



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

***Avaliação clínico laboratorial e imunogenética de pacientes com doença óssea de Paget.***

*Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Médicas.*

Orientadora: Profa. Dra. Tânia Silvia Fröde

Aluno: Gláucio Ricardo Werner de Castro

**Florianópolis, abril de 2014.**

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

Werner de Castro, Gláucio Ricardo

Avaliação clínico laboratorial e imunogenética de  
pacientes com doença óssea de Paget. / Gláucio Ricardo  
Werner de Castro ; orientador, Tânia Silvia Fröde -  
Florianópolis, SC, 2014.

151 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Médicas.

Inclui referências

1. Ciências Médicas. 2. Doença Óssea de Paget. I. Fröde,  
Tânia Silvia. II. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas. III. Título.

## Agradecimentos

A minha amada esposa Silvania, companheira de todas as horas, pela compreensão e total apoio em todos os anos em que estamos juntos.

A meus filhos, Caio e Victor, por alegrar minha vida e por, mesmo sem se dar conta, ter cedido tanto do tempo e da atenção a que tinham direito para que eu pudesse concluir esse doutorado.

A meus pais, José Carlos (in memorian) e Helena, por todos os esforços que empreenderam e todas as dificuldades que superaram em prol de seus filhos, por serem responsáveis por ser quem sou.

A professora Tânia, minha orientadora, pelo suporte, pela dedicação e pelo trabalho exemplar.

Aos colegas que auxiliaram na realização das dosagens laboratoriais, Ziliani, Julia e Bruno.

Às funcionárias do laboratório do HU que auxiliaram na coleta e processamento de amostras, Marien e Maria Aparecida.

Aos colegas reumatologistas que encaminharam pacientes, tornando possível essa pesquisa.

A Deus.

## SUMÁRIO

Lista de abreviações e siglas .....	7
Lista de figuras .....	9
Lista de tabelas .....	10
RESUMO .....	12
ABSTRACT.....	14
1. INTRODUÇÃO .....	15
1.1 Doença Óssea de Paget .....	15
1.2. Metabolismo ósseo e citocinas .....	20
1.3 Fatores genéticos .....	23
2. Hipóteses do Estudo .....	24
3. Objetivos .....	25
3.1 Objetivo geral .....	25
3.2 Objetivos específicos .....	25
4. Casuística e métodos .....	26
4.1 Delineamento do estudo.....	26
4.2 Pacientes .....	26
4.2.1 Critérios de inclusão.....	30
4.2.1.1 Critérios de inclusão de pacientes .....	30
4.2.1.2 Critérios de inclusão de controles.....	30
4.2.2. Critérios de exclusão .....	30
4.2.2.1 Critérios de exclusão de pacientes .....	30
4.2.2.2 Critérios de exclusão de controles.....	33
4.3. Estadiamento.....	34

4.4. Procedimentos para coleta de dados .....	34
4.4.1. Coleta de dados clínicos .....	34
4.4.2. Procedimentos para coleta de material biológico .....	34
4.4.3. Procedimento para a identificação de casos familiares.....	35
4.5. Análises laboratoriais.....	35
4.5.1. Determinação das concentrações séricas de citocinas e de biomarcadores de metabolismo ósseo .....	35
4.6. Análise dos polimorfismo genéticos .....	36
4.7 Análises dos dados.....	37
4.7.1 Avaliação de citocinas pró-inflamatórias .....	37
4.7.2 Avaliação de biomarcadores do metabolismo ósseo.....	37
4.7.3 Avaliação de polimorfismos genéticos.....	38
4.7.4 Avaliação de índices de qualidade de vida.....	39
4.8. Análise Estatística .....	39
5. Considerações Éticas .....	40
6.1 Avaliação de citocinas pró-inflamatórias.....	42
6.2 Avaliação de biomarcadores do metabolismo ósseo séricos .....	49
6.3 Avaliação de polimorfismos genéticos .....	59
6.3.1 Análise do gene SQSTM 1.....	59
6.3.2 Análise do gene VCP.....	63
6.3.3 Análise do gene TNFRSF11B.....	63
6.3.4 Análise do gene TNFRSF11A.....	65
6.4 Avaliação de índices de qualidade de vida .....	67
6.4.1 Questionário SF-36.....	67
6.4.2 Questionário WHOQOL-bref .....	76
7. DISCUSSÃO .....	83
8. CONCLUSÕES.....	97

9. REFERÊNCIAS.....98  
ANEXOS .....115

## Lista de abreviações e siglas

BMP	Proteína morfogênica óssea
Col	Colaboradores
CSF-1	Fator estimulador de colônias I
Ctx	Fragmento C-terminal do colágeno
DKK-1	Proteína <i>Dickkopf 1</i>
FAO	Fosfatase alcalina óssea
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IBMPPFD	Doença óssea de Paget de início precoce e demência frontotemporal
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina 1
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-17	Interleucina 17
IL-6	Interleucina 6
I $\kappa$ B	Inibidor do fator NF $\kappa$ B
M-CSF	Fator estimulador de colônias de monócitos
NF $\kappa$ B	Fator nuclear $\kappa$ B
NGF	Fator de crescimento de nervos
NCX	Fragmento N-terminal do colágeno
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PTH	Paratormônio

