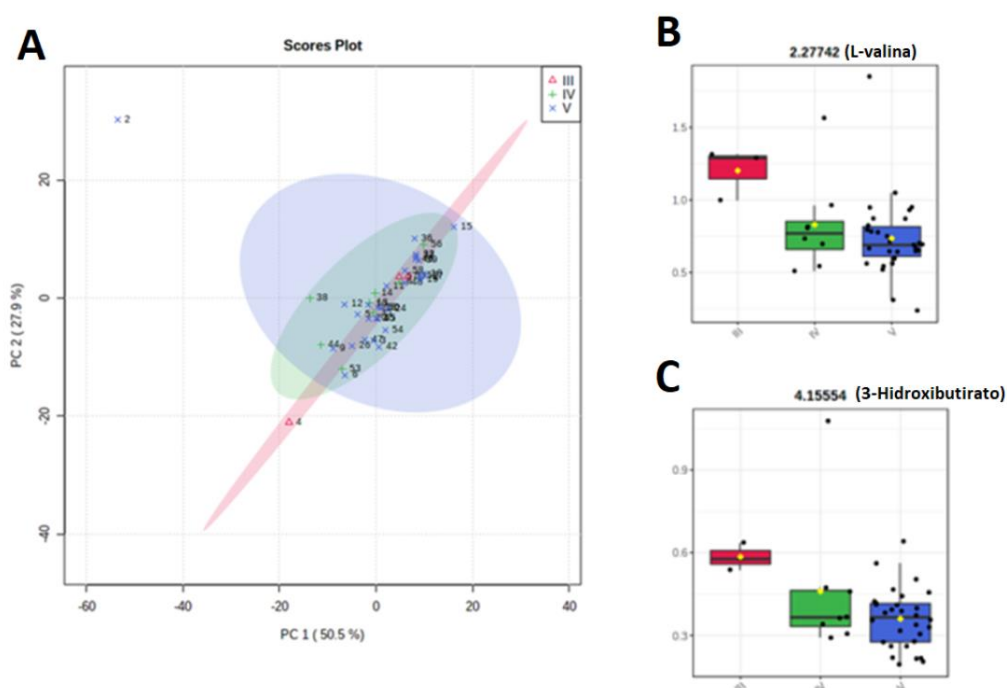


Figura 16. Discriminação dos pacientes de acordo com a gravidade da osteoartrite. (A) Gráfico da análise pelo PCA entre os três grupos: graus III (diagrama vermelho), IV (diagrama verde) e V (diagrama azul) conforme a classificação de Ahlbäck. O *Score-Plot*, de PC 2 versus PC 1, onde cada ponto corresponde a um paciente. A porcentagem entre parênteses significa que o PC1 consegue “explicar” 50,5% das variáveis, e o PC2 somente 27,9%. As elipses representam o intervalo de confiança de 95%. (B) *Box-plot* demonstrando diferenças na concentração do metabólito L-valina entre os três grupos. (C) *Box-plot* demonstrando diferenças na concentração do metabólito 3-hidroxibutirato entre os grupos.

5.4 Comparação por faixas etárias

A análise por PCA não foi capaz de classificar os indivíduos em subgrupos por idade, inferior ou igual a 70 anos e maior do que 70 anos, de acordo com o perfil metabólico (Figura 17), pois houve uma nítida superposição dos perfis metabólicos no *Score Plot*. A análise estatística com múltiplos testes t não evidenciou diferenças significativas entre os metabólitos nos dois grupos ($p>0,05$).



Figura 17. Discriminação dos pacientes de acordo com a idade. Gráfico da análise pelo PCA entre os dois grupos, abaixo de 70 anos (diagrama vermelho) e acima de 70 anos (diagrama verde). O *Score-Plot*, de PC 2 versus PC 1, onde cada ponto corresponde a um paciente. A porcentagem entre parênteses significa que o PC1 consegue “explicar” 43,3% das variáveis, e o PC2 somente 27,8%. As elipses representam o intervalo de confiança de 95%.

5.5 Comparação pelo sexo

A análise por PCA não foi capaz de classificar os indivíduos de acordo sexo, conforme o perfil metabólico (Figura 18), pois houve uma nítida interseção dos perfis metabólicos no *Score Plot*. A análise estatística com múltiplos testes t não evidenciou diferenças entre os grupos ($p>0,05$).

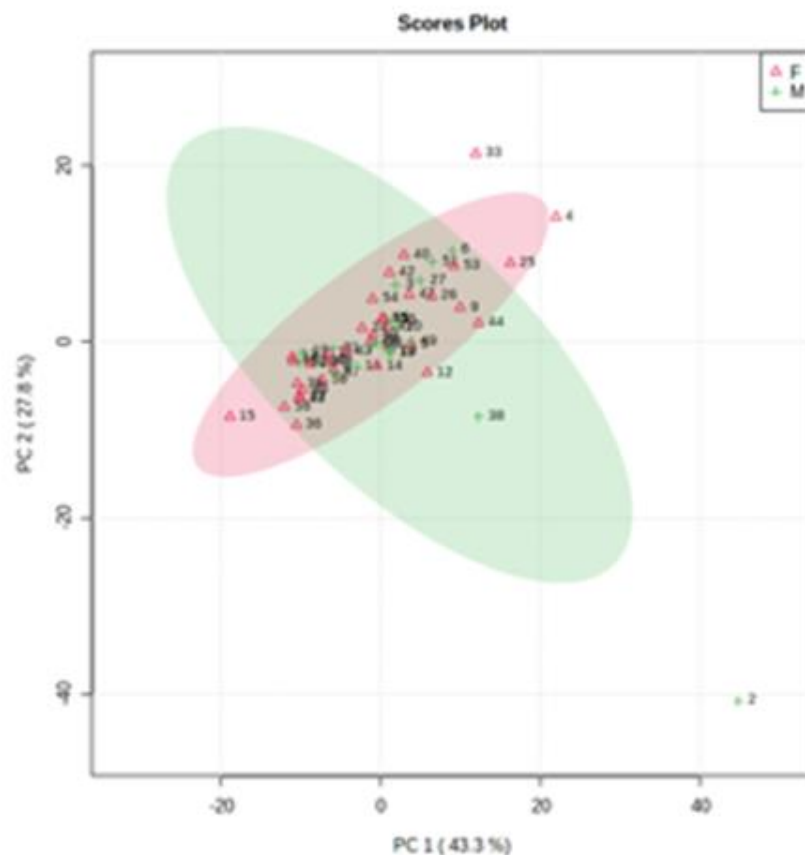


Figura 18. Discriminação dos pacientes por sexo. Gráfico da análise pelo PCA entre os dois grupos, sexo feminino (diagrama vermelho) e masculino (diagrama verde) pelo perfil metabólico. *Score-Plot*, de PC 2 versus PC 1, onde cada ponto corresponde a um paciente. A porcentagem entre parênteses significa que o PC1 consegue “explicar” 43,3% das variáveis, e o PC2 somente 27,8%. As elipses representam o intervalo de confiança de 95%.

5.6 Comparação pelo índice de massa corporal

A análise por PCA não foi capaz de classificar os indivíduos de acordo com o índice de massa corporal normal, sobrepeso e obeso conforme o perfil metabólico (Figura 19A), pois houve uma nítida interseção dos diagramas no *Score Plot*. A análise estatística com múltiplos testes t não evidenciou diferenças entre os grupos ($p > 0,05$). Já a análise univariada encontrou diferenças na concentração do metabólito D-glicose ($p = 0,037$; Figura 19B) entre os grupos.

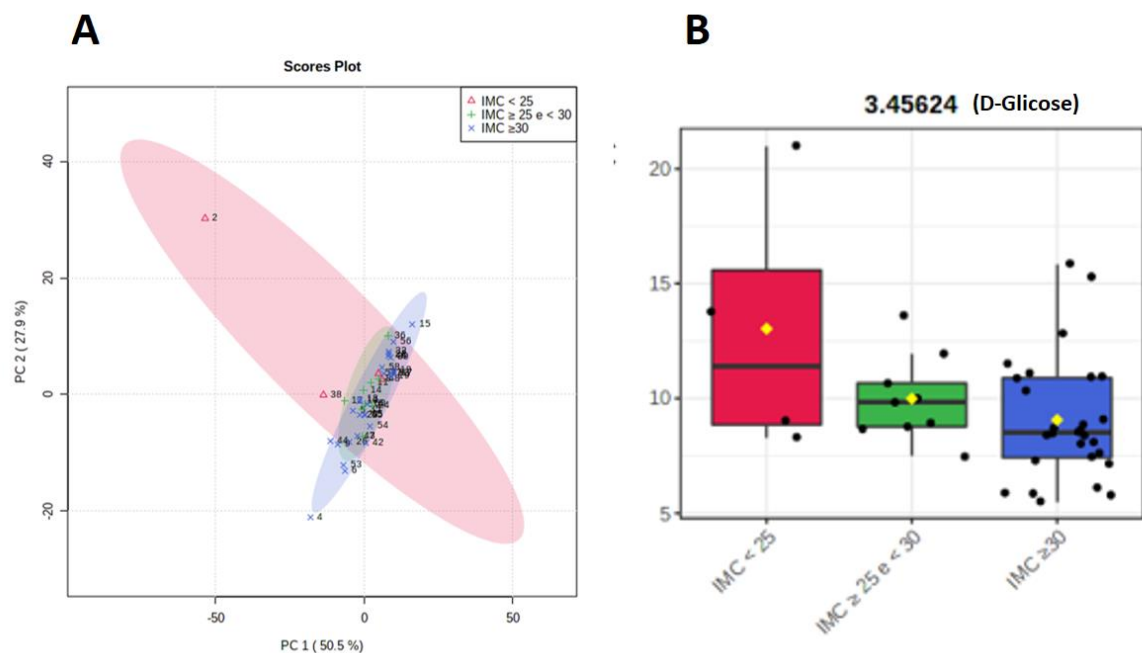


Figura 19. Discriminação dos pacientes de acordo com o índice de massa corporal. (A) Gráfico da análise pelo PCA entre os três grupos: IMC normal (diagrama vermelho), sobrepeso (diagrama verde) e obeso (diagrama azul). (A) *Score-Plot*, de PC 2 versus PC 1, onde cada ponto corresponde a um paciente. A porcentagem entre parênteses significa que o PC1 consegue “explicar” 50,5% das variáveis, e o PC2 somente 27,9%. As elipses representam o intervalo de confiança de 95%. e (B) *Box-plot* demonstrando diferenças na concentração do metabólito D-glicose entre os grupos.

5.7 Comparação pela glicemia de jejum

A análise por PCA não foi capaz de classificar os indivíduos de acordo com a medida da glicemia de jejum em normal, pré-diabetes e diabetes conforme o perfil metabólico (Figura 20), pois houve uma nítida interseção dos perfis metabólicos no *Score Plot*. A análise estatística com múltiplos testes t não evidenciou diferenças entre os grupos ($p > 0,05$).

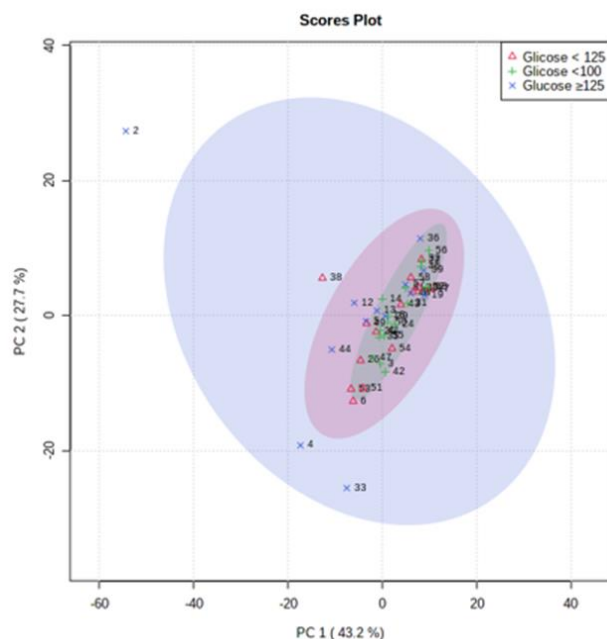


Figura 20. Discriminação dos pacientes de acordo com a glicemia de jejum. Gráfico da análise pelo PCA entre os três grupos: glicemia de jejum normal (diagrama verde), pré-diabetes (diagrama vermelho) e diabetes (diagrama azul) conforme o perfil metabólico. (A) *Score-Plot*, de PC 2 versus PC 1, onde cada ponto corresponde a um paciente.

5.8 Comparação pelo diagnóstico de hipertensão arterial

A análise por PCA não foi capaz de classificar os indivíduos de acordo com a presença ou ausência do diagnóstico de hipertensão, conforme o perfil metabólico (Figura 21A), pois houve uma nítida interseção dos perfis metabólicos no *Score Plot*. A análise estatística com múltiplos testes t não evidenciou diferenças entre os grupos ($p > 0,05$). Contudo, a análise univariada encontrou diferenças na concentração dos metabólitos L-valina ($p = 0,015$; Figura 21B), L-arginina ($p = 0,013$; Figura 21C) e citrato ($p = 0,026$; Figura 21D).

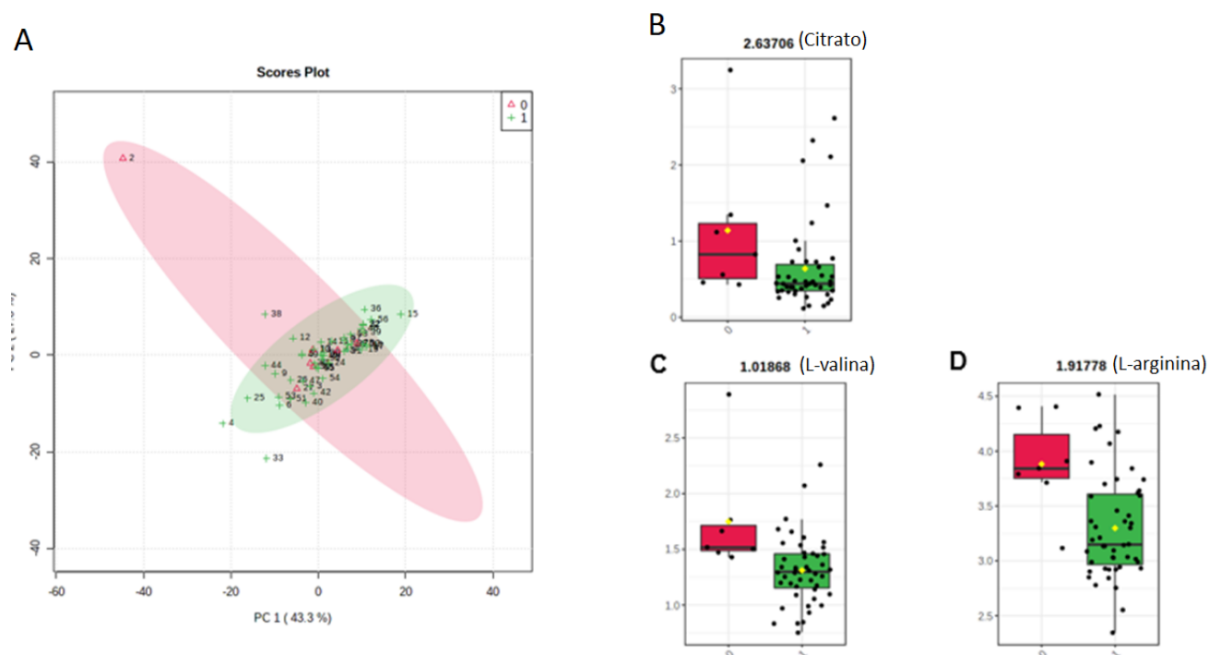


Figura 21. Discriminação dos pacientes pelo diagnóstico de hipertensão arterial. (A) Gráfico da análise pelo PCA entre os dois grupos: presença (diagrama verde) ou a ausência do diagnóstico de hipertensão arterial (diagrama vermelho). *Score-Plot*, de PC 2 versus PC 1, onde cada ponto corresponde a um paciente. A porcentagem entre parênteses significa que o PC1 consegue “explicar” 43,3% das variáveis, e o PC2 somente 27,8%. As elipses representam o intervalo de confiança de 95%. (B) *Box-plot* demonstrando diferença na concentração do metabólito citrato. (C) *Box-plot* demonstrando diferença na concentração do metabólito L-valina (D). *Box-plot* demonstrando diferença na concentração do metabólito L-arginina entre os grupos.