RANK	Receptor ativador do NFκB
RANKL	Ligante do Receptor ativador do NFκB
SF-36	Avaliação de Saúde em forma reduzida de 36 itens do Estudo de Desfechos Médicos
SFRP-1	Proteína solúvel relacionada ao <i>Frizzled 1</i>
SNP	Polimorfismos de peptídeo único
SQSTM1	Gene codificante do Sequestossomo 1
TGFB	Fator de crescimento e transformação beta
TH17	Linfócito T <i>helper 17</i>
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
U/l	Unidades Internacionais por litro
VCP	Proteína que contém valosina
WHOQOL-bref	Versão abreviada do questionário de qualidade de vida da Organização Mundial de Saúde

## Lista de figuras

Figura 1- Distribuição dos pacientes no presente estudo.....	23
Figura 2 - Dosagem de citocinas pró-inflamatórias: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17 ,em pacientes com Doença Óssea de Paget e controles.....	43
Figura 3 - Dosagem das citocinas pró-inflamatórias: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17 e fosfatase alcalina óssea em 7 pacientes com doença óssea de Paget previamente e 3 meses após o tratamento com ácido zoledrônico..	48
Figura 4 – Dosagem de biomarcadores do metabolismo ósseo: Rankl, osteoprotegerina, Dkk-1, SFRP-1, esclerostina, osteopontina e relação entre Rankl e osteoprotegerina, em paciente com doença óssea de Paget e controles .....	50
Figura 5 - Correlação entre as concentrações séricas de osteopontina e fosfatase alcalina óssea, osteopontina e a extensão atual do acometimento pela doença e fosfatase alcalina óssea e extensão atual do acometimento pela doença em 57 pacientes com doença óssea de Paget.....	56
Figura 6 - Dosagem de biomarcadores do metabolismo ósseo: Rankl, osteoprotegerina, Dkk-1, SFRP-1, esclerostina, osteopontina e fosfatase alcalina óssea em 7 pacientes com doença óssea de Paget pré e 3 meses após tratamento com ácido zoledrônico..	58
Figura 7 – Distribuição do Escore Total do questionário SF-36 em 50 pacientes com Doença Óssea de Paget.....	72
Figura 8 - Distribuição dos resultados do questionário WHOQOL-bref em 50 pacientes com doença óssea de Paget.....	77

## Lista de tabelas

Tabela 1 - Subgrupos de portadores de doença de Paget avaliados no presente estudo .....	27
Tabela 2 – Classificação de portadores de doença de Paget avaliados no presente estudo, de acordo com as características clínicas .....	29
Tabela 3 - Critérios de exclusão de pacientes empregados em cada análise do presente estudo .....	31
Tabela 4 - Comparação das concentrações séricas de citocinas entre controles e subgrupos de pacientes, divididos de acordo com a atividade da doença.....	44
Tabela 5– Comparação das concentrações séricas de citocinas e fosfatase alcalina óssea de acordo com a atividade da doença e o tratamento atual em pacientes com doença óssea de Paget.....	46
Tabela 6 - Comparação das concentrações séricas de biomarcadores do metabolismo ósseo entre pacientes com doença óssea de Paget em atividade e controle. ....	52
Tabela 7 - Comparação das concentrações séricas de biomarcadores do metabolismo ósseo em portadores de doença óssea de Paget, de acordo com a atividade da doença e o tratamento atual.....	54
Tabela 8 - Comparação das características clínicas de 72 portadores de doença óssea de Paget de acordo com a presença de mutações do domínio de associação à ubiquitina do gene SQSTM1. ....	61
Tabela 9 - Comparação da ascendência de 72 portadores de doença óssea de Paget de acordo com a presença de mutações do domínio de associação à ubiquitina do gene SQSTM1 .....	62
Tabela 10 - Comparação das características clínicas de 72 portadores de doença óssea de Paget de acordo com a presença de polimorfismos no exon 1 do gene TNFRSF11B. ....	64
Tabela 11 - Comparação das características clínicas de 72 portadores de doença óssea de Paget de acordo com a presença de polimorfismos no exon 6 do gene TNFRSF11A. ....	66

Tabela 12 - Características clínicas de 50 pacientes com doença óssea de Paget .....	69
Tabela 13 - Resultados do questionário SF-36 em 50 pacientes com doença óssea de Paget divididos de acordo com suas características clínicas .....	70
Tabela 14 - Correlação entre as variáveis contínuas e os resultados do questionário SF-36 em 50 pacientes com doença óssea de Paget. ....	73
Tabela 15 - Análise multivariada da relação entre variáveis clínicas e os resultados do questionário SF-36 de 50 pacientes com doença óssea de Paget.....	75
Tabela 16 - Resultados do questionário WHOQOL-bref em 50 pacientes com doença óssea de Paget divididos de acordo com suas características clínicas. ....	78
Tabela 17 - Correlação entre as variáveis contínuas e os resultados do questionário WHOQOL-bref em 50 pacientes com doença óssea de Paget.....	80
Tabela 18 - Análise multivariada da relação entre variáveis clínicas e os resultados do questionário WHOQOL-bref de 50 pacientes com doença óssea de Paget.....	82

## RESUMO

**Introdução:** Muitos aspectos da etiopatogênese da doença óssea de Paget ainda estão por ser elucidados, incluindo seus fatores causais, os motivos de acometer alguns ossos e poupar outros e os fatores determinantes da variabilidade de sua distribuição geográfica. **Métodos:** Portadores de doença óssea de Paget foram comparado com controles portadores de osteoartrite para avaliar diferenças nas concentrações séricas das citocinas:  $TNF\alpha$ ,  $IL1\beta$ , IL-6 e IL-17. Em outro protocolo, portadores de doença óssea de Paget foram comparados com controles portadores de osteoartrite para avaliar diferenças nas concentrações séricas dos biomarcadores de metabolismo ósseo: RANKL, osteoprotegerina, DKK-1, sFRP-1 e osteopontina. Para avaliar a presença de mutações genéticas associadas à doença óssea de Paget, portadores de doença óssea de Paget foram avaliados quanto à presença de polimorfismos genéticos dos genes: sequestossomo 1 (SQSTM1), VCP, TNFRSF11B e TNFRSF11A. A qualidade de vida e seus fatores determinantes foram avaliadas com as os questionários de qualidade de vida SF-36 e WHOQOL-bref. **Resultados:** Portadores de doença óssea de Paget apresentaram concentrações séricas aumentadas de IL-6 ( $p<0,05$ ) e concentrações séricas reduzidas de IL-17 ( $p<0,05$ ) quando comparados com o grupo controle. Os pacientes apresentaram concentrações séricas mais elevadas de osteopontina em comparação aos controles ( $p<0,05$ ). Além disso, as concentrações de osteopontina e fosfatase alcalina óssea se correlacionaram à atividade e à extensão da doença ( $p<0,05$ ). Quinze sujeitos (20,8%) apresentavam mutações no exon 8 do gene SQSTM1, oito (11,1%) apresentaram a mutação Pro392Leu, e os restantes apresentavam uma mutação ainda não descrita na literatura, Thr430Pro. Os únicos parâmetros significativamente associados à pior qualidade de vida foram: dor óssea, deformidades e estado civil ( $p<0,05$ ). **Conclusão:** O presente estudo demonstrou pela primeira vez concentrações reduzidas de IL-17 e aumento das concentrações de osteopontina em portadores de doença óssea de Paget. Além disso, foi encontrada uma mutação do gene SQSTM1 até então inédita na literatura médica.

**Palavras-chave:** Doença óssea de Paget, interleucina 1 beta, Fator de necrose tumoral alfa, interleucina 6, interleucina 17, RANKL, osteoprotegerina, DKK-1, sfrp1, esclerostina, osteopontina, sequestosomo 1, SF-36, WHOQOL-bref.

## ABSTRACT

Many aspects of Paget's Disease of Bone (PDB) are still unknown, including its cause, the reasons for its bone distribution and the what determines is geographic distribution. **Methods:** Patients with PDB were compared with controls with primary osteoarthritis to evaluate possible differences in levels of pro-inflammatory cytokines:  $TNF\alpha$ ,  $IL1\beta$ , IL-6 and IL-17. In another protocol, patients with PDB were compared with controls with primary osteoarthritis to evaluate possible differences in levels of RANKL, osteoprotegerin, DKK-1, sFRP-1, osteopontin. Polymorphism of the following genes: SQSTM1, VCP, TNFRSF11B and TNFRSF11A were evaluated in PDB patients. To evaluate quality of life and determinant parameters, PDB patients answered to Brazilian versions of SF-36 and WHOQOL questionnaires. **Results:** Patients with PDB presented higher levels of IL-6 ( $p<0.05$ ) and lower levels of IL-17 ( $p<0.05$ ) in comparison to controls. PDB patients presented higher levels of osteopontin in comparison to controls ( $p<0.05$ ). Moreover, osteopontin and BAP were correlated to disease activity and extension ( $p<0.05$ ). Fifteen subjects (20.8%) carried mutations in exon 8 of the SQSTM1 gene, eight (11.1%) carried the Pro392Leu mutation, while the remainders presented a previously undescribed mutation, Thr439Pro. The only parameters significantly associated to quality of life were: bone pain, deformities and marital status ( $p<0.05$ ). **Conclusion:** The present study has demonstrated for the first time low levels of IL-17 and high levels of osteopontin in PDB patients. Besides, a previously not described mutation of the SQSTM1 gene were found.

**Key words:** Paget's disease of bone, interleukin 1 beta, tumoral necrosis factor alpha, interleukin 6, interleukin 17, RANKL, osteoprotegerin, DKK-1, sFRP1, sclerostin, osteopontin, sequestosome 1, SF-36, WHOQOL-bref. 11

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Doença Óssea de Paget

A doença óssea de Paget, descrita em 1877 por James Paget (1), é a segunda doença metabólica óssea mais frequente. Caracteriza-se por áreas localizadas de aumento da renovação óssea, onde a ativação excessiva de osteoclastos causa lise óssea e consequente ativação de osteoblastos, resultando em síntese óssea excessiva, desorganização da arquitetura óssea usual, crescimento e deformidades ósseas (2,3). Essa doença, afeta mais comumente indivíduos maiores de 40 anos de idade, com predomínio do sexo masculino (4) e apresenta prevalência variável, chegando a 3,1% dos indivíduos acima de 55 anos no Reino Unido e em países de colonização britânica, 3,6% na Holanda, 1% na Espanha e na Itália, sendo rara na escandinávia, na Irlanda, na Europa meridional e em populações asiáticas (5–9).

A doença óssea de Paget é considerada incomum no Brasil, embora grande número de casos tenham sido relatados nas cidades de Recife e Florianópolis (10,11). Em Florianópolis, reumatologistas têm encontrado mais casos de doença óssea de Paget do que os relatados por colegas de outras regiões do país e mesmo do estado de Santa Catarina, o que foi confirmado em pesquisa realizada em 2012 por Werner de Castro e colaboradores (col.) (11). Essa aparente maior incidência poderia decorrer de diferentes origens genéticas ou de fatores ambientais. No tocante à primeira hipótese, cogitou-se inicialmente que a herança açoriana da população na Ilha de Santa Catarina poderia ser um fator importante (12,13). No entanto, a incidência da doença óssea de Paget nos Açores é baixa (14). Portanto, a ocorrência da doença óssea de Paget pode se dever à herança de outras populações que colonizaram a região, como italianos e alemães.