5.9 Comparação pelo diagnóstico de diabetes mellitus

A análise por PCA não foi capaz de classificar os indivíduos de acordo com a presença ou ausência do diagnóstico de diabetes mellitus, conforme o perfil metabólico (Figura 22), pois houve uma nítida interseção dos perfis metabólicos no *Score Plot*. A análise estatística com múltiplos testes t não evidenciou diferenças entre os grupos ($p > 0,05$).

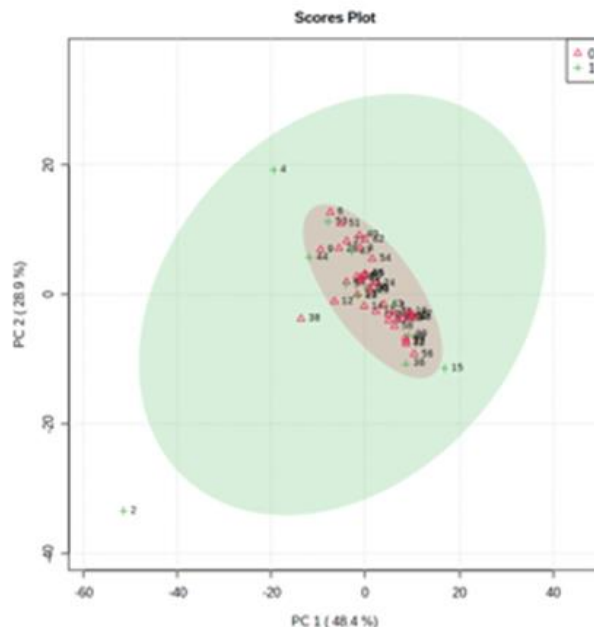


Figura 22. Discriminação dos pacientes pelo diagnóstico de *diabetes mellitus*. Gráfico da análise pelo PCA entre os dois grupos: presença (diagrama verde) ou ausência do diagnóstico de diabetes mellitus (diagrama vermelho). *Score-Plot*, de PC 2 versus PC 1, onde cada ponto corresponde a um paciente. A porcentagem entre parênteses significa que o PC1 consegue “explicar” 48,4% das variáveis, e o PC2 somente 28,9%. As elipses representam o intervalo de confiança de 95%.

5.10 Comparação pelo diagnóstico de dislipidemia

A análise por PCA não foi capaz de classificar os indivíduos de acordo com a presença ou a ausência do diagnóstico de dislipidemia, conforme o perfil metabólico (Figura 23), pois houve uma nítida sobreposição dos perfis metabólicos no *Score Plot*. A análise estatística com múltiplos testes *t* não evidenciou diferenças entre os grupos ($p > 0,05$).

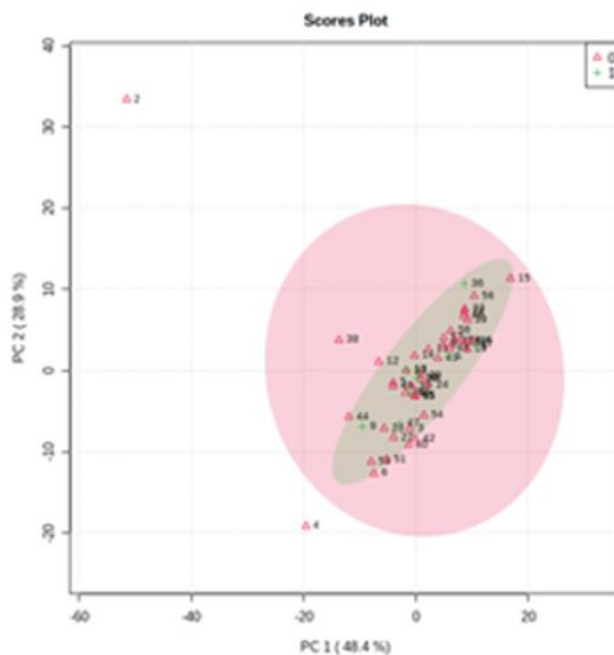


Figura 23. Discriminação dos pacientes pelo diagnóstico de dislipidemia. Gráfico da análise pelo PCA entre os dois grupos: presença (diagrama verde) ou ausência do diagnóstico de dislipidemia (diagrama vermelho). *Score-Plot*, de PC 2 versus PC 1, onde cada ponto corresponde a um paciente. A porcentagem entre parênteses significa que o PC1 consegue “explicar” 48,4% das variáveis, e o PC2 somente 28,9%. As elipses representam o intervalo de confiança de 95%.

5.11 Comparação pelo diagnóstico de cardiopatia

A análise por PCA não foi capaz de classificar os indivíduos de acordo com a presença ou a ausência do diagnóstico de cardiopatia, conforme o perfil metabólico (Figura 24), pois houve uma nítida sobreposição dos perfis metabólicos no *Score Plot*. A análise estatística com múltiplos testes t não evidenciou diferenças entre os grupos ($p > 0,05$).

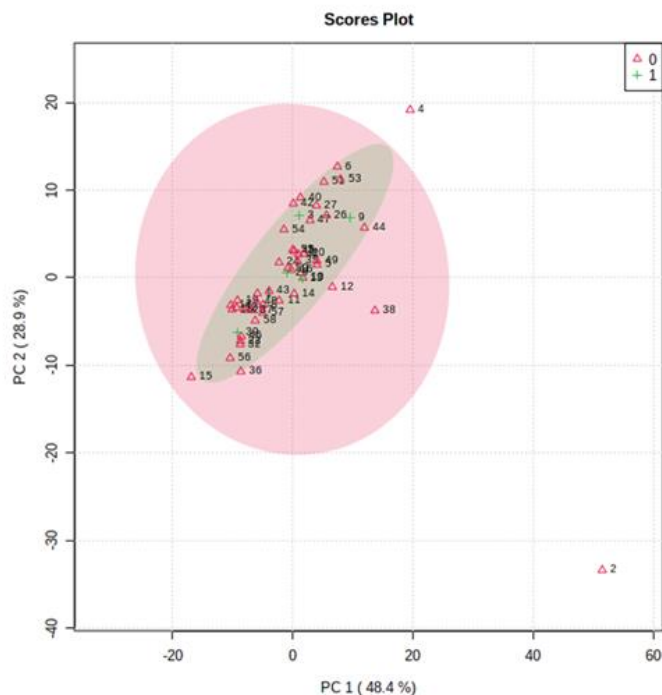


Figura 24. Discriminação dos pacientes pela presença de cardiopatia. Gráfico da análise pelo PCA entre os dois grupos: presença (diagrama verde) ou ausência do diagnóstico de cardiopatia (diagrama vermelho). *Score-Plot*, de PC 2 versus PC 1, onde cada ponto corresponde a um paciente. As elipses representam o intervalo de confiança de 95%.

5.12 Comparação pelo diagnóstico de doença renal crônica

A análise por PCA não foi capaz de classificar os indivíduos de acordo com a presença ou a ausência do diagnóstico de doença renal crônica, conforme o perfil metabólico (Figura 25A), pois houve uma nítida sobreposição dos perfis metabólicos no *Score Plot*. Já nas análises univariadas, os metabólitos 3-hidroxibutirato (Figura 25B), citrato (Figura 25C) e L-fenilalanina (Figura 25D) foram capazes de classificar os pacientes com OA em grupos com e sem doença renal crônica ($p < 0,0001$).

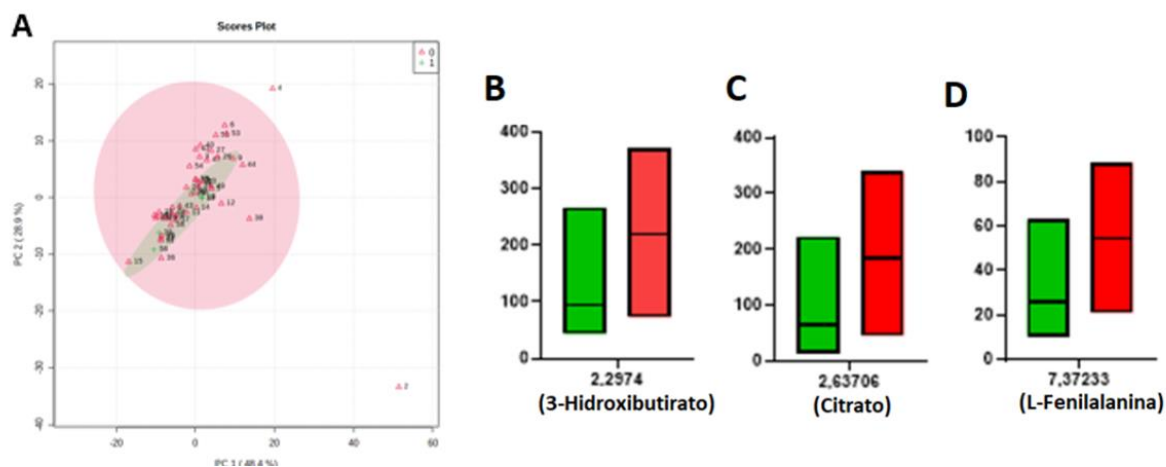


Figura 25. Discriminação dos pacientes pela presença de doença renal crônica. (A) Gráfico da análise pelo PCA entre os dois grupos: presença (diagrama verde) ou ausência do diagnóstico de doença renal crônica (diagrama vermelho). *Score-Plot*, de PC 2 versus PC 1, onde cada ponto corresponde a um paciente. A porcentagem entre parênteses significa que o PC1 consegue “explicar” 48,4% das variáveis, e o PC2 somente 28,9%. As elipses representam o intervalo de confiança de 95%. (B) *Box-plot* demonstrando diferença na concentração do metabólito 3-hidroxibutirato. (C) *Box-plot* demonstrando diferença na concentração do metabólito citrato. (D) *Box-plot* demonstrando diferença na concentração do metabólito L-fenilalanina.

A metabolômica do líquido sinovial tem sido apontada na literatura como ferramenta potencial para a identificação de biomarcadores relacionados com o desenvolvimento da doença (SOUSA et al., 2019). Nesse estudo, foram comparados o perfil metabólico do líquido sinovial de pacientes com AR e OA do joelho, ambos em estágios avançados de acometimento da articulação do joelho (classificação de Ahlbäck igual ou superior ao grau III), não sendo possível, entretanto, distinguir os grupos pela análise do perfil metabólico. Além disso, nos pacientes com osteoartrite foi realizada uma avaliação do perfil metabólico do líquido sinovial de acordo com características clínicas, radiográfica e laboratorial.

Em relação aos dados demográficos, o grupo OA apresentou uma maior proporção de indivíduos do sexo feminino (66%). Essa taxa mais elevada de ATJ nas mulheres já foi estabelecida em um grande estudo populacional (MAHOMED, et al., 2005) e reflete a maior prevalência de OA grave do joelho no sexo feminino (SRIKANTH, et al., 2005). A média de idade no grupo OA foi próximo de 68 anos e na AR foi de 65,5. Embora não tenhamos encontrado diferença estatisticamente significativa, há uma tendência de indicação mais precoce de ATJ em pacientes acometidos por AR (LEE & CHOI, 2012), uma vez que a deterioração articular nessa doença costuma ser mais precoce. Em outros estudos a média de idade encontrada foi semelhante à da presente pesquisa (REGINATO et al., 2015; LOMBNAES et al., 2017; DORAIS et al., 2018).

Para realizar a associação entre o metabolismo articular na OA com a obesidade, classificamos os indivíduos por meio do IMC (ABESO, 2016). Apesar de não termos subdividido a obesidade em graus, encontramos um percentual de 68% de obesos no grupo da OA, além de 24% com sobrepeso, o que representa uma grande parcela da amostra. Um estudo brasileiro, abordando a epidemiologia dos pacientes submetidos à ATJ, encontrou ao redor de 35% de pacientes com sobrepeso e por volta de 48% com obesidade (LOURES et al., 2020). Outros estudos também

demonstraram alta prevalência de sobrepeso e de obesidade, como o de Kantor e colaboradores (2014) (45% dos participantes com sobrepeso e 17% com obesidade), o de Reginato e colaboradores (2015) (41,3% com sobrepeso e 38,2% com obesidade) e o de Coimbra e colaboradores (2019) (46% dos pacientes com obesidade e 30% com sobrepeso). Todos estes trabalhos reforçam a relação estreita entre distúrbios do IMC e OA, e o nosso resultado encontrou prevalência ainda mais expressiva de obesos.

No quesito gravidade radiográfica, 80% dos pacientes com osteoartrite foram classificados como grau V, o último estágio da classificação de Ahlbäck. Não há um critério objetivo bem estabelecido para indicação de ATJ, mas as alterações radiográficas são um dos fatores mais relevantes, assim como a idade e o quadro clínico (GADEMAN et al., 2016). O índice elevado de indivíduos com OA radiográfica severa indica que o perfil de pacientes submetidos ao procedimento de ATJ no INTO é de uma população gravemente afetada pela doença.

Em relação às doenças associadas, a hipertensão arterial sistêmica (HAS) foi a mais prevalente, acometendo 88% do grupo OA. A seguir a obesidade, com 68% da amostra. A terceira condição mais frequente, com 22%, foi o diabetes mellitus (DM). A presença de doença renal crônica, de dislipidemia e de cardiopatia foram de, respectivamente, 12%, 8% e 6% dos pacientes com OA. Nosso resultado se aproxima com o de Loures e colaboradores (2020), os quais também encontraram a HAS como a comorbidade mais prevalente (ao redor de 65%), seguido pela obesidade e pelo DM (ao redor de 15%). A doença renal crônica não foi avaliada neste estudo, enquanto a dislipidemia e a cardiopatia foram relatadas em com pouco mais de 3% da amostra.

A maior prevalência de HAS entre indivíduos com OA corrobora a forte associação entre essas doenças, demonstrada em uma revisão recente (XIE et al., 2021). Os distúrbios presentes na síndrome metabólica também estão associados à OA. Porém, um trabalho encontrou que, com exceção para a HAS, estas associações desaparecem quando se faz o ajuste pelo IMC (NIU et al., 2017).