Embora haja grande carência de estudos sobre a prevalência da doença óssea de Paget no Brasil, não têm sido relatados números significantes de pacientes em outras regiões do país, mesmo em locais de colonização semelhante à de Florianópolis.

A maior parte dos portadores da doença óssea de Paget é assintomática, aproximadamente 30% dos pacientes apresentam sintomas, entre eles, dor óssea, deformidades ósseas, surdez, sintomas neurológicos decorrentes de compressões nervosas ou de hipertensão intracraniana, dor articular decorrente de osteoartrite e fraturas patológicas. Em diversos casos, esses sintomas são debilitantes, resultando em perda de mobilidade, independência e qualidade de vida (15-17). A complicação mais grave, embora rara, da doença óssea de Paget é o desenvolvimento de osteossarcoma (18). Dessa forma, depreende-se que a doença óssea de Paget é capaz de afetar intensamente a qualidade de vida de alguns dos indivíduos acometidos, mas não de todos.

Alguns estudos têm sido publicados enfocando a avaliação de índices de qualidade de vida na doença óssea de Paget ou tendo tais índices como um de seus desfechos (16,19-25). No entanto, poucos desses estudos focaram nos fatores determinantes da qualidade de vida nessa população. Esses dados são importantes na avaliação dos possíveis efeitos de qualquer tratamento sobre a qualidade de vida. Se os parâmetros que afetam adversamente a qualidade de vida forem passíveis de modificação pelo tratamento em estudo, é esperado aumento nos índices de qualidade de vida após tal tratamento. Por outro lado, se parâmetros importantes não forem influenciados pelo tratamento, índices de qualidade de vida terão limitada utilidade na avaliação dos resultados da terapêutica.

Entre 10-35% dos pacientes acometidos por essa doença apresentam envolvimento monostótico, na maior parte dos casos há envolvimento de mais de um sítio ósseo. Os locais mais comumente envolvidos são pelve (30-75%), coluna (30-75%), crânio (25-65%) e ossos longos proximais (25-35%) (4). No entanto, mesmo ossos não afetados apresentam aumento de metabolismo (26).

Os achados radiográficos são característicos, possibilitando o diagnóstico na maior parte dos casos (4), biopsias ósseas são raramente necessárias. Exames laboratoriais de marcadores de renovação óssea podem auxiliar no diagnóstico, aumento das concentrações séricas de fosfatase alcalina, marcador de atividade osteoblástica, está presente na maioria dos casos. Aumento de marcadores de reabsorção óssea, como

a hidroxiprolina urinária e os fragmentos terminais do colágeno I (CTX, NTX) também podem ser encontrados, embora com menor frequência. O exame mais sensível, embora não específico, para detecção da doença óssea de Paget é a cintilografia óssea, que detecta hiperemia óssea e atividade osteoblástica (4).

Atualmente, o tratamento da doença óssea de Paget é baseado no uso de bisfosfonados, compostos análogos do pirofosfato inorgânico com grande tropismo pelos ossos. Após sua administração, esses fármacos fixam-se nos ossos, sendo absorvidos pelos osteoclastos quando esses iniciam a reabsorção óssea. Os bisfosfonados mais novos, empregados no tratamento da doença óssea de Paget, agem primariamente através do bloqueio da farnesil-pirofosfato sintase, enzima da via do mevalonato que produz metabólitos intermediários essenciais a modificações pós-translacionais de pequenas GTPases. O resultado é o bloqueio da organização do citoesqueleto e de diversas vias intracelulares de transdução de sinal (27,28). O tratamento com bisfosfonados normaliza os marcadores de remodelamento ósseo e reduz as alterações da cintilografia óssea, resultando em controle dos sintomas da doença e, presume-se, pode prevenir o desenvolvimento de complicações (16,29).

Classicamente, são descritas três fases no desenvolvimento da doença óssea de Paget: a fase inicial, lítica, em que há predomínio de reabsorção óssea pela ativação de osteoclastos gigantes multinucleados; seguida por uma fase mista, chamada ativa, em que há o aumento da atividade osteoblástica e, finalmente, a fase blástica, tardia ou inativa, em que a atividade osteoblástica diminui gradativamente. Um mesmo paciente pode apresentar fases diferentes da doença em diferentes ossos (4).

A causa da doença óssea de Paget ainda não foi completamente elucidada, mas envolve, certamente, fatores genéticos e ambientais. A importância dos fatores genéticos é ilustrada pela existência de casos familiares. Estima-se que 15 - 40 % dos indivíduos com a doença tenham pelo menos outro portador entre seus parentes de primeiro grau (30-34). Quando familiar, a doença óssea de Paget apresenta, tipicamente, padrão de herança autossômico dominante, com penetrância

incompleta (35). Além disso, os índices de prevalência não se alteram significativamente com alterações de hábitos de vida (36).

Diversos genes já foram identificados e relacionados a casos familiares de doença óssea de Paget. O gene associado ao maior número de casos de doença óssea de Paget é o que codifica o sequestossomo 1 (SQSTM1), também conhecido como p62, cujas mutações estão presentes de 26-46% dos casos familiares e em 16% dos casos esporádicos (35,37-44). O sequestossomo participa de diversas funções celulares, entre elas citam-se: modulação de canais de potássio, controle de ativação transcricional de proteínas, recrutamento proteico para degradação por endossomos e o controle da ativação do fator de transcrição nuclear NF- $\kappa$ B por diversas vias de sinalização, incluindo: ativação celular e liberação de fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) e fator de crescimento de nervos (NGF), além da ativação do ligante do RANK (RANKL) (44).

O mecanismo pelo qual as formas mutadas do sequestossomo 1 resultam nas alterações osteoclásticas típicas da doença óssea de Paget ainda não está claro, mas há evidências de que envolve sua capacidade de ligação à ubiquitina já que praticamente todas as mutações descritas associadas a essa doença ocorrem no sítio de ligação a essa molécula. Essas alterações poderiam causar hiperatividade da sinalização via RANK, acúmulo de proteínas não degradadas e apoptose deficiente, resultando em aumento de diferenciação e de ativação de osteoclastos (45,46). No entanto, a relação das mutações do sequestossomo 1 com as manifestações clínicas da doença ainda é controversa (35,47). Além disso, mutações do sequestossomo 1 induzidas em ratos resultaram em osteoclastos com alterações características da doença óssea de Paget, como hipersensibilidade a RANKL, TNF- $\alpha$  e 1,25 (OH) vitamina D, mas não resultaram em alterações ósseas semelhantes às encontradas em humanos (48).

O gene TNFRSF11A que codifica o receptor ativador do fator de transcrição nuclear  $\kappa$ B (RANK) tem sido ligado às síndromes osteólise expansível familiar e hiperfosfatase esquelética expansível, que apresentam alterações fenotípicas semelhantes às da doença óssea de Paget (49). Mutações desse gene foram identificadas em casos de

doença óssea de Paget de início precoce (50–54). Mais recentemente, polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) desse gene têm sido associados à maior susceptibilidade para desenvolvimento de doença óssea de Paget (55-57). Gianfrancesco e col. (58) relataram associação da doença óssea de Paget com o SNP T575C desse gene, cuja presença também estaria relacionada a maior extensão do acometimento.

Mutações do gene TNFRSF11B, que codifica a osteoprotegerina, têm sido associadas a uma forma rara de doença óssea de Paget de início juvenil (49). Dois estudos relacionaram a presença de um SNP desse gene (G1181C, que codifica uma substituição lisina-aspartato no códon 3) ao desenvolvimento de casos típicos de doença óssea de Paget, particularmente no sexo feminino (59,60), embora tal associação não tenha sido replicada em outros estudos (55).

Mutações no gene da proteína VCP (proteína que contém valosina), uma proteína relacionada à degradação do fator inibidor do NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B), estão associadas a síndrome de miopatia de inclusão com doença óssea de Paget de início precoce e demência frontotemporal (IBMPFD) (34,61,62). No entanto, um SNP (rs565070) dessa proteína foi associado a casos de doença óssea de Paget de apresentação típica em um estudo (63).

Embora as manifestações primárias da doença óssea de Paget ocorram nos ossos, as mutações que têm sido relacionadas à sua ocorrência se dão em genes envolvidos em vias de sinalização intracelular importantes em diversos outros tecidos (64). Esse fato sugere que a doença óssea de Paget poderia apresentar manifestações extra ósseas, entre elas, alterações nas concentrações séricas de citocinas do tipo pró-inflamatórias e poderiam explicar as manifestações extra ósseas, como as estrias angioides (65).

Dentre os fatores ambientais associados à doença óssea de Paget, o aspecto mais enfatizado é a possível relação com infecções virais, em particular pelos paramixovírus, devido ao achado de inclusões nucleares e citoplasmáticas em osteoclastos pagéticos. Essas inclusões foram caracterizadas como contendo elementos de diversos paramixovírus: sarampo, caxumba, vírus sincicial respiratório e vírus da cinomose canina (26,28). Além disso, foi demonstrado que osteoclastos infectados

por paramixovírus exibem um fenótipo semelhante ao encontrado na doença óssea de Paget (66-68). Entretanto, a relação das infecções por paramixovírus com o desenvolvimento da doença óssea de Paget tem sido questionada (69) por outros estudos que não conseguiram encontrar indícios de presença viral em ossos pagéticos.

Outro fator ambiental aventado é o contato com animais domésticos ou com gado, ou mesmo o consumo de vísceras de gado na juventude (70–72). Os defensores dessa hipótese, suportada por evidências epidemiológicas, sugerem que esses animais poderiam ser reservatórios de vírus que poderiam desencadear a doença em pessoas susceptíveis.

## 1.2. Metabolismo ósseo e citocinas

A renovação óssea ocorre continuamente - em condições normais, a síntese de matriz óssea por osteoblastos e sua reabsorção por osteoclastos estão estritamente relacionadas. A reabsorção óssea por osteoclastos libera fatores de crescimento presentes na matriz óssea, entre eles, proteínas morfogenéticas ósseas e fator de crescimento transformante beta (TGF), que ativam osteoblastos. Além disso, osteoblastos produzem substâncias que estimulam a diferenciação e a ativação de osteoclastos, entre eles, proteínas Wnt. Por sua vez, fatores de ativação de osteoclastos, como o RANKL, são sintetizados por osteoblastos em respostas a estímulos como o hormônio da paratireóide (PTH). Fatores inibidores da ativação de osteoclastos também são produzidos e liberados por osteoblastos (73).

Os osteoblastos, derivados de células mesenquimais pluripotentes, são responsáveis pela síntese óssea. Estes produzem e são regulados por diversos fatores de crescimento: fator de crescimento insulina-like I, fator de crescimento derivado de plaquetas, fator de crescimento de fibroblastos, TGF beta, Wnt e proteínas morfogênicas ósseas (BMPs). Além disso, são regulados por hormônios como o paratormônio (PTH), proteína relacionada ao paratormônio, hormônios tiroideanos, hormônio do crescimento, insulina, progesterona, prolactina, estrogênios, androgênios, 1,25 (OH) vitamina D e retinóides (73).