Em nosso estudo, encontramos uma baixa proporção de indivíduos diagnosticados com dislipidemia, com apenas 8% no grupo OA. Embora uma meta análise recente não tenha encontrado uma associação aumentada entre dislipidemia e OA (XIE et al., 2021), a prevalência encontrada em nosso trabalho está muito abaixo da descrita para a população desta faixa etária no Brasil (GARCEZ et al., 2014) e nos Estados Unidos (TOTH et al., 2012). Este achado pode indicar uma falha no critério utilizado em nossa pesquisa para a classificação de dislipidemia, já que não foi feita análise laboratorial (lipidograma), mas coletado do prontuário, a partir da entrevista pré-anestésica.

É intuitivo conceber que a doença renal crônica e a OA sejam doenças relacionadas, por fatores como a idade, comorbidades em comum e o abuso de medicamentos nefrotóxicos, como anti-inflamatórios não esteroides. Alguns estudos observacionais já demonstraram esta correlação (SINGH et al., 2002; REN et al., 2020). No entanto, não encontramos pesquisas abordando aspectos metabólicos entre essas doenças, que pudessem explorar algo além de uma simples correlação.

Nosso principal objetivo foi tentar identificar diferenças no perfil metabólico do líquido sinovial em pacientes com OA e com AR, mas não foi possível distinguir os grupos por meio da análise multivariada (PCA). Nosso resultado difere do estudo de Anderson e colaboradores (2018), que analisou o líquido sinovial de 14 pacientes com AR e de 10 com OA, mediante espectroscopia por ^1H RNM, e conseguiu discriminar os grupos na análise multivariada, além de identificar 32 metabólitos com concentrações significativamente distintas.

Uma possível razão para este achado conflitante é o pequeno número de amostras no grupo reumatoide que recrutamos em nossa pesquisa. Talvez este desequilíbrio no tamanho dos grupos (4 reumatoides e 50 de osteoartrite) possa ter comprometido a análise multivariada. O cálculo amostral na metabolômica global é difícil de ser estimado, em razão da complexidade dos experimentos e pelo caráter obscuro do efeito esperado (BLAISE et al., 2016). Assim, determinar com segurança o tamanho da amostra necessária é um desafio, e a maioria dos estudos utilizam métodos empíricos.

Em nosso trabalho, recrutamos o maior número de amostras disponíveis de pacientes reumatoides durante o período do estudo, mas a proporção de indivíduos com OA foi bastante superior.

Em relação ao tamanho da amostragem, outras pesquisas que compararam a metabolômica do líquido sinovial na OA e na AR dividiram esses grupos de forma mais simétrica, apesar de não recrutarem amostras grandes. Williamson e colaboradores (1989) compararam amostras de 18 indivíduos reumatoides com 10 de pacientes com OA. Outro estudo analisou 14 amostras de AR e 16 de OA (MESHITSUKA et al., 1999). Kang e colaboradores (2015) avaliaram 10 pacientes em cada um dos grupos. Já Wang e colaboradores (2020) analisaram 20 amostras de pacientes com AR e 10 de pacientes com OA.

Outro possível fator atribuível à discrepância com o estudo de Anderson é que o estudo britânico incluiu uma amostra global mais heterogênea, uma vez que comparou indivíduos reumatoides em estágios variáveis da doença (com tempo de tratamento da doença entre 0 e 35 anos) com pacientes em estágios avançados de OA. Já a nossa pesquisa contemplou, nos dois grupos, apenas participantes em estágios terminais de doença articular (candidatos a ATJ). Esta maior uniformidade no grau de doença articular pode ter influenciado e contribuído para a ausência de diferença em nossas análises.

Apesar da análise multivariada não supervisionada, PCA, não ter discriminado o grupo OA do grupo AR, o gráfico *loading plot* (gráfico de carga, em tradução livre) demonstrou os metabólitos que mais contribuíram na variabilidade encontrada para discriminar os dois grupos. Neste, os metabólitos que mais se destacam se dispõem mais afastados em relação aos demais. No gráfico de carga entre OA e AR, o lactato (bucket 1,338) foi um dos metabólitos mais realçados. A diferença na concentração do lactato no líquido sinovial era um dos resultados esperados, uma vez que alguns trabalhos já demonstraram maiores níveis de lactato na AR, em relação à OA, refletindo um estímulo ao metabolismo celular anaeróbico na AR (MESHITSUKA, et al., 1999; ANDERSON et al., 2018).

Contudo, a despeito do destaque no gráfico de carga, não encontramos diferença estatisticamente significativa nos níveis de lactato mediante a análise univariada.

Tentando explorar melhor nossa amostra robusta de pacientes com OA, a seguir, realizamos diversas análises neste grupo. Subdividimos os participantes de acordo com o grau de OA radiográfica, conforme a classificação de Ahlbäck modificada por Keyes (KEYES et al., 1992). Uma vez que a amostra foi composta apenas por pacientes submetidos a ATJ, todos os pacientes possuíam ao menos grau III, e a grande maioria (80%) foi classificada como grau V. Assim, dividimos em três grupos (grau III, IV e V), mas a análise multivariada não conseguiu demonstrar diferença no perfil metabólico entre esses grupos. Já a análise univariada, permitiu a identificação de alguns achados interessantes. O metabólito 3-hidroxibutirato, por exemplo, apresentou concentração distinta nos grupos. Mais do que isso, os níveis encontrados apresentaram variação inversamente proporcional ao grau de osteoartrite.

O hidroxibutirato é um corpo cetônico que funciona como substrato energético, principalmente em estados de baixa oferta de glicose (NEWMAN et al., 2014). Além do metabolismo energético, participa de mecanismos de sinalização celular (SHIMAZU et al., 2013). A redução no nível deste metabólito já foi demonstrada no líquido sinovial de indivíduos com OA em relação a articulações não comprometidas. Entretanto, além do estudo avaliar apenas amostras de cadáveres, esta pesquisa englobou um grupo heterogêneo de joelhos com OA (desde comprometimento unicompartimental moderado até grave acometimento tricompartmental) e não estratificou as amostras de acordo com a severidade da doença (MICKIEWICZ et al., 2015). Já o estudo de Anderson e colaboradores (2018) encontrou níveis mais elevados na OA em relação à AR, sugestivo de uma magnitude de perturbação energética ainda mais relevante na artrite reumatoide.

Outro metabólito que apresentou comportamento similar foi a L-valina, com níveis decrescentes em relação ao grau de OA, mas, embora próximo ao corte usualmente estipulado ($p < 0,05$), o teste ANOVA não foi estatisticamente significativo ($p = 0,06$). A razão nos níveis séricos

de valina pelo da histidina já foi proposta como marcador diagnóstico da OA (ZHAI et al., 2010). Infere-se que a elevação no nível sérico dos aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA, do inglês *branched chain amino acids*) esteja envolvida com o aumento da síntese de citocinas inflamatórias na OA (ZHANG et al., 2014). Já a alteração deste grupo de aminoácidos no líquido sinovial ainda não é bem estabelecida.

Em outra pesquisa, Kim e colaboradores (2017) compararam, mediante análise por espectrometria de massa, o líquido sinovial do joelho de pacientes com OA em estágios iniciais e em estágios avançados, conforme a classificação de Kellgren-Lawrence. Na análise por PCA não foi possível discriminar os dois grupos, mas na análise supervisionada conseguiram diferenciá-los. Além disso, identificaram alterações em 28 metabólitos (todos aumentados no grupo OA avançada), relacionados ao metabolismo lipídico, glicolipídico e do ciclo de Krebs, sugerindo uma atividade metabólica aberrante na OA avançada, associada à disfunção mitocondrial e a autofagia (KIM et al., 2017).

Com propósito semelhante, mas analisando o líquido sinovial do joelho de cadáveres, foi proposta uma evolução no perfil metabólico sinovial, a partir de dois subtipos de OA. Por intermédio do padrão dos metabólitos e das vias alteradas, os autores subclassificaram a OA em dois fenótipos (inflamatório e estrutural), que exibiram evoluções metabólicas distintas. O fenótipo inflamatório manifestou, em estágios iniciais, principalmente mediadores inflamatórios, como leucotrienos e butirato, enquanto, nos estágios finais, elevou os marcadores do metabolismo da glutathione, refletindo um estado de estresse oxidativo. Já o outro fenótipo exibiu um perfil metabólico predominantemente vinculado à degradação estrutural dos glicosaminoglicanos (CARLSON et al., 2019).

No intuito de investigar a influência do envelhecimento no comportamento metabólico da OA, dividimos os pacientes em idade até 70 ou acima de 70 anos, mas não foi possível discriminar os grupos pelo PCA. Escolhemos arbitrariamente 70 anos como corte, pois esta idade é apontada

como um bom parâmetro etário para a cirurgia proposta (LEE et al., 2020). Além do que, a média de idade da nossa amostra se aproximou desta marca. Assim como na idade, buscamos uma associação entre o metabolismo articular e o sexo, mas também não encontramos diferenças nas análises.

Em função da íntima relação entre obesidade e OA do joelho, testamos o perfil metabólico dos pacientes de acordo com o IMC. A análise multivariada não demonstrou diferenças no metabolismo do líquido sinovial entre os participantes com índice normal, com sobrepeso ou com obesidade. Este resultado nos surpreendeu, pois já foi demonstrada a existência de diferenças significativas no metabolismo sérico entre obesos e não obesos com OA do joelho. Tal discrepância pode ser pelo fato de Senol e colaboradores (2019) terem analisado amostras de sangue, e não do líquido sinovial. Foram identificados 15 metabólitos com comportamento diferente entre os grupos, principalmente relacionados ao metabolismo dos ácidos graxos e ao estresse oxidativo (SENOL et al., 2019). Por se tratar de uma doença sistêmica, é possível que o perfil de metabólitos no sangue de obesos e não obesos não seja equivalente ao do ambiente sinovial. Uma outra explicação plausível para o nosso resultado é a influência da subclassificação que utilizamos, no qual estratificamos em três grupos, em vez da comparação entre obesos e não obesos.

Ainda que a análise multivariada não tenha encontrado diferença, o comportamento da glicose foi distinto entre os grupos. Apesar do metabólito glicose não ser apontado diretamente como um biomarcador relacionado ao IMC, sabe-se que a elevação de metabólitos associados, como a manose, vinculam-se com o sobrepeso e com a obesidade (MOORE et al., 2014). De forma inesperada, nesta pesquisa a concentração da glicose foi inferior no grupo de obesos em relação ao grupo com IMC normal. Por este achado, é possível especular que, na articulação dos indivíduos obesos, ocorra um maior consumo de glicose pelas células sinoviais. Outra justificativa para esse achado é o número pequeno de participantes classificados como normais, o que pode ter interferido

na avaliação estatística, ou, simplesmente, a presença de um resultado aleatório, passível de ocorrer em um universo de múltiplas análises.

Tanto o experimento comparando o perfil metabólico do líquido sinovial entre pacientes com ou sem DM, como a comparação de acordo com o valor sérico da glicemia de jejum não encontraram diferenças nas análises multivariadas e univariadas. A relação entre DM e OA vem sendo muito pesquisada, e já foi sugerida a existência de um fenótipo de osteoartrite induzido pelo DM (BERENBAUM, 2012). Com esse objetivo, Zhang e colaboradores (2017) pesquisaram, mediante metabolômica alvo para metabólitos de produtos finais da glicação (AGEs), o soro e o líquido sinovial de pacientes com OA do joelho, incluindo diabéticos e não diabéticos. Não encontraram diferenças no soro, mas detectaram maiores níveis de metilglioxal, no líquido sinovial de pacientes com OA e diabetes.

Uma justificativa para nosso achado divergente é que, diferente da pesquisa de Zhang, utilizamos análise global por RNM, o que traz algumas vantagens, mas reduz a sensibilidade na detecção de moléculas em menor concentração (HAGGARTY & BURGESS, 2017). Outro fator que pode ter influenciado nosso resultado é que não foi considerado o uso de hipoglicemiantes ou de insulina, medicamentos que interferem diretamente no metabolismo da glicose. Além disso, a classificação em diabético ou não diabético foi determinada por autodeclaração na entrevista e não por métodos de diagnóstico laboratorial.

Na investigação do perfil metabólico entre pacientes com ou sem HAS, a análise multivariada não distinguiu os grupos. Entretanto, três metabólitos (valina, arginina e citrato) demonstraram níveis mais elevados nos indivíduos sem a doença vascular. A HAS parece contribuir na patogênese da OA por aspectos bioquímicos e biomecânicos, ao interferir na microcirculação articular, promovendo o aumento da vascularização sinovial e subcondral. Apesar do estímulo à angiogênese, a perfusão nestes tecidos é perturbada por um distúrbio na função vascular e no aumento da pressão óssea

subcondral, acarretando hipóxia local e prejuízo à drenagem sinovial, o que precipita a resposta inflamatória articular (CHING et al., 2021).

O citrato é um dos elementos constituintes do ciclo de Krebs, que ocorre na mitocôndria. O carregador mitocondrial de citrato participa da regulação inflamatória, ao transportar o citrato da mitocôndria para o citosol, onde é convertido em acetil-coenzima A e oxalacetato. O aumento da oferta de acetil-coenzima A suplementa a síntese de prostaglandinas, enquanto o oxalacetato produz NADPH (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo) e H^+ , elevando o óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio (INFANTINO et al., 2011). Em nossa análise, encontramos uma redução nos níveis do citrato nos pacientes com a associação de osteoartrite e hipertensão arterial. Este resultado, sugere um consumo deste substrato em favor destas vias inflamatórias na articulação destes indivíduos, corroborando com a hipótese de maior influência inflamatória na osteoartrite associada a esta doença crônica (CHING et al., 2021).

A valina também demonstrou menor concentração sinovial nos hipertensos. Os BCAA (valina, leucina e isoleucina) são aminoácidos essenciais que servem como blocos para a síntese proteica, presentes principalmente na musculatura esquelética, e são fundamentais no metabolismo energético celular. Além disso, os BCAA também interferem em mecanismos de sinalização celular (NIE et al., 2018). Apesar de poucas informações na literatura sobre o comportamento destes aminoácidos no líquido sinovial, o aumento destes elementos no sangue vem sendo relacionado com a obesidade, com a síndrome metabólica e com o aumento do risco de doença cardiovascular (SIDDIK & SHIN, 2019).

Zhai e colaboradores (2010) propuseram que a elevação da razão sérica leucina / histidina pode servir como biomarcador para o diagnóstico de OA do joelho e presumiram que este aumento esteja relacionado à degradação do colágeno. De maneira oposta, um estudo em ovinos demonstrou redução nos níveis séricos dos BCAA, após cirurgia de transecção do ligamento cruzado anterior (LCA), em comparação com controles (cirurgia simulada) (MAHER et al., 2012). É bem conhecida

a estreita relação entre ruptura do LCA e osteoartrite (LOHMANDER et al., 2007), o que permite inferir que a redução sérica no BCAA possa estar presente nos estágios iniciais da doença. Já uma análise de cultura de células sinoviais de indivíduos com e sem OA não revelou diferenças nos níveis de BCAA nos meios de cultura dos grupos, mas observou uma redução nos produtos catabólicos derivados dos BCAA nos tecidos com OA avançada, sugerindo uma alteração no metabolismo deste grupo de AA com a progressão de OA (ADAMS et al., 2012).

Talvez a perturbação no metabolismo dos BCAA seja uma das rotas metabólicas que ajudem a explicar a associação entre obesidade, síndrome metabólica e OA. A elevação sérica dos BCAA promove o estresse oxidativo e polariza as células mononucleares periféricas em um estado pró-inflamatório, mediante a ativação da via Akt-mTOR (ZHENYUKH et al., 2017). O sensor energético mTORC1 (alvo mamífero do complexo 1 de rapamicina, do inglês *mammalian target of rapamycin complex 1*) integra a sinalização de diversas fontes, como a disponibilidade de nutrientes, regulando o metabolismo celular em favor de uma atividade anabólica e inibindo a autofagia. A autofagia é um processo particularmente importante nos condrócitos, pois estes possuem uma baixa taxa de proliferação, necessitando deste mecanismo para renovar moléculas celulares, reduzir o estresse oxidativo e evitar a evolução para apoptose (LOTZ & CARAMÉS, 2011). O desequilíbrio nas vias AMPK (proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina, do inglês *adenosine monophosphate-activated protein kinase*) e mTORC1 parece um mecanismo chave na manutenção de um estado pró-inflamatório das células articulares na OA (DICKSON et al., 2019).

A arginina foi o outro metabólito que expressou aumento no grupo sem HAS, comparado com o subgrupo de hipertensos da OA. A arginina é classificada como um AA semi-essencial, uma vez que em algumas condições (gestação, lactação, infecções, estresse térmico) a taxa de consumo deste substrato supera a capacidade de produção no organismo. Este AA atua como precursor de diversas moléculas importantes, como a uréia, a creatina, a ornitina, a prolina, a glutamina, a citrulina e o óxido nítrico. A maior proporção de arginina no organismo é metabolizada pela via da arginina

/ glicina aminotransferase, originando guanidinoacetato (precursor da creatina) e a ornitina. Uma outra via conhecida, vinculada à resposta imunológica, é a conversão em citrulina e óxido nítrico, pela enzima óxido nítrico sintase (MORRIS, 2006; LI & ZHANG, 2016).

O papel da concentração sérica de arginina no sangue de pacientes com OA ainda precisa ser elucidado. Zhang e colaboradores (2016) apontaram a redução sérica da arginina como um possível biomarcador de OA avançada. Além disso, encontraram níveis maiores de ornitina sérica no grupo OA, enquanto não houve diferença nos níveis de citrulina. Estes resultados induzem o raciocínio de que a depleção da arginina advém de uma hiperativação da via da ornitina, que, por sua vez, é um precursor da prolina, importante na produção de colágeno. Assim, os autores inferiram que a redução da arginina sérica se origina de um aumento compensatório na síntese de colágeno na OA grave (ZHANG et al., 2016).

Em contrapartida, outra pesquisa demonstrou o aumento dos níveis séricos de arginina em pacientes com OA severa (submetidos à artroplastia total do joelho e do quadril), comparado com o soro de pessoas saudáveis. Os pesquisadores deduziram que o aumento da arginina decorra da inibição da enzima óxido nítrico sintase, pela dimetilarginina assimétrica (ADMA), reduzindo os níveis de óxido nítrico. Os autores ainda salientaram o papel controverso do óxido nítrico na patogênese da OA (TOOTSI et al., 2020).

Ainda neste tema, Pascale e colaboradores (2013) investigaram o comportamento da arginina no sangue e no líquido sinovial, buscando entender o papel da via do óxido nítrico na OA. Mediante metabolômica alvo, demonstraram uma redução na arginina sérica nos pacientes com OA em relação a pessoas saudáveis, enquanto não houve diferença nos níveis de ADMA. No líquido sinovial dos indivíduos com OA, tanto a arginina como a ADMA apresentaram maior concentração do que no sangue. Uma das explicações sugerida pelos pesquisadores foi a de uma eventual migração da arginina sérica para o líquido sinovial, para antagonizar o aumento de ADMA sinovial (PASCALE et al., 2013).

A redução na concentração sinovial de alguns metabólitos nos pacientes com OA e doença hipertensiva (em comparação com os indivíduos sem HAS) poderia ser justificada por uma perturbação na drenagem sinovial, decorrente do comprometimento vascular nesta condição. Por esta hipótese, a manutenção destes substratos por mais tempo no ambiente articular elevaria as suas taxas de metabolização, o que reduziria as concentrações destes, mas aumentaria os níveis dos seus subprodutos. Para esclarecer essa suposição levantada, seria necessária uma análise com métodos de maior precisão, com capacidade de detectar moléculas em menor concentração (como a espectrometria de massa, preferencialmente alvo direcionada), buscando a quantificação destes metabólitos e dos seus respectivos produtos metabólicos. Permanece obscuro o porquê de apenas alguns metabólitos terem apresentado esse comportamento.

Quanto a avaliação do perfil metabólico do líquido sinovial nos pacientes classificados como com ou sem cardiopatia, não encontramos diferenças nas análises. Contudo, o diagnóstico de cardiopatia foi baseado na avaliação pré-anestésica, e apenas 6% da amostra foi classificada como portadora deste grupo de doenças.

Existem poucos trabalhos abordando a relação entre a doença renal crônica e a OA. Já foi relatado, por exemplo, que a doença renal crônica está relacionada com o aumento da dor no joelho, após ATJ, em indivíduos com OA do joelho (CHIO et al., 2020). No entanto, pouco se sabe sobre as repercussões metabólicas da doença renal na OA. Com esta finalidade, analisamos o perfil metabólico dos grupos com e sem doença renal, mas novamente a análise multivariada não foi capaz de diferenciar os grupos. Porém, os doentes renais apresentaram menores concentrações de 3-hidroxibutirato, de citrato e de fenilalanina.

A fenilalanina é um AA essencial, fundamental para a síntese da tirosina, e a razão tirosina / fenilamina sinaliza esta metabolização. Embora desconhecido o comportamento no líquido sinovial, os níveis de fenilamina no plasma são elevados na doença renal crônica, enquanto a tirosina diminui, reduzindo a razão tirosina / fenilalanina (JIA et al., 2008; LEE et al., 2020). De forma contraditória,

nossa análise demonstrou, no líquido sinovial, uma redução nos índices de fenilalanina nos pacientes renais crônicos, ao passo que a tirosina não expressou diferença entre os grupos, indicando um aumento na razão tirosina / fenilalanina no grupo com doença renal.

Já o citrato é um ânion orgânico, que, por sua molécula conter três grupos carboxilas, apresenta um potencial alcalinizante. Assim, a retenção do citrato, através da reabsorção no túbulo proximal, é um dos mecanismos utilizados pelo rim para conter a acidose metabólica (MADIAS, 1995). A redução do citrato no líquido sinovial dos indivíduos com doença renal poderia ser justificada por uma possível migração do ambiente articular para o soro, para atuar no equilíbrio do pH. Apesar de contraditórios, os achados de significativas variações nas concentrações de alguns metabólitos entre pacientes com osteoartrite portadores ou não de doença renal suscita o aprofundamento no tema, já que há pouca informação disponível na literatura.

Um dos pontos fortes do nosso estudo foi o número de amostras de líquido sinovial de pacientes com OA. Pelo que encontramos na revisão bibliográfica, apenas uma pesquisa analisou, com este propósito, um grupo tão extenso de amostras do líquido sinovial de pessoas vivas com osteoartrite do joelho (MICKIEWICZ et al., 2015). O estudo de Zhang e colaboradores contemplou 80 pacientes com osteoartrite, mas incluiu amostras do joelho e do quadril (ZHANG et al., 2014). Outra pesquisa englobou 75 amostras de líquido articular do joelho, dos quais 6 eram saudáveis, 14 OA inicial e 55 OA severa, mas todas as amostras foram retiradas de cadáveres (CARLSON et al., 2019). Um outro trabalho recente também superou nosso número de participantes, com 100 amostras do joelho, mas o propósito da pesquisa foi a correlação entre metabólitos no sangue e no líquido sinovial (XU et al., 2021).

Outro ponto positivo da pesquisa foi a menor variabilidade em relação ao grau de doença articular, comparando pacientes, nos dois grupos, com estágios avançados de destruição articular. Uma das grandes dificuldades na metabolômica da AR é a ampla variabilidade em diversos aspectos

da doença, desde fatores como a idade, a severidade da doença, até o tipo de medicação utilizada. Tentamos reduzir algumas destas variáveis, adotando critérios de exclusão mais rigorosos.

Como ponto fraco, por sua vez, podemos indicar o pequeno tamanho da amostra de pacientes com AR, o que limitou realizarmos as mesmas comparações feitas com o grupo de pacientes com osteoartrite. Uma explicação para isso é o menor número de pacientes reumatóides aguardando o procedimento de ATJ no INTO, em relação àqueles com OA. Além disso, em alguns dos pacientes com AR, selecionados para o estudo, não havia líquido sinovial suficiente para a realização das análises, sendo, assim, excluídos.

Outra limitação do nosso trabalho foi a classificação de algumas condições clínicas (principalmente a dislipidemia e a cardiopatia) baseada em dados do prontuário. Essa informação foi obtida da ficha padrão de avaliação pré-anestésica, a qual é identificada a presença ou a ausência de cada uma destas condições clínicas avaliadas. É provável que doenças mais comuns e com boa aderência ao tratamento na atenção básica, como a HAS e o DM, sejam, na maioria das vezes, de conhecimento dos pacientes e, possivelmente, autodeclaradas na consulta com o anestesista. A doença renal crônica, por outro lado, é muitas vezes desconhecida pelos doentes, principalmente nos estágios iniciais, mas na avaliação pré-anestésica do INTO o nível de função renal é usualmente estimado pela avaliação laboratorial, e o anestesista assinala no prontuário a presença ou ausência de doença renal de acordo com esta estimativa.

A metabolômica por RNM não foi capaz de discriminar os pacientes com OA e com AR de acordo com o perfil metabólico do líquido sinovial, tampouco conseguiu identificar metabólitos específicos com comportamento distinto entre essas as duas doenças.

No grupo OA, ao relacionar com aspectos clínicos, laboratorial ou radiográfico, não encontramos diferenças nas análises multivariadas. Apesar disto, encontramos menores valores de arginina, valina e citrato no subgrupo de pacientes hipertensos. Os metabólitos 3-hidroxibutirato e L-valina, apresentaram níveis decrescente em função da gravidade radiográfica, e a glicose apresentou menor concentração nos obesos. Nos indivíduos com doença renal crônica, observamos menores dosagens do citrato, da fenilalanina e do 3-hidroxibutirato. Todos estes achados podem refletir comportamentos metabólicos ainda não explorados, despertando a atenção para associações pouco estudadas no contexto da OA e estimulam o aprofundamento no tema.

ABESO. Associação brasileira para o estudo da obesidade e da síndrome metabólica. **Diretrizes brasileiras de obesidade**. São Paulo, 2016.

ADAMS, J.R., SAMUEL, B.; SETTON, L. A.; NETTLES, D. L. The role of metabolomics in osteoarthritis research. **The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, v. 21, n. 1, p. 63, jan. 2013.

AHLBÄCK, S.; RYDBERG, J. Röntgenologisk klassifikation och undersökningsteknik vid gonartros [X-ray classification and examination technics in gonarthrosis]. **Lakartidningen**, v. 77, n. 22, p. 2091-2096, mai. 1980.

AKHBARI, P. et al. Can joint fluid metabolic profiling (or —metabonomics) reveal biomarkers for osteoarthritis and inflammatory joint disease? A systematic review. **Bone & Joint Research**, v. 9, n. 3, p. 108-119, mar. 2020.

ALETAHA, D. et al. 2010. rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. **Arthritis & rheumatism**, v. 62, n. 9, p. 2569-2581, ago. 2010.

ALTMAN, R. et al. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis: classification of osteoarthritis of the knee. **Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology**, v. 29, n. 8, p. 1039-1049, ago. 1986.

ALTMAN, R.; BEDI, A.; MANJOO, A.; NIAZI, F.; SHAW, P.; MEASE, P. Anti-Inflammatory Effects of Intra-Articular Hyaluronic Acid: A Systematic Review. **Cartilage**, v. 10, n. 1, p. 43–52, jan. 2019.

ANDERSON, J. R.; CHOKESUWATTANASKUL, S.; PHELAN, M. M.; WELTING, T. J. M.; LIAN, L. Y.; PEFFERS, M. J.; WRIGHT, H. L. 1H NMR metabolomics identifies underlying inflammatory pathology in osteoarthritis and rheumatoid arthritis synovial joints. **Journal of proteome research**, v. 17, n. 11, p. 3780-3790, set. 2018.

ANGELOTTI, F. et al. One year in review 2017: pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Clin Exp Rheumatol**, v. 35, n. 3, p. 368-78, jun. 2017.

ARDEN, N. K.; PERRY, T. A.; BANNURU, R. R.; BRUYÈRE, O.; COOPER, C.; HAUGEN, I. K.; HOCHBERG, M. C.; MCALINDON, T. E.; MOBASHERI, A.; REGINSTER, J. Y. Non-surgical management of knee osteoarthritis: comparison of ESCEO and OARSI 2019 guidelines. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 17, n. 1, p. 59-66, jan. 2021.

AREND, W. P.; FIRESTEIN, G. S. Pre-rheumatoid arthritis: predisposition and transition to clinical synovitis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 8, n. 10, p. 573-586, ago. 2012.

ATUKORALA, I.; KWOH, C. K.; GUERMAZI, A.; ROEMER, F. W.; BOUDREAU, R. M.; HANNON, M. J.; HUNTER, D. J. Synovitis in knee osteoarthritis: a precursor of disease?. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 75, n. 2, p. 390-395, fev. 2016.