Os osteoclastos, derivados de precursores mielóides mononucleares, são responsáveis pela reabsorção óssea e sua função é controlada por diversos mediadores: RANKL, calcitonina, androgênios, hormônio tireoideano, insulina, PTH, fator de crescimento insulina-like 1 (IGF-1), fator estimulador de colônias 1 (CSF-1) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF). A diferenciação dos precursores em osteoclastos é dependente, entre outros fatores, de RANKL e de fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF). Citocinas inflamatórias também podem interferir diretamente na função osteoclástica, por estímulo da expressão de M-CSF e de RANKL. No primeiro caso, citam-se: TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-11; no segundo caso, TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-10, IL-17 (3,73–75). Caracteristicamente, osteoclastos pagéticos são hiperativos e hiper-responsivos a fatores estimulantes como RANKL e 1,25(OH) vitamina D (76,77).

O RANKL é uma citocina da família do TNF produzida e liberada por linfócitos, fibroblastos e osteoblastos. Sua ligação a seu receptor RANK deflagra a ativação de NF- $\kappa$ B e resulta na diferenciação e ativação de osteoclastos. Os seus efeitos sobre os osteoclastos são regulados, em parte, pela relação entre as concentrações de RANKL e de osteoprotegerina, uma forma solúvel do RANK que bloqueia sua ligação aos receptores celulares. Além dos efeitos sobre os osteoclastos, RANKL também pode ter ações sobre outros tipos celulares, já que seu receptor pode ser encontrado em células dendríticas, linfócitos T e em células tímicas imaturas CD4/CD8 (78,79). O papel do RANKL na diferenciação e na ativação dos osteoclastos elucida a importância do NF- $\kappa$ B nessas células e explica, em parte, como as mutações do sequestrossomo poderiam resultar na hiperatividade de osteoclastos, característica da doença óssea de Paget.

No tocante a esse aspecto, Neale e col. (77) reportaram concentrações significativamente elevadas de M-CSF em pacientes não tratados, mas não encontraram aumento das concentrações séricas de IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ . Pioli e col. (80) relataram, ainda, o aumento das concentrações de IL-1 em monócitos medulares de pacientes pagéticos. Quanto à IL-6, foi relatado aumento dessa citocina na medula de ossos acometidos por essa doença, mas o aumento de sua expressão no sangue periférico é controverso. Também foi demonstrado que os osteoclastos pagéticos

possuem uma maior expressão de IL-6 (2,81). Por fim, concentrações séricas aumentadas de osteoprotegerina, mas valores normais de RANKL e da relação RANKL/osteoprotegerina, também foram relatados no soro de portadores de doença óssea de Paget (82).

As proteínas da família Wnt estão intrinsecamente envolvidas na embriogênese e na diferenciação de diversos tipos celulares, incluindo osteoblastos e osteoclastos (83). Diferentes proteínas Wnt estão envolvidas na ativação de diversos tipos celulares, podendo ser inibidas por vários mediadores, entres eles, a esclerostina, o Dickkopf-1 (Dkk-1) e a proteína relacionada ao Frizzled solúvel-1 (sFRP-1). No ossos, a esclerostina é produzida majoritariamente por osteócitos, ao passo que a DKK-1 e a sFRP-1 podem ser produzidas por vários tipos celulares, incluindo osteócitos (84-86).

### 1.3 Fatores genéticos

A doença óssea de Paget está associada a mutações de genes relacionados a mecanismos de transdução de sinal intracelulares em osteoclastos, entre eles, o gene que codifica a proteína sequestossomo 1. Essa proteína está relacionada à transdução de sinal do receptores de diversas citocinas, entre elas, o RANKL e diversas citocinas pró-inflamatórias. O RANKL, além do importante papel em osteoclastos, está envolvido na maturação de linfócitos. Apesar disso, a presença de alterações nas concentrações séricas de citocinas pró-inflamatórias tem sido pouco estudada em portadores de doença óssea de Paget. Também têm sido estudados os biomarcadores de metabolismo ósseo nesses pacientes. A compreensão de alterações de citocinas inflamatórias e de biomarcadores do metabolismo ósseo pode ajudar a compreender aspectos ainda não elucidados da fisiopatologia da doença. A análise genética de paciente oriundos das mais diversas populações em que a doença se manifesta pode ajudar a compreender o papel das mutações genéticas na etiopatogênese da doença e a esclarecer os pontos sobre os quais ainda há dúvidas, por exemplo, os fatores associados ao padrão de herança genética e a interação entre fatores genéticos e ambientais.

## 2. Hipóteses do Estudo

O presente estudo analisou as seguintes hipóteses:

- 1 - Portadores de doença óssea de Paget, quando comparados com controles, apresentam diferentes concentrações séricas de citocinas pró-inflamatórias e de biomarcadores do metabolismo ósseo;
- 2 – A exemplo do que foi descrito em outras populações, uma parcela significativa dos portadores de doença óssea de Paget da região de Florianópolis apresentam mutações genéticas que os predispõe à doença.
- 3 – A qualidade de vida de portadores de doença óssea de Paget é comprometida por sintomas e complicações decorrentes da doença.

### 3. Objetivos

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar as concentrações séricas de citocinas pró-inflamatórias e de biomarcadores do metabolismo ósseo, além de verificar alterações genéticas e fatores associados à qualidade de vida em portadores de doença óssea de Paget seguidos no ambulatório de doenças osteometabólicas do Hospital Governador Celso Ramos, Florianópolis, Santa Catarina.

#### 3.2 Objetivos específicos

1-Avaliar as concentrações séricas de citocinas pró-inflamatórias: interleucina 1 beta (IL- $\beta$ ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina 17 (IL-17), interleucina 6 (IL-6),

2- Determinar as concentrações séricas dos marcadores de atividade óssea: osteopontina, Dkk-1, sFRP-1, esclerostina, RANKL, osteoprotegerina e fosfatase alcalina óssea,

3 - Verificar a presença de polimorfismos do genes de sequestossomo 1 (SQSTM1), VCP, TNFRSF11B e TNFRSF11A,

4- Avaliar a qualidade de vida em portadores de doença óssea de Paget utilizando-se questionários validados (SF-36 e WHOQOL-bref).

## 4. Casuística e métodos

### 4.1 Delineamento do estudo

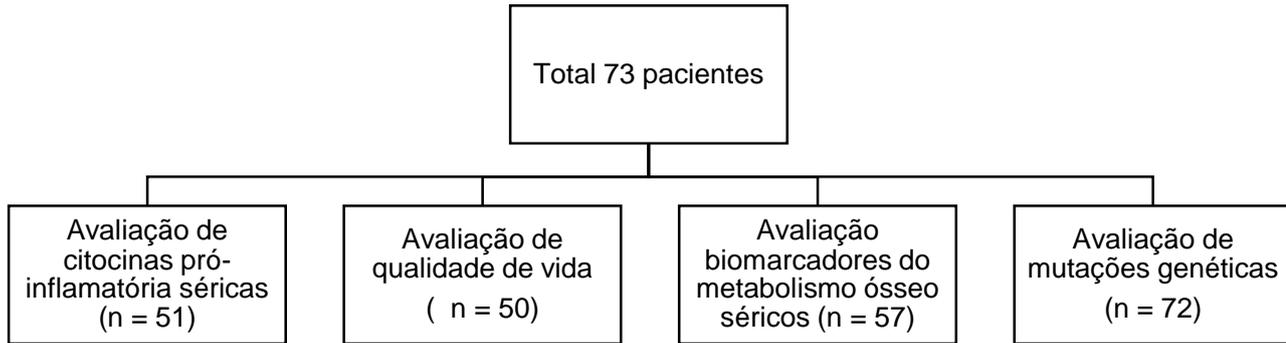
Estudo clínico transversal

### 4.2 Pacientes

Neste estudo foram incluídos 73 portadores de doença óssea de Paget seguidos no ambulatório de doenças osteometabólicas do Hospital Governador Celso Ramos, no ano de 2010 e 24 controles portadores de osteoartrite primária, de mesmos sexo e faixa etária, seguidos no serviço de reumatologia do mesmo hospital. Os pacientes foram divididos em diferentes subgrupos, para se adequar a cada análise a ser realizada no presente estudo, descritos na tabela 1.

**TABELA 1- SUBGRUPOS DE PORTADORES DE DOENÇA DE PAGET AVALIADOS NO PRESENTE ESTUDO**

<b>Análise</b>	<b>Pacientes incluídos</b>	<b>n</b>
<b>Avaliação de citocinas pró-inflamatória séricas</b>	Portadores de doença óssea de Paget, que não apresentavam outros fatores capazes de alterar as concentrações séricas de citocinas pró-inflamatórias.	51
<b>Avaliação de biomarcadores do metabolismo ósseo séricos</b>	Portadores de doença óssea de Paget, que não apresentavam outros fatores capazes de alterar o metabolismo ósseo	57
<b>Avaliação de mutações genéticas</b>	Portadores de doença óssea de Paget que concordaram em colher amostras de sangue	72
<b>Avaliação de qualidade de vida</b>	Portadores de doença óssea de Paget capazes de compreender e responder aos questionários de qualidade de vida e que não apresentavam outras enfermidades que afetem adversamente a qualidade de vida	50



**FIGURA 1** - DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES NO PRESENTE ESTUDO.

Adicionalmente, os pacientes foram classificados de acordo com suas características clínicas (tabela 2).

**TABELA 2 – CLASSIFICAÇÃO DE PORTADORES DE DOENÇA DE PAGET AVALIADOS NO PRESENTE ESTUDO, DE ACORDO COM AS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.**

<b>Subgrupos</b>	<b>Critério</b>
<b>Pacientes com doença monostótica</b>	Acometimento de apenas um sítio ósseo pela doença óssea de Paget
<b>Pacientes com doença polioestótica</b>	Acometimento, atual ou pregresso, de mais um sítio ósseo pela doença óssea de Paget
<b>Pacientes com doença ativa</b>	Pacientes com evidência de hipercaptação do radioisótopo à cintilografia óssea
<b>Pacientes com doença inativa</b>	Pacientes sem evidência de hipercaptação do radioisótopo à cintilografia óssea
<b>Pacientes em tratamento atual</b>	Pacientes com história de uso de bisfosfonados orais nos últimos 6 meses ou ácido zoledrônico nos últimos 12 meses.
<b>Pacientes sem tratamento atual</b>	Pacientes sem história de uso de bisfosfonados orais nos últimos 6 meses ou ácido zoledrônico nos últimos 12 meses.

## 4.2.1 Critérios de inclusão

### 4.2.1.1 Critérios de inclusão de pacientes

Pacientes portadores da doença óssea de Paget diagnosticada por alterações radiológicas típicas da doença, que incluem: aumento de densidade óssea, aumento do volume ósseo, deformidade óssea, espessamento da cortical óssea, aumento do trabeculado ósseo (7). Pacientes que permitam a utilização dos resultados de seus exames para as atividades de pesquisa após leitura e assinatura do *termo de consentimento livre e esclarecido* (Anexo 1).