- AYRAL, X.; PICKERING, E. H.; WOODWORTH, T. G.; MACKILLOP, N.; DOUGADOS, M. Synovitis: a potential predictive factor of structural progression of medial tibiofemoral knee osteoarthritis—results of a 1 year longitudinal arthroscopic study in 422 patients. **Osteoarthritis and cartilage**, v. 13, n. 5, p. 361-367, mai. 2005.
- BARLAND, P.; NOVIKOFF, A. B.; HAMERMAN, D. Electron microscopy of the human synovial membrane. **The Journal of cell biology**, v. 14, n. 2, p. 207–220, ago. 1962.
- BARTOK, B.; FIRESTEIN, G. S. Fibroblast- like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. **Immunological reviews**, v. 233, n. 1, p. 233-255, jan. 2010.
- BERENBAUM, F. Diabetes-induced osteoarthritis: from a new paradigm to a new phenotype. **Postgraduate medical journal**, v. 88, n. 1038, p. 240-242, mar. 2012.
- BERENBAUM, F. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). **Osteoarthritis and cartilage**, v. 21, n. 1, p. 16-21, jan. 2013.
- BHATTARAM, P.; CHANDRASEKHARAN, U. The joint synovium: A critical determinant of articular cartilage fate in inflammatory joint diseases. **Seminars in Cell & Developmental Biology. Academic Press**, v. 62, p. 86-93, fev. 2017.
- BIERMA-ZEINSTRAS, S. M.; VERHAGEN, A. P. Osteoarthritis subpopulations and implications for clinical trial design. **Arthritis research & therapy**, v. 13, n. 2, p. 213-221, abr. 2011.
- BIERMA-ZEINSTRAS, S. M.; MIDDELKOOP, V. M. In search of phenotypes. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 13, n. 12, p. 705-706, nov. 2017.
- BLANCO, F. J.; VALDES, A. M.; REGO-PÉREZ, I. Mitochondrial DNA variation and the pathogenesis of osteoarthritis phenotypes. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 14, n. 6, p. 327-340, abr. 2018.
- BLAISE, B. J. et al. Power analysis and sample size determination in metabolic phenotyping. **Analytical chemistry**, v. 88, n. 10, p. 5179-5188, mai. 2016.
- BLANEY DAVIDSON, E. N. et al. Elevated extracellular matrix production and degradation upon bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) stimulation point toward a role for BMP-2 in cartilage repair and remodeling. **Arthritis research & therapy**, v. 9, n. 5, p. 1-11, out. 2007.
- BLEKHERMAN, G.; LAUBENBACHER, R.; CORTES, D. F.; MENDES, P.; TORTI, F. M.; AKMAN, S.; TORTI, S. V.; SHULAEV, V. Bioinformatics tools for cancer metabolomics. **Metabolomics**, v. 7, n. 3, p. 329-343, jan. 2011.
- BOTTINI, N.; FIRESTEIN, G. S. Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 9, n. 1, p. 24- 33, jan. 2013.
- BRAUN, H. J.; GOLD, G. E. Diagnosis of osteoarthritis: imaging. **Bone**, v. 51, n. 2, p. 278-288, ago. 2012.

BUCKWALTER, J. A.; MOW, V. C.; RATCLIFFE, A. Restoration of injured or degenerated articular cartilage. **JAAOS-Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, v. 2, n. 4, p. 192-201, jul. 1994.

BUSTAMANTE, M. F.; GARCIA-CARBONELL, R.; WHISENANT, K. D.; GUMA, M. Fibroblast-like synoviocyte metabolism in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Arthritis research & therapy**, v. 19, n. 1, p. 110-121, mai. 2017.

CAIRNS, R. A.; HARRIS, I. S.; MAK, T. W. Regulation of cancer cell metabolism. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 2, p. 85-95, jan. 2011.

CARLO JR, M. D.; LOESER, R. F. Increased oxidative stress with aging reduces chondrocyte survival: correlation with intracellular glutathione levels. **Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology**, v. 48, n. 12, p. 3419-3430, dez. 2003.

CARLSON, A. K.; RAWLE, R. A.; WALLACE, C. W.; BROOKS, E. G.; ADAMS, E.; GREENWOOD, M. C.; OLMER, M.; LOTZ, M. K.; BOTHNER, B.; JUNE, R. K. Characterization of synovial fluid metabolomic phenotypes of cartilage morphological changes associated with osteoarthritis. **Osteoarthritis and cartilage**, v. 27, n. 8, p. 1174-1184, ago. 2019.

CHARLESWORTH, J. et al. Osteoarthritis-a systematic review of long-term safety implications for osteoarthritis of the knee. **BMC musculoskeletal disorders**, v. 20, n. 1, p. 1-12, abr. 2019.

CHING, K.; HOUARD, X.; BERENBAUM, F.; WEN, C. Hypertension meets osteoarthritis—Revisiting the vascular aetiology hypothesis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 17, n. 9, p. 533-549, jul. 2021.

COIMBRA, I. B.; PLAPLER, P. G.; CAMPOS, G. C. Generating evidence and understanding the treatment of osteoarthritis in Brazil: a study through Delphi methodology. **Clinics**, v. 74, mai. 2019.

COOPER, C.; SNOW, S.; MCALINDON, T. E.; KELLINGRAY, S.; SUART, B.; COGGON, D.; DIEPPE, P. A. Risk factors for the incidence and progression of radiographic knee osteoarthritis. **Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology**, v. 43, n. 5, p. 995-1000, mai. 2000.

COURTIES, A.; GUALILLO, O.; BERENBAUM, F.; SELLAM, J. Metabolic stress-induced joint inflammation and osteoarthritis. **Osteoarthritis and cartilage**, v. 23, n. 11, p. 1955-1965, nov. 2015.

DE BARI, C. Are mesenchymal stem cells in rheumatoid arthritis the good or bad guys?. **Arthritis research & therapy**, v. 17, n. 1, p. 113-121, maio 2015.

DEL REY, M. J.; VALÍN, A.; USATEGUI, A.; GARCÍA-HERRERO, C. M.; SÁNCHEZ-ARAGÓ, M.; CUEZVA, J. M.; GALINDO, M.; BRAVO, B.; CAÑETE, J. D.; BLANCO, F. J.; CRIADO, G.; PABLOS, J. L. Hif-1 α knockdown reduces glycolytic metabolism and induces cell death of human synovial fibroblasts under normoxic conditions. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-10, jun. 2017.

DELMONICO M. J.; HARRIS, T. B.; VISSER, M. et al. Longitudinal study of muscle strength, quality, and adipose tissue infiltration. **The American journal of clinical nutrition**, v. 90, n. 6, p. 1579-1585, out. 2009.

DEVEZA, L. A.; LOESER, R. F. Is osteoarthritis one disease or a collection of many?. **Rheumatology**, v. 57, n. s4, p. iv34-iv42, mai. 2018.

DEVEZA, L.; MELO, L.; YAMATO, T. P.; MILLS, K.; RAVI, V.; HUNTER, D. J. Knee osteoarthritis phenotypes and their relevance for outcomes: a systematic review. **Osteoarthritis and cartilage**, v. 25, n. 12, p. 1926-1941, abr. 2017.

DICKSON, B. M.; ROELOFS, A.; ROCHFORD, J. J.; WILSON, H. M.; DE BARI, C. The burden of metabolic syndrome on osteoarthritic joints. **Arthritis research & therapy**, v. 21, n. 1, p. 1-10, dez. 2019.

DORAIS, M. et al. Impact of oral osteoarthritis therapy usage among other risk factors on knee replacement: a nested case-control study using the Osteoarthritis Initiative cohort. **Arthritis research & therapy**, v. 20, n. 1, p. 1-11, ago. 2018.

DOWTHWAITE, G. P.; BISHOP, J. C.; REDMAN, S. N.; KHAN, I. M.; ROONEY, P.; EVANS, D. J.; HAUGHTON, L.; BAYRAM, Z.; BOYER, S.; THOMSON, B.; WOLFE, M. S.; ARCHER, C. W. The surface of articular cartilage contains a progenitor cell population. **Journal of cell science**, v. 117, n. 6, p. 889-897, fev. 2004.

DREIER, R. Hypertrophic differentiation of chondrocytes in osteoarthritis: the developmental aspect of degenerative joint disorders. **Arthritis research & therapy**, v. 12, n. 5, p. 1-11, set. 2010.

DUNN, W.; BROADHURST, D.; ATHERTON, H. J.; GOODACRE, R.; GRIFFIN, J. L. Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Chemical society reviews**, v. 40, n. 1, p. 387-426, ago. 2011.

EDWARDS, J. C. Fibroblast biology. Development and differentiation of synovial fibroblasts in arthritis. **Arthritis research**, v. 2, n. 5, p. 344-347, jun. 2000.

ELSHABRAWY, H. A.; CHEN, Z.; VOLIN, M. V.; RAVELLA, S.; VIRUPANNAVAR, S.; SHAHRARA, S. The pathogenic role of angiogenesis in rheumatoid arthritis. **Angiogenesis**, v. 18, n. 4, p. 433-448, out. 2015.

EUCEDA, L. R.; GISKEØDEGÅRD, G. F.; BATHEN, T. F. Preprocessing of NMR metabolomics data. **Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation**, v. 75, n. 3, p. 193-203, mar. 2015.

EYRE, D. R. Collagens and cartilage matrix homeostasis. **Clinical orthopaedics and related research**, n. 427, p. 118-122, out. 2004.

FAVERO, M.; GOLDRING, M. B.; GOLDRING, S. R.; PUNZI, L. Early knee osteoarthritis. **RMD open**, v. 1, n. Suppl 1, p. e000062, ago. 2015.

FAVERO, M. et al. Infrapatellar fat pad features in osteoarthritis: a histopathological and molecular study. **Rheumatology**, v. 56, n. 10, p. 1784-1793, jul. 2017.

FELSON, D. T. The course of osteoarthritis and factors that affect it. **Rheumatic diseases clinics of North America**, v. 19, n. 3, p. 607-615, ago. 1993.

FITZPATRICK, M.; YOUNG, S. P. Metabolomics—a novel window into inflammatory disease. **Swiss medical weekly**, v. 143, p. w13743, jan. 2013.

FOX, A. J.; BEDI, A.; RODEO, S. A.; The basic science of human knee menisci: structure, composition, and function. **Sports Health**, v. 4, n. 4, p. 340-351, jul. 2012.

FROST, H. M. From Wolff's law to the Utah paradigm: insights about bone physiology and its clinical applications. **The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists**, v. 262, n. 4, p. 398-419, mar. 2001.

GABER, T.; DZIURLA, R.; TRIPMACHER, R.; BURMESTER, G.; BUTTGEREIT, F. Hypoxia inducible factor (HIF) in rheumatology: low O₂! See what HIF can do!. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 64, n. 7, p. 971-980, mar. 2005.

GADEMAN, M. G. J. et al. Indication criteria for total hip or knee arthroplasty in osteoarthritis: a state-of-the-science overview. **BMC musculoskeletal disorders**, v. 17, n. 1, p. 1-11, nov. 2016.

GARCIA-CARBONELL, R.; DIVAKARUNI, A. S.; LODI, A.; SUAREZ, I. V.; SAHA, A.; CHEROUTRE, H.; BOSS, G. R.; TIZIANI, S.; MURPHY, A. N.; GUMA, M. Critical role of fibroblast-like synoviocytes glycolytic metabolism in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheumatology**, v. 68, n. 7, p. 1614-26, jul. 2016.

GARCEZ, M. R. et al. Prevalence of dyslipidemia according to the nutritional status in a representative sample of São Paulo. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 103, p. 476-484, 2014.

GARSTANG, S. V.; STITIK, T. P. Osteoarthritis: epidemiology, risk factors, and pathophysiology. **American journal of physical medicine & rehabilitation**, v. 85, n. 11, p.S2-S11, nov. 2006.

GATENBY, R. A.; GILLIES, R. J. Why do cancers have high aerobic glycolysis?. **Nature reviews cancer**, v. 4, n. 11, p. 891-899, nov. 2004.

GOLDRING, M. B.; GOLDRING, S. R. Osteoarthritis. **Journal of cellular physiology**, v. 213, n. 3, p. 626-634, dez. 2007.

GOLDRING, M. B.; MARCU, K. B. Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. **Arthritis research & therapy**, v. 11, n. 3, p. 1-16, mai. 2009.

GOLDRING, M. B.; OTERO, M. Inflammation in osteoarthritis. **Current opinion in rheumatology**, v. 23, n. 5, p. 471, fev. 2011.

GOLDRING, S. R.; GOLDRING, M. B. Biology of the normal joint. In: FIRESTEIN, G. S. **Kelley's Textbook of Rheumatology**. Filadélfia: Elsevier, 2013. Cap. 1, p. 01-19.

GOLDRING, S. R.; GOLDRING, M. B. Changes in the osteochondral unit during osteoarthritis: structure, function and cartilage–bone crosstalk. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 12, n. 11, p. 632-644, set. 2016.

GOWDA, G. A. N.; ZHANG, S.; GU, H.; ASIAGO, V.; SHANAIAH, N.; RAFTERY, D. Metabolomics-based methods for early disease diagnostics. **Expert review of molecular diagnostics**, v. 8, n. 5, p. 617-633, set. 2008.

GRÄSSEL, S.; MUSCHTER, D. Recent advances in the treatment of osteoarthritis. **F1000Research**, v. 9, mai. 2020.

GREGERSEN, P. K.; SILVER, J.; WINCHESTER, R. J. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology**, v. 30, n. 11, p. 1205-1213, nov. 1987.

GUMA, M.; TIZIANI, S.; FIRESTEIN, G. S. Metabolomics in rheumatic diseases: desperately seeking biomarkers. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 12, n. 5, p. 269, mar. 2016.

GUPTA, L.; AHMED, S.; JAIN, A.; MISRA, R. Emerging role of metabolomics in rheumatology. **International journal of rheumatic diseases**, v. 21, n. 8, p. 1468-1477, ago. 2018.

HAGGARTY, J.; BURGESS, K. E. V. Recent advances in liquid and gas chromatography methodology for extending coverage of the metabolome. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 43, p. 77-85, fev. 2017.

HARDINGHAM, T. E.; FOSANG, A. J. Proteoglycans: many forms and many functions. **The FASEB journal**, v. 6, n. 3, p. 861-870, fev. 1992.

HUANG, P.; WANG, C.-J.; CHOU, W.-Y.; WANG, J. W.; KO, J. Y. Short-term clinical results of intra-articular PRP injections for early osteoarthritis of the knee. **International Journal of Surgery**, v. 42, p. 117-122, jun. 2017.

HUI, A. Y.; MCCARTY, W. J.; MASUDA, K.; FIRESTEIN, G. S.; SAH, R. L. A systems biology approach to synovial joint lubrication in health, injury, and disease. Wiley interdisciplinary reviews. **Systems biology and medicine**, v. 4, n. 1, p. 15–37, jan. 2012.

HUNTER, D. J.; BIERMA-ZEINSTRA, S. Osteoarthritis. **The Lancet**, v. 393, n. 10182, p. 1745-1759, abr. 2019.

IKEDA, T. et al. The combination of SOX5, SOX6, and SOX9 (the SOX trio) provides signals sufficient for induction of permanent cartilage. **Arthritis & Rheumatism**, v. 50, n. 11, p. 3561-3573, nov. 2004.

INFANTINO, V. et al. The mitochondrial citrate carrier: a new player in inflammation. **Biochemical Journal**, v. 438, n. 3, p. 433-436, ago. 2011.

IWANAGA, T.; SHIKICHI, M.; KITAMURA, H.; YANASE, H.; NOZAWA-INOUE, K. Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint. **Archives of histology and cytology**, v. 63, n.1, p. 17–31, mar. 2000.

JAGGARD, M. K. J.; BOULANGÉ, C. L.; GRAÇA, G.; VAGHELA, U.; AKHBARI, P.; BHATTACHARYA, R.; WILLIAMS, H. R. T.; LINDON, J. C.; GUPTE, C. M. Can metabolic profiling provide a new description of osteoarthritis and enable a personalised medicine approach?. **Clinical Rheumatology**, v. 39, p. 3875-3882, fev. 2020.

JAMES, S. L. et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **Lancet**, v. 392, n. 10159, p. 1789–1858, nov. 2018.

JOHNSON, K.; SVENSSON, C. I.; VAN ET TEN, D.; GHOSH, S. S.; MURPHY, A. N.; POWELL, H. C.; TERKELTAUB, R. Mediation of spontaneous knee osteoarthritis by progressive chondrocyte ATP depletion in Hartley guinea pigs. **Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology**, v. 50, n. 4, p. 1216-1225, abr. 2004.

KANG, K. Y.; LEE, S. H.; JUNG, S. M.; PARK, S. H.; JUNG, B. H.; JU, J. H. Downregulation of tryptophan-related metabolomic profile in rheumatoid arthritis synovial fluid. **The Journal of rheumatology**, v. 42, n. 11, p. 2003-2011, nov. 2015.

KANTOR, E. D. et al. Associations between glucosamine and chondroitin supplement use and biomarkers of systemic inflammation. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 20, n. 6, p. 479-485, jun. 2014.

KAPOOR, M.; MARTEL-PELLETIER, J.; LAJEUNESSE, D.; PELLETIER, J. P.; FAHMI, H. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 7, n. 1, p. 33-42, jan. 2011.

KATTA, J.; PAWASKAR, S. S.; JIN, Z. M.; INGHAM, E.; FISHER, J. Effect of load variation on the friction properties of articular cartilage. **Journal of Engineering Tribology**, v. 221, n. 3, p.175-181, março 2007.

KAUR, J. A comprehensive review on metabolic syndrome. **Cardiology research and practice**, v. 2014, n. 943162, mar. 2014; Retraction in: *Cardiology research and practice*, v. 2019, n. 4301528, jan. 2019.

KEENAN, O. J.; HOLLAND, G.; MAEMPEL, J. F.; KEATING, J. F.; SCOTT, C. E. Correlations between radiological classification systems and confirmed cartilage loss in severe knee osteoarthritis. **The bone & joint journal**, v. 102, n. 3, p. 301-309, fev. 2020.

KELLGREN, J. H.; LAWRENCE, J. S. Radiological assessment of osteo-arthritis. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 16, n. 4, p. 494-592, dez. 1957.

KEYES, G. W.; CARR, A. J.; MILLER, R. K.; GOODFELLOW, J. W. The radiographic

classification of medial gonarthrosis. Correlation with operation methods in 200 knees. **Acta orthopaedica Scandinavica**, v. 63, n. 5, p. 497-501, out. 1992.

KHAN, I.M.; REDMAN, S.N.; WILLIAMS, R.; DOWTHWAITE, G.P.; OLDFIELD, S.F.; ARCHER, C.W. The development of synovial joints. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 79, p. 1-36, 2007.

KHURANA, R.; BERNEY, S. M. Clinical aspects of rheumatoid arthritis. **Pathophysiology**, v. 12, n. 3, p. 153-165, out. 2005.

KIANI, C.; CHEN, L.; WU, Y. J.; YEE, A. J.; YANG, B. B. Structure and function of aggrecan. **Cell research**, v. 12, n. 1, p. 19–32, mar. 2002.

KIM, S.; HWANG, J.; XUAN, J.; JUNG, Y. H.; CHA, H. S.; KIM, K. H. Global metabolite profiling of synovial fluid for the specific diagnosis of rheumatoid arthritis from other inflammatory arthritis. **PloS one**, v. 9, n. 6, p. e97501, jun.2014.

KIM, S.; HWANG, J.; KIM, J.; AHN, J. K.; CHA, H. S.; KIM, K. H. Metabolite profiles of synovial fluid change with the radiographic severity of knee osteoarthritis. **Joint Bone Spine**, v. 84, n. 5, p. 605-610, out. 2017.

KNUDSON, C. B.; KNUDSON, W. Hyaluronan and CD44: modulators of chondrocyte metabolism. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 427, p. S152-S162, out. 2004.

LAGO, F.; DIEGUEZ, C.; GÓMEZ-REINO, J.; GUALILLO, O. The emerging role of adipokines as mediators of inflammation and immune responses. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 18, n. 3-4, p. 313-325, jun. 2007.

LEE, D. M.; KIENER, H. P.; AGARWAL, S.K.; NOSS, E. H.; WATTS, G. F.; CHISAKA, O.; TAKEICHI, M.; BRENNER, M. B. Cadherin-11 in synovial lining formation and pathology in arthritis. **Science**. 2007 Feb 16;315(5814):1006-10, fev. 2007.

LEE, J.K.; CHOI, C.H. Total knee arthroplasty in rheumatoid arthritis. **Knee Surg Relat Res**, v. 24, n. 1, p. 1-6, mar. 2012

LEE, R. B.; URBAN, J. P. G. Evidence for a negative Pasteur effect in articular cartilage. **Biochemical Journal**, v. 321, n. 1, p. 95-102, jan. 1997.

LEE, S. H.; KIM, D. H.; LEE, Y. S. Is there an optimal age for total knee arthroplasty?: A systematic review. **Knee surgery & related research**, v. 32, n. 1, p. 1-11, nov. 2020.

LEE, S. J.; JEONG, J. H.; LEE, C. H.; AHN, B. C.; EUN, J. S.; KIM, N. R.; KANG, J. W.; NAM, E. J.; KANG, Y. M. Development and validation of an 18f- fluorodeoxyglucose–positron emission tomography with computed tomography–based tool for the evaluation of joint counts and disease activity in patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatology**, v. 71, n. 8, p. 1232-1240, fev. 2019.

LEES, D.; PARTINGTON, P. Articular cartilage. **Orthopaedics and Trauma**, v. 30, n. 3, p. 265-272, jun. 2016.

LEVICK, J. R. An analysis of the interaction between interstitial plasma protein, interstitial flow, and fenestral filtration and its application to synovium. **Microvascular research**, v. 47, n. 1, p. 90-125, mar. 1994.

LEVICK, J.R.; MCDONALD, J. N. Fluid movement across synovium in healthy joints: role of synovial fluid macromolecules. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 54, n.5, p. 417–423, maio 1995.

LEVICK, J. R.; MICHEL, C. C. Microvascular fluid exchange and the revised Starling principle. **Cardiovascular research**, v. 87, n. 2, p. 198–210, jul. 2010.

LI, C.; CHEN, B.; FANG, Z.; LENG, Y.; WANG, D.; CHEN, F.; XU, X.; SUN, Z.. Metabolomics in the development and progression of rheumatoid arthritis: A systematic review. **Joint Bone Spine**, v. 87, n. 5, p. 425-430, out. 2020.

LI, Z.; ZHANG, H. Reprogramming of glucose, fatty acid and amino acid metabolism for cancer progression. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 2, p. 377-392, out. 2016.

LOESER, R. F.; GOLDRING, S. R.; SCANZELLO, C. R.; GOLDRING, M. B. Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. **Arthritis and rheumatism**, v. 64, n. 6, p. 1697-1707, jun. 2012.

LOESER, R. F.; GANDHI, U.; LONG, D. L.; YIN, W.; CHUBINSKAYA, S. Aging and oxidative stress reduce the response of human articular chondrocytes to insulin- like growth factor 1 and osteogenic protein 1. **Arthritis & Rheumatology**, v. 66, n. 8, p. 2201-2209, mar. 2014.

LOESER, R. F. Integrins and chondrocyte–matrix interactions in articular cartilage. **Matrix Biology**, v. 39, p. 11-16, out. 2014.

LOESER, R. F. The role of aging in the development of osteoarthritis. **Transactions of the American Clinical and Climatological Association**, v. 128, p. 44, jan. 2017.

LOHMANDER, L. S. et al. The long-term consequence of anterior cruciate ligament and meniscus injuries: osteoarthritis. **The American journal of sports medicine**, v. 35, n. 10, p. 1756-1769, out. 2007.

LOMBNAES, G. O. et al. Distribution of osteoarthritis in a Norwegian population-based cohort: associations to risk factor profiles and health-related quality of life. **Rheumatology international**, v. 37, n. 9, p. 1541-1550, abr. 2017.

LÓPEZ-OTÍN, C.; BLASCO, M. A.; PARTRIDGE, L.; SERRANO, M.; KROEMER, G. The hallmarks of aging. **Cell**, v. 153, n. 6, p. 1194-1217, jun. 2013.

LOPES, E. B. P.; FILIBERTI, A.; HUSAIN, S. A.; HUMPHREY, M. B. Immune Contributions to Osteoarthritis. **Current osteoporosis reports**, v. 15, n. 6, p. 593-600, dez. 2017.

LORENZO, P.; BAYLISS, M. T.; HEINEGÅRD, D. Altered patterns and synthesis of extracellular matrix macromolecules in early osteoarthritis. **Matrix Biology**, v. 23, n. 6, p. 381-391, out. 2004.

LORIES, R. J.; LUYTEN, F. P. The bone–cartilage unit in osteoarthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 7, n. 1, p. 43-49, dez. 2011.

LOTZ, M. K.; CARAMES, B. Autophagy and cartilage homeostasis mechanisms in joint health, aging and OA. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 7, n. 10, p. 579-587, ago. 2011.

LOURES, F. B.; GÓES, R. F. A.; GUSMÃO, C. V.; ALBUQUERQUE, R. S. A. Perfil epidemiológico e clínico dos pacientes submetidos a artroplastia total do joelho. **Revista Brasileira de Ortopedia**, mar. 2021.

LUDWIG, T. E.; MCALLISTER, J. R.; LUN, V.; WILEY, J. P.; SCHMIDT, T. A. Diminished cartilage-lubricating ability of human osteoarthritic synovial fluid deficient in proteoglycan 4: Restoration through proteoglycan 4 supplementation. **Arthritis and rheumatism**, v. 64, n. 12, p. 3963–3971, dez. 2012.

MADSEN, R.; LUNDSTEDT, T.; TRYGG, J. Chemometrics in metabolomics—a review in human disease diagnosis. **Analytica chimica acta**, v. 659, n. 1-2, p. 23-33, fev. 2010.

MAHER, A. D.; COLES, C.; WHITE, J.; BATEMAN, J. F.; FULLER, E. S.; BURKHARDT, D.; LITTLE, C. B.; CAKE, M.; READ, R.; MCDONAGH, M. B.; ROCHFORD, S. J. 1H NMR spectroscopy of serum reveals unique metabolic fingerprints associated with subtypes of surgically induced osteoarthritis in sheep. **Journal of proteome research**, v. 11, n. 8, p. 4261-4268, ago. 2012.

MAHOMED, N. N.; BARRETT, J.; KATZ, J. N.; BARON, J. A.; WRIGHT, J.; LOSINA, E. Epidemiology of total knee replacement in the United States Medicare population. **J Bone Joint Surg Am**, v. 87, n. 6, p. 1222-1228, jun. 2005

MANEIRO, E.; MARTÍN, M. A.; ANDRES, M. C.; LÓPEZ-ARMADA, M. J.; FERNÁNDEZ-SUEIRO, J. L.; HOYO, P.; GALDO, F.; ARENAS, J.; BLANCO, F. J. Mitochondrial respiratory activity is altered in osteoarthritic human articular chondrocytes. **Arthritis & Rheumatism**, v. 48, n. 3, p. 700-708, fev. 2003.

MARSHALL, K. W.; DAMYANOVICH, A. Z.; STAPLES, R. J. A comparative study of deproteinized human synovial fluid in early and late stage osteoarthritis using 500 MHz 1H-NMR spectroscopy. In: 46th **Annual Meeting, Orthopaedic Research Society**, Orlando, Florida, p. 12-15, mar. 2000.

MARTEL-PELLETIER, J.; BARR, A.; CICUTTINI, F.; CONAGHAN, P. G.; COOPER, C.; GOLDRING, M. B.; GOLDRING, S. R.; JONES, G.; TEICHTAHL, A. J.; PELLETIER, J. P. Osteoarthritis. **Nature reviews. Disease primers**, v. 2, n. 16072, p. 1-18, out. 2016.

MATSUI, T.; NAKATA, N.; NAGAI, S.; NAKATANI, A.; TAKAHASHI, M.; MOMOSE, T.; OHTOMO, K.; KAYASU, S. Inflammatory cytokines and hypoxia contribute to 18F-FDG uptake by cells involved in pannus formation in rheumatoid arthritis. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 50, n. 6, p. 920-926, jun. 2009.

MCINNES, I. B.; SCHETT, G. Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis. **The Lancet**, v. 389, n. 10086, p. 2328-2337, jun. 2017.

MEDINA-LUNA, D. et al. Hyperlipidemic microenvironment conditionates damage mechanisms in human chondrocytes by oxidative stress. **Lipids in health and disease**, v. 16, n. 1, p. 1-8, jun. 2017.

MESHITSUKA, S.; YAMAZAKI, E.; INOUE, M.; HAGINO, H.; TESHIMA, R.; YAMAMOTO, K. Nuclear magnetic resonance studies of synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **Clinica chimica acta**, v. 281, n. 1-2, p. 163-167, mar. 1999.

MICHEL, C. C. Starling: the formulation of his hypothesis of microvascular fluid exchange and its significance after 100 years. **Experimental Physiology: Translation and Integration**, v. 82, n. 1, p. 1-30, ago. 1997.

MICKIEWICZ, B.; KELLY, J. J.; LUDWIG, T. E.; WELJIE, A. M.; WILEY, J. P.; SCHMIDT, T. A.; VOGEL, H. J. Metabolic analysis of knee synovial fluid as a potential diagnostic approach for osteoarthritis. **Journal of Orthopaedic Research®**, v. 33, n. 11, p. 1631-1638, mai. 2015.

MILLER, M. C. et al. Membrane type 1 matrix metalloproteinase is a crucial promoter of synovial invasion in human rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology**, v. 60, n. 3, p. 686-697, fev. 2009.

MILZ, S.; PUTZ, R. Quantitative morphology of the subchondral plate of the tibial plateau. **Journal of anatomy**, v. 185, n. Pt 1, p. 103-110, ago. 1994.

MISRA, B. B.; VAN DER HOOFT, J. J. Updates in metabolomics tools and resources: 2014–2015. **Electrophoresis**, v. 37, n. 1, p. 86-110, jan. 2016.

MOBASHERI, Ali et al. Recent advances in understanding the phenotypes of osteoarthritis. **F1000Research**, v. 8, n. 2091, p. 1-11, dez. 2019.

MOORE, S. C. et al. Human metabolic correlates of body mass index. **Metabolomics**, v. 10, n. 2, p. 259-269, ago. 2014.

MORRIS, S. M. Jr. Arginine: beyond protein. **The American journal of clinical nutrition**, v. 83, n. 2, p. 508S-512S, fev. 2006.

MURRAY, C. et al. The state of US health, 1990-2010: burden of diseases, injuries, and risk factors. **Jama**, v. 310, n. 6, p. 591-606, ago. 2013.

MURRAY, P. J. Macrophage Polarization. **Annual review of physiology**, v. 79, p. 541–566, fev. 2017.

MYASOEDOVA, E.; DAVIS, J.; MATTESON, E. L.; CROWSON, C. S. Is the

epidemiology of rheumatoid arthritis changing? Results from a population-based incidence study, 1985–2014. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 79, n. 4, p. 440-444, fev. 2020.

NEOGI T. The epidemiology and impact of pain in osteoarthritis. **Osteoarthritis and cartilage**, v. 21, n. 9, p. 1145–1153, set. 2013.