### 4.2.1.2 Critérios de inclusão de controles

Pacientes com osteoartrite diagnosticada por alterações radiológicas típicas da doença, incluindo esclerose óssea subcondral, osteófitos, cistos periarticulares e estreitamento assimétrico da fenda articular (87). Pacientes que permitam a utilização dos resultados de seus exames para as atividades de pesquisa após leitura e assinatura do *termo de consentimento livre e esclarecido*.

## 4.2.2. Critérios de exclusão

### 4.2.2.1 Critérios de exclusão de pacientes

Todos os pacientes que concordaram em participar foram incluídos na pesquisa. No entanto, para cada análise realizada foram empregados diferentes critérios de exclusão, expostos na tabela 3.

**TABELA 3 - CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO DE PACIENTES EMPREGADOS EM CADA ANÁLISE DO PRESENTE ESTUDO.**

<b>Análise</b>	<b>Crítérios de exclusão</b>
<b>Avaliação de citocinas pró-inflamatórias séricas</b>	<p>Doenças inflamatórias sistêmicas</p> <p>Infecções ativas</p> <p>Neoplasias</p> <p>Síndrome plurimetabólica</p> <p>Osteoartrite erosiva</p> <p>Uso atual de quaisquer dos seguintes fármacos: anti-inflamatórios não esteroidais, corticosteroides, imunossupressores, agentes anti-citocinas e qualquer medicamento para osteoporose, com exceção de cálcio e vitamina D e daqueles também empregados no tratamento da doença óssea de Paget: bisfosfonados, calcitonina.</p>
<b>Avaliação de biomarcadores do metabolismo ósseo séricos</b>	<p>Doenças inflamatórias sistêmicas</p> <p>Insuficiência renal crônica</p> <p>Distúrbios da paratiroide</p> <p>Síndromes disabsortivas</p> <p>Neoplasias</p> <p>Obesidade</p> <p>Hipotireoidismo descompensado</p>

Acidose metabólica

Alterações das concentrações séricas de cálcio, fósforo, magnésio

Uso de quaisquer drogas que afetem o metabolismo ósseo, incluindo corticosteroides, com exceção, cálcio e vitamina D. Os pacientes poderiam estar usando, ainda, bisfosfonados e calcitonina.

**Avaliação de**  
**mutações genéticas**      Recusa a ceder amostras de sangue

**Avaliação de**  
**qualidade de vida**      Incapacidade de compreender os questionários

Portadores de qualquer doença crônica, além da doença óssea de Paget, passível de comprometer a qualidade de vida, incluindo: depressão, fibromialgia, quadros demenciais, doenças inflamatórias sistêmicas, osteoartrite primária de joelhos ou quadris, distúrbios neurológicos (exceto os decorrentes da própria doença óssea de Paget), infecções agudas ou crônicas, insuficiência arterial periférica, doença cardíaca isquêmica, insuficiência cardíaca congestiva, doenças pulmonares crônicas, insuficiência renal, insuficiência hepática, neoplasias e fraturas osteoporóticas.

---

#### 4.2.2.2 Critérios de exclusão de controles

Portadores de doenças infecciosas bacterianas, virais e/ou fúngicas em atividade;

Portadores de infecções virais crônicas, incluindo infecções por hepatite B, hepatite C e HIV;

Portadores de doenças neoplásicas;

Portadores de doenças inflamatórias sistêmicas;

Portadores de osteoartrite erosiva;

Portadores de outras doenças ósseas metabólicas e/ou doenças que alterem o metabolismo ósseo, incluindo hiperparatiroidismo, hipotiroidismo, insuficiência de vitamina D, insuficiência renal crônica, acidose metabólica e alteração das concentrações séricas de cálcio, fósforo e magnésio;

Portadores de diabetes mellitus ou síndrome plurimetabólica;

Uso de medicamentos imunossupressores, anticorpos monoclonais ou imunoglobulina endovenosa nos últimos três meses;

Uso de corticosteroides ou anti-inflamatórios não esteroidais nos últimos 30 dias;

Uso de rituximabe ou imunoglobulina antitimocítica nos últimos 12 meses;

Portadores de osteoporose;

Uso de bisfosfonados orais, ranelato de estrôncio, terapia de reposição hormonal, teriparatide, denosumab, raloxifeno nos últimos 6 meses ou de bisfosfonados endovenosos nos últimos 24 meses.

### 4.3. Estadiamento

A atividade da doença óssea de Paget foi determinada por dosagem das concentrações séricas da fração óssea da fosfatase alcalina sérica e pela presença de hipercaptação do radioisótopo (metilenodifosfonado-<sup>99m</sup>Tc) na fase tardia da cintilografia óssea.

A extensão do acometimento, prévio e atual, foi determinada pela análise das imagens digitalizadas de cintilografias ósseas, utilizando o índice descrito por Meunier e col. (88) e por radiografias. Todos os achados das cintilografias ósseas foram confirmados por radiografia e, caso necessário, por tomografia computadorizada.

### 4.4. Procedimentos para coleta de dados

#### 4.4.1. Coleta de dados clínicos

Os dados relativos a sintomas progressos e atuais, duração de doença, complicações, comorbidades, medicamentos utilizados atual e previamente, ascendência e história familiar foram obtidos por meio de questionário e da análise dos prontuários médicos.

Tendo em consideração a longa permanência dos bisfosfonados no