NEWMAN, J. C.; VERDIN, E. β -hydroxybutyrate: much more than a metabolite. **Diabetes research and clinical practice**, v. 106, n. 2, p. 173-181, nov. 2014.

NGO S.T.; STEYN, F. J.; MCCOMBE, P. A. Gender differences in autoimmune disease. **Frontiers neuroendocrinology**, v. 35, n. 3, p. 347-369, ago. 2014.

NIE, C.; HE, T.; ZHANG, W.; ZHANG, G.; MA, X. Branched chain amino acids: beyond nutrition metabolism. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 4, p. 954, abr. 2018.

NIU, J. et al. Metabolic syndrome, its components, and knee osteoarthritis: the Framingham Osteoarthritis Study. **Arthritis & Rheumatology**, v. 69, n. 6, p. 1194-1203, mar. 2017.

NYGAARD, G.; FIRESTEIN, G. S. Restoring synovial homeostasis in rheumatoid arthritis by targeting fibroblast-like synoviocytes. **Nature reviews. Rheumatology**, v. 16, n. 6, p. 316–333, jun. 2020.

OEGEMA, T. R. Jr.; THOMPSON, R. C. Metabolism of chondrocytes derived from normal and osteoarthritic human cartilage. In: KUETTNER K, editor. **Articular cartilage biochemistry**. New York: Raven Press; 1986. p. 257–71

OO, W. M.; YU, S.P.; DANIEL, M. S.; HUNTER, D. J. Disease-modifying drugs in osteoarthritis: current understanding and future therapeutics. **Expert opinion on emerging drugs**, v. 23, n. 4, p. 331-347, nov. 2018.

ORLOWSKY, E. W.; KRAUS, V. B. The role of innate immunity in osteoarthritis: when our first line of defense goes on the offensive. **The Journal of rheumatology**, v. 42, n. 3, p. 363-371, mar. 2015.

PASCALE, V. et al. L-arginine, asymmetric dimethylarginine, and symmetric dimethylarginine in plasma and synovial fluid of patients with knee osteoarthritis. **Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research**, v. 19, p. 1057, nov. 2013.

PASCUAL, E.; JOVANÍ, V. Synovial fluid analysis. Best practice & research. **Clinical rheumatology**, v. 19, n. 3, p. 371–386, jun. 2005.

PATTI, G. J.; YANES, O.; SIUZDAK, G. Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 13, n. 4, p. 263-269, mar. 2012.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introduction to Spectroscopy**. 4^a ed. Belmont, California: Brooks/Cole, Cengage Learning, 2009. p. 105-176.

PEARLE, A. D.; WARREN, R. F.; RODEO, S.A. Basic science of articular cartilage and osteoarthritis. **Clinics in Sports Medicine**, v. 24, n. 1, p. 1-12, jan. 2005.

PEPPA, M.; VLASSARA, H. Advanced glycation end products and diabetic complications: a general overview. **Hormones**, v. 4, n. 1, p. 28-37, jan. 2005.

PETERSSON, I. F.; BOEGÄRDB, T.; SAXNEC, T.; SILMAND, A. J.; SVENSSONE, B. Radiographic osteoarthritis of the knee classified by the Ahlbäck and Kellgren & Lawrence systems for the tibiofemoral joint in people aged 35–54 years with chronic knee pain. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 56, n. 8, p. 493-496, ago. 1997.

POOLE, A. R. Osteoarthritis as a whole joint disease. **HSS journal : the musculoskeletal journal of Hospital for Special Surgery**, v. 8, n.1, p. 4-6, fev. 2012.

PRICE, A. J.; ALVAND, A.; TROELSEN, A.; KATZ, J. N.; HOOPER, G.; GRAY, A.; CARR, A.; BEARD, D. Knee replacement. **The Lancet**, v. 392, n. 10158, p. 1672-1682, nov. 2018.

PRIORI, R.; SCRIVO, R.; BRANDT, J.; VALÉRIO, M.; CASADEI, L.; VALESINI, G.; MANETTI, C. Metabolomics in rheumatic diseases: the potential of an emerging methodology for improved patient diagnosis, prognosis, and treatment efficacy. **Autoimmunity reviews**, v. 12, n. 10, p. 1022-1030, ago. 2013.

RALPHS, J. R.; BENJAMIN, M. The joint capsule: structure, composition, ageing and disease. **Journal of anatomy**, v. 184, n. 3, p. 503-509, 1994.

RANKIN, N. J.; PREISS, D.; WELSH, P.; BURGESS, K. E. V.; NELSON, S. M.; LAWLOR, D. A.; SATTAR, N. The emergence of proton nuclear magnetic resonance metabolomics in the cardiovascular arena as viewed from a clinical perspective. **Atherosclerosis**, v. 237, n. 1, p. 287-300, nov. 2014.

RATNESWARAN, A.; ROCKEL, J. S.; KAPOOR, M. Understanding osteoarthritis pathogenesis: a multiomics system-based approach. **Current opinion in rheumatology**, v. 32, n. 1, p. 80-91, jan. 2020.

REGINATO, A. M. et al. Osteoarthritis in Latin America: study of demographic and clinical characteristics in 3040 patients. **JCR: Journal of Clinical Rheumatology**, v. 21, n. 8, p. 391-397, dez. 2015.

REN, Y. et al. Incidence and risk factors of symptomatic knee osteoarthritis among the Chinese population: analysis from a nationwide longitudinal study. **BMC public health**, v. 20, n. 1, p. 1-12, out. 2020.

RIM, Y. A.; NAM, Y.; JU, J. H. The role of chondrocyte hypertrophy and senescence in osteoarthritis initiation and progression. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 7, p. 2358, mar. 2020.

ROBINSON, W. H.; LEPUS, C. M.; WANG, Q.; RAGHU, H.; MAO, R.; LINDSTROM, T. M.; SOKOLOVE, J. Low-grade inflammation as a key mediator of the pathogenesis of osteoarthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 12, n. 10, p. 580-592, ago. 2016.

SAITO, T.; FUKAI, A.; MABUCHI, A.; IKEDA, T.; YANO, F.; OHBA, S.; NISHIDA, N.; AKUNE, T.; YOSHIMURA, N.; NAKAGAWA, T.; NAKAMURA, K.; TOKUNAGA, K.; CHUNG, U.I.; KAWAGUCHI, H. Transcriptional regulation of endochondral ossification by HIF-2 α during skeletal growth and osteoarthritis development. **Nature medicine**, v. 16, n. 6, p. 678-686, mai. 2010.

SCHENK, R. K. Articular cartilage morphology. **Articular cartilage biochemistry**, jan. 1986.

SELLAM, J.; BERENBAUM, F. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 6, n. 11, p. 625-635, out. 2010.

SENOL, O.; GUNDOGDU, G.; GUNDOGDU, K.; MILOGLU, F. D. Investigation of the relationships between knee osteoarthritis and obesity via untargeted metabolomics analysis. **Clinical rheumatology**, v. 38, n. 5, p. 1351-1360, jan. 2019.

SHAPOURI-MOGHADDAM, A.; MOHAMMADIAN, S.; VAZINI, H.; TAGHADOSI, M.; ESMAELI, S. S.; MARDANI, F.; SEIFI, B.; MOHAMMADI, A.; AFSHARI, J. T. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. **Journal of cellular physiology**, v. 233, n. 9, p. 6425–6440, set. 2018.

SHI, J.; LIANG, Q.; ZUSCIK, M. et al. Distribution and alteration of lymphatic vessels in knee joints of normal and osteoarthritic mice. **Arthritis Rheumatol**, v. 66, n. 3, p. 657-66, mar. 2014

SHIMAZU, T. et al. Suppression of oxidative stress by β -hydroxybutyrate, an endogenous histone deacetylase inhibitor. **Science**, v. 339, n. 6116, p. 211-214, jan. 2013.

SHOWIHEEN, S. A.; SUN, A. R.; WU, X.; CRAWFORD, R.; XIAO, Y.; WELLARD, R. M.; PRASADAM, I. Application of metabolomics to osteoarthritis: from basic science to the clinical approach. **Current rheumatology reports**, v. 21, n. 6, p. 1-11, mai. 2019.

SIDDIK, A. B; SHIN, A. C. Recent Progress on Branched-Chain Amino Acids in Obesity, Diabetes, and Beyond. **Endocrinology and metabolism**, v. 34, n. 3, p. 234-246, set. 2019.

SINGH, G. et al. Prevalence of cardiovascular disease risk factors among US adults with self-reported osteoarthritis: data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. **Population**, v. 7, p. 17, out. 2002.

SMITH, M. D. The normal synovium. **The open rheumatology journal**, v. 5, p. 100–106, dezembro 2011.

SMOLEN J. S.; ALETAHA, D.; MCINNES, I. B. Rheumatoid arthritis. **Lancet**, v. 388, n. 10055, p. 2023-2038, out. 2016.

SMOLEN, J. S.; ALETAHA, D.; BARTON, A.; BUMESTER, G. R.; EMERY, P.; FIRESTEIN, G. S.; KAVANAUGH, A.; MCINNES, I. B.; SOMOLON, D. H.; STRAND, V.; YAMAMOTO, K. Rheumatoid arthritis. **Nature reviews disease primers**, v. 4, 18001, fev. 2018.

SONG, G.; LU, Q.; FAN, H.; ZHANG, X.; GE, L.; TIAN, R.; WANG, S.; FENG, T.; PAN, J.; FEN, J.; XIAO, Y.; YI, X.; REN, N.; WANG, L. Inhibition of hexokinases holds potential as treatment strategy for rheumatoid arthritis. **Arthritis research & therapy**, v. 21, n. 1, p. 1-11, abr. 2019.

SOPHIA FOX, A. J.; BEDI, A.; RODEO, S. A. The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. **Sports health**, v. 1, n. 6, p. 461-468, nov. 2009.

SOUSA, E. B. et al. Metabolomics as a promising tool for early osteoarthritis diagnosis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 50, set. 2017.

SRIKANTH, V. K. et al. A meta-analysis of sex differences prevalence, incidence and severity of osteoarthritis. **Osteoarthritis and cartilage**, v. 13, n. 9, p. 769-781, 2005.

STARLING, E. H. On the Absorption of Fluids from the Connective Tissue Spaces. **The Journal of physiology**, v. 19, n. 4, p. 312-326, maio 1896.

STRAND, V.; KIMBERLY, R.; ISAACS, J. D. Biologic therapies in rheumatology: lessons learned, future directions. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, n. 1, p. 75-92, jan. 2007.

SUN, A. R.; FRIIS, T.; SEKAR, S.; CRAWFORD, R.; XIAO, Y.; PRASADAM, I. Is synovial macrophage activation the inflammatory link between obesity and osteoarthritis?. **Current rheumatology reports**, v. 18, n. 9, p. 1-14, jul. 2016.

TAMER, T. M. Hyaluronan and synovial joint: function, distribution and healing. **Interdisciplinary toxicology**, v. 6, n. 3, p.111-125, set. 2013.

TOBÓN, G. J.; YOUINOU, P.; SARAUX, A. The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis. **Autoimmunity reviews**, v. 9, n. 5, p. A288-A292, mar. 2010.

TOGNARELLI, J. M.; DAWOOD, M.; SHARIFF, M. I. F.; GROVER, V. P. B.; CROSSEY, M. M. E.; COX, I. J.; TAYLOR-ROBINSON, S. D.; MCPHAIL, M. J. W. Magnetic resonance spectroscopy: principles and techniques: lessons for clinicians. **Journal of clinical and experimental hepatology**, v. 5, n. 4, p. 320-328, dez. 2015.

TOOTSI, K.; VILBA, K.; MÄRTSON, A.; KALS, J.; PAAPSTEL, K.; ZILMER, M. Metabolomic signature of amino acids, biogenic amines and lipids in blood serum of patients with severe osteoarthritis. **Metabolites**, v. 10, n. 8, p. 323, jul. 2020.

TORZILLI, P. A. et al. Mechanical load inhibits IL-1 induced matrix degradation in articular cartilage. **Osteoarthritis and cartilage**, v. 18, n. 1, p. 97-105, jan. 2010.

TÓTH, P. P.; POTTER, D.; MING, E. E. Prevalence of lipid abnormalities in the united states: the national health and nutrition examination survey 2003-2006. **Journal of clinical lipidology**, v. 6, n. 4, p. 325-330, ago. 2012.

TRYGG, J.; HOLMES, E.; LUNDSTEDT, T. Chemometrics in metabonomics. **Journal of proteome research**, v. 6, n. 2, p. 469-479, fev. 2007.

VALENCIA, X.; HIGGINS, J. M.; KIENER, H. P.; LEE, D. M.; PODREBARAC, T. A.; DASCHER, C. C.; WATTS, G. F.; MIZOGUCHI, E.; SIMMONS, B.; PATEL, D. D.; BHAN, A. K.; BRENNER, M. B. Cadherin-11 provides specific cellular adhesion between fibroblast-like synoviocytes. **The Journal of experimental medicine**, v. 200, n. 12, p. 1673–1679, dez. 2004.

VANDER HEIDEN, M. G.; CANTLEY, L. C.; THOMPSON, C. B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. **Science**, v. 324, n. 5930, p. 1029-1033, mai. 2009.

VELASQUEZ, M. T.; KATZ, J. D. Osteoarthritis: another component of metabolic syndrome?. **Metabolic syndrome and related disorders**, v. 8, n. 4, p. 295-305, set. 2010.

VERZIIL, N. et al. Crosslinking by advanced glycation end products increases the stiffness of the collagen network in human articular cartilage: a possible mechanism through which age is a risk factor for osteoarthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 46, n. 1, p. 114-123, jan. 2002.

VERZIIL, N.; BANK, R. A.; TEKOPPELE, J. M.; DEGROOT, J. AGEing and osteoarthritis: a different perspective. **Current opinion in rheumatology**, v. 15, n. 5, p. 616-622, set. 2003.

WANG, H.; FANG, K.; WANG, J.; CHANG, X. Metabolomic analysis of synovial fluids from rheumatoid arthritis patients using quasi-targeted liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry. **Clinical and Experimental Rheumatology**, nov. 2020.

WARBURG, O. On the origin of cancer cells. **Science**, v. 123, n. 3191, p. 309-314, fev. 1956.

WEINBAUM, S.; TARBELL, J. M.; DAMIANO, E. R. The structure and function of the endothelial glycocalyx layer. **Annu. Rev. Biomed. Eng.**, v. 9, p. 121-167, out. 2007.

WEYAND, C. M.; GORONZY, J. J. Ectopic germinal center formation in rheumatoid synovitis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 987, n. 1, p. 140-149, abr. 2003.

WILLIAMSON, M. P.; HUMM, G.; CRISP, A. J. ¹H nuclear magnetic resonance investigation of synovial fluid components in osteoarthritis, rheumatoid arthritis and traumatic effusions. **Rheumatology**, v. 28, n. 1, p. 23-27, fev. 1989.

WILUSZ, R. E.; SANCHEZ-ADAMS, J.; GUILAK, F. The structure and function of the pericellular matrix of articular cartilage. **Matrix biology**, v. 39, p. 25-32, out. 2014.

WOLFE, F. The natural history of rheumatoid arthritis. **The Journal of rheumatology. Supplement**, v. 44, p. 13-22, mar. 1996.

WOO, S. L.; ABRAMOWITCH, S. D.; KILGER, R.; LIANG, R. Biomechanics of knee ligaments: injury, healing, and repair. **Journal of biomechanics**, v. 39, n. 1, p. 1–20, jan. 2006.

WOODELL- MAY, J. E.; SOMMERFELD, S. D. Role of inflammation and the immune system in the progression of osteoarthritis. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 38, n. 2, p. 253-257, fev. 2020.

WYNN, T.A.; VANNELLA K.M. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. **Immunity**, v. 44, n. 3, p. 450-462, mar. 2016.

XIE, Y. et al. Metabolic syndrome, hypertension, and hyperglycemia were positively associated with knee osteoarthritis, while dyslipidemia showed no association with knee osteoarthritis. **Clinical Rheumatology**, v. 40, n. 2, p. 711-724, jul. 2021.

YANG, X. Y.; ZHENG, K. D.; LIN, K.; ZHENG, G.; ZOU, H.; WANG, J. M.; LIN, Y. Y.; CHUKA, C. M.; GE, R. S.; ZHAI, W.; WANG, J. G. Energy metabolism disorder as a contributing factor of rheumatoid arthritis: a comparative proteomic and metabolomic study. **PloS one**, v. 10, n. 7, p. e0132695, jul. 2015.

YOU, S.; KOH, J. H.; LENG, L.; KIM, W.; BUCALA, R. The tumor- like phenotype of rheumatoid synovium: molecular profiling and prospects for precision medicine. **Arthritis & Rheumatology**, v. 70, n. 5, p. 637-652, dez. 2018.

YUSUF, E.; NELISSEN, R. G.; IOAN-FACSINAY, A.; STOJANOVIC-SUSULIC, V.; DEGROOT, J.; VAN OSCH, G.; MIDDELDORP, S.; HUIZINGA, T. W.; KLOPPENBURG, M. Association between weight or body mass index and hand osteoarthritis: a systematic review. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 69, n. 4, p. 761-765, abr. 2010.

ZAHAN, O. M.; SERBAN, O.; GHERMAN, C.; FODOR, D. The evaluation of oxidative stress in osteoarthritis. **Medicine and pharmacy reports**, v. 93, n. 1, p. 12, jan. 2020.

ZHAI, G.; HART, D. J.; ARDEN, N. K.; HAKIM, A. J.; ILLIG, T.; SPECTOR, T. D. Serum branched-chain amino acid to histidine ratio: a novel metabolomic biomarker of knee osteoarthritis. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 69, n. 6, p. 1227-1231, abr. 2010.

ZHAI, G.; RANDELL, E. W.; RAHMAN, P. Metabolomics of osteoarthritis: emerging novel markers and their potential clinical utility. **Rheumatology (Oxford)**, v. 57, n. 12, p. 2087-2095, jan. 2018.

ZHANG, A.; SUN, H.; WANG, P.; HANA, Y.; WANG, X. Modern analytical techniques in metabolomics analysis. **Analyst**, v. 137, n. 2, p. 293-300, jan. 2012.

ZHANG, W.; LIKHODII, S.; ZHANG, Y.; AREF-ESHGHI, E.; HARPER, P. E.; RANDELL, E.; GREEN, R.; MARTIN, G.; FUREY, A.; SUN, G.; RAHMAN, P.; ZHAI, G. Classification of osteoarthritis phenotypes by metabolomics analysis. **BMJ open**, v. 4, n. 11, p. e006286 1-7, nov. 2014.

ZHANG, W.; SUN, G.; LIKHODII, S.; LIU, M.; AREF-ESHGHI, E.; HARPER, P. E.; FUREY, A.; GREEN, R.; RANDELL, E.; RAHMAN, P.; ZHAI, G. Metabolomic analysis of human plasma reveals that arginine is depleted in knee osteoarthritis patients. **Osteoarthritis and cartilage**, v. 24, n. 5, p. 827-834, mai. 2016.

ZHANG, W. et al. Hyperglycemia-related advanced glycation end-products is associated with the altered phosphatidylcholine metabolism in osteoarthritis patients with diabetes. **PloS one**, v. 12, n. 9, p. 1-10, set. 2017

ZHENG, K.; SHEN, N.; CHEN, H.; NI, S.; ZHANG, T.; HU, M.; WANG, J.; SUN, L.;

YANG, X. Global and targeted metabolomics of synovial fluid discovers special osteoarthritis metabolites. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 35, n. 9, p. 1973-1981, abr. 2017.

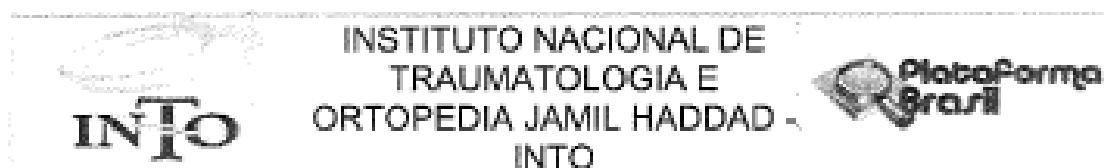
ZHENYUKH, O. et al. High concentration of branched-chain amino acids promotes oxidative stress, inflammation and migration of human peripheral blood mononuclear cells via mTORC1 activation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 104, p. 165-177, mar. 2017.

ZHOU, X.; CAO, H.; YUAN, Y.; WU, W. Biochemical signals mediate the crosstalk between cartilage and bone in osteoarthritis. **BioMed research international**, v. 2020, p. 1-8, out. 2020.

ZHU, Y.; YUAN, M.; MENG, H. Y.; WANG, A. Y.; GUO, Q. Y.; WANG, Y.; PENG, J. Basic science and clinical application of platelet-rich plasma for cartilage defects and osteoarthritis: a review. **Osteoarthritis and cartilage**, v. 21, n. 11, p. 1627-1637, nov. 2013.

ZHUO, Q. I.; YANG, W.; CHEN, J.; WANG, Y. Metabolic syndrome meets osteoarthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 8, n. 12, p. 729-737, ago. 2012.

ANEXO A. Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/INTO)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: METABOLÔMICA DO LÍQUIDO SINOVIAL DE PACIENTES COM OSTEOARTRITE E ARTRITE REUMATÓIDE

Pesquisador: Eduardo Branco de Sousa

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 23695019.5.0000.5273

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.662.837

Apresentação do Projeto:

O projeto contém os elementos básicos de uma pesquisa científica. Apresentando como resumo:

"A osteoartrite (OA) do joelho é uma doença caracterizada pela destruição da cartilagem articular hialina, inflamação da sinóvia e espessamento do osso subcondral. Já a artrite reumatoide (AR) caracteriza-se pela dor articular crônica e incapacitante em diversas articulações, usualmente em caráter simétrico, com sabido envolvimento genético e do meio ambiente. Na sua etiopatogenia ocorre a proliferação do tecido sinovial (pannus), mediado pela presença de citocinas pró-inflamatórias como as interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). A análise metabolômica busca compreender as cascatas biológicas das ações de proteínas e enzimas no contexto de consumo energético e metabólico.

Os metabólitos constituem um grupo diverso de estruturas de baixo peso molecular, que inclui lipídios, peptídeos, ácidos nucleicos, aminoácidos, vitaminas, carboidratos, líxos e ácidos orgânicos. Desempenham, então, um papel importante nos sistemas biológicos, permitindo compreender os fenótipos de algumas doenças. Esperamos demonstrar a presença de diferentes metabólitos no líquido sinovial de pacientes de osteoartrite e artrite reumatoide, uma vez que as doenças apresentam diferentes processos patológicos."

Endereço: Avenida Brasil, nº 500
Bairro: São Cristóvão CEP: 20.240-070
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2134-0000 Fax: (21)2134-5228 E-mail: cep/into@into.saude.gov.br



INSTITUTO NACIONAL DE
TRAUMATOLOGIA E
ORTOPEDIA JAMIL HADDAD -
INTO



Continuação do Parecer 3.652.537

Objetivo da Pesquisa:

Os objetivos do projeto:

- comparar o perfil metabólico do líquido sinovial de pacientes com osteoartrite e artrite reumatoide do joelho;
- identificar os metabólitos presentes no líquido sinovial dos pacientes com osteoartrite e artrite reumatoide;
- identificar correlações entre os parâmetros clínicos e o perfil metabólico do líquido sinovial dos pacientes com osteoartrite e artrite reumatoide.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e benefícios estão bem delimitados. Não trazendo nenhum risco adicional ao participante da pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma pesquisa relevante ao determinar a diferença metabolômica do líquido sinovial entre pacientes com osteoartrite e artrite reumatoide. Possibilitando posteriormente estabelecer possibilidades de tratamento clínico diferenciados para os mesmos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatórios foram apresentados. Os termos de consentimento livre e esclarecido foram apresentados em conformidade com a resolução 468/2012. Sugiro a substituição da palavra porção na frase por líquido sinovial.

"Assim, pedimos sua autorização para utilizar a porção retirada na sua cirurgia em nossa pesquisa."

Por:

"Assim, pedimos sua autorização para utilizar o líquido sinovial retirado na sua cirurgia em nossa pesquisa."

Recomendações:

Recomendamos uma revisão do texto do projeto.

Conclusões ou Pendências e Lista de inadequações:

Trata-se de um estudo relevante, com todas as etapas bem descritas. Trará grande contribuição científica para o entendimento das alterações fisiopatológicas articulares nos dois grupos de pacientes.

Endereço: Avenida Brasil, nº 505

Bairro: São Cristóvão

CEP: 20.240-070

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2134-5000

Fax: (21)2134-5238

E-mail: cap.into@ms.saude.gov.br



**INSTITUTO NACIONAL DE
TRAUMATOLOGIA E
ORTOPEDIA JAMIL HADDAD -
INTO**



Contratação do Parecer: 3.652.037

Considerações Finais a critério do CEP:

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

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

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1452141.pdf	17/10/2019 10:48:18		Aceito
Folha de Rosto	Folhadorosto.pdf	17/10/2019 10:47:58	Eduardo Branco de Sousa	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoMetabolomicaOAsAR.docx	14/10/2019 12:23:30	Eduardo Branco de Sousa	Aceito
Outros	TERMO_RESPONSABILIDADE_PESQUISADOR.pdf	14/10/2019 12:22:48	Eduardo Branco de Sousa	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_AR.docx	14/10/2019 12:07:54	Eduardo Branco de Sousa	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEestecentrite.docx	14/10/2019 12:06:29	Eduardo Branco de Sousa	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Avenida Brasil, nº 500

Bairro: São Cristóvão

CEP: 20.940-070

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2134-8000

Fax: (21)2134-5224

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



INSTITUTO NACIONAL DE
TRAUMATOLOGIA E
ORTOPEDIA JAMIL HADDAD -
INTO



Continuação da Parecer: 3.502.937

RIO DE JANEIRO, 25 de Outubro de 2019

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

Endereço: Avenida Brasil, nº 500
Bairro: São Cristóvão CEP: 20.940-070
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2134-5000 Fax: (21)2134-5229 E-mail: cep.into@into.saude.gov.br

Página 01 de 01

APÊNDICE A. Características gerais dos pacientes incluídos no estudo

Ordem	Grupo	Ahlback	Sexo	Idade	Lado	Peso	Altura	IMC	HAS	Diabetes	Dislipidemia	Cardiopatia	DRC
1	OA	5	F	70	DIR	84	1,51	36,8	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO
2	OA	5	M	61	ESQ	61	1,7	21,1	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO
3	OA	5	M	64	DIR	103	1,86	29,8	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM
4	OA	3	F	67	ESQ	71	1,5	31,6	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
5	AR	5	F	57	DIR	90	1,67	32,3	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO
6	OA	5	M	65	ESQ	104	1,78	32,8	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
8	OA	4	F	80	DIR	71	1,55	29,6	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
9	OA	5	F	82	DIR	73	1,5	32,4	SIM	NÃO	NÃO	SIM	NÃO
10	OA	5	M	58	ESQ	103	1,73	34,4	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM
11	OA	5	M	57	ESQ	90	1,69	31,5	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
12	OA	5	F	76	DIR	76	1,7	26,3	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
13	AR	4	M	76	DIR	78	1,61	30,1	SIM	NÃO	NÃO	SIM	SIM
14	OA	4	F	71	ESQ	69	1,55	28,7	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
15	OA	5	F	61	ESQ	130	1,72	43,9	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO
16	OA	5	M	59	DIR	87	1,71	29,8	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO
17	OA	5	F	78	ESQ	81	1,6	31,6	SIM	NÃO	SIM	NÃO	NÃO
18	OA	5	F	71	DIR	85	1,6	33,2	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
19	OA	5	M	60	ESQ	120	1,79	37,5	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
20	OA	5	M	58	ESQ	107	1,73	35,8	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
21	OA	5	M	61	DIR	81	1,6	31,6	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
22	OA	5	F	70	DIR	88,7	1,45	42,2	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
23	OA	5	F	87	DIR	66	1,49	29,7	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO
24	OA	5	F	60	ESQ	71	1,5	31,6	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
25	OA	5	F	72	DIR	85	1,68	30,1	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO
26	OA	5	F	61	DIR	110	1,57	44,6	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
27	OA	5	M	71	DIR	95	1,49	42,8	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
28	OA	5	F	62	DIR	59	1,51	25,9	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
29	OA	5	F	69	ESQ	85	1,46	39,7	SIM	NÃO	NÃO	SIM	NÃO
30	OA	5	M	81	ESQ	78	1,65	28,7	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM
31	AR	5	M	57	DIR	72	1,67	25,8	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
32	OA	5	F	66	DIR	85	1,6	33,2	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
33	OA	5	F	66	ESQ	74	1,57	30,0	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
35	OA	4	M	63	ESQ	74	1,66	26,9	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
36	OA	5	F	62	DIR	69	1,59	27,3	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO
37	OA	3	M	65	DIR	78	1,5	34,7	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
38	OA	4	M	63	ESQ	70	1,75	22,9	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
39	OA	5	F	77	ESQ	91	1,65	33,4	SIM	SIM	NÃO	SIM	SIM
40	OA	5	F	69	DIR	95	1,6	37,1	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO
41	OA	5	F	68	ESQ	108	1,65	39,7	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
42	OA	5	F	68	DIR	80	1,63	30,1	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
44	OA	4	F	62	ESQ	87	1,67	31,2	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO
45	OA	5	F	80	DIR	88	1,57	35,7	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
46	AR	5	F	72	ESQ	112	1,67	40,2	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
47	OA	5	F	72	ESQ	83	1,5	36,9	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO
48	OA	5	F	72	ESQ	63	1,6	24,6	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
49	OA	5	M	66	ESQ	95	1,78	30,0	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
50	OA	5	F	76	ESQ	74	1,43	36,2	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM
52	OA	5	M	59	ESQ	86	1,63	32,4	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
53	OA	4	F	70	ESQ	78	1,61	30,1	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
54	OA	5	F	64	ESQ	85	1,6	33,2	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
55	OA	5	F	72	DIR	80	1,52	34,6	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO

56	OA	4	F	67	ESQ	84	1,53	35,9	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM
57	OA	3	M	70	ESQ	68	1,75	22,2	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
58	OA	5	F	69	DIR	75	1,5	33,3	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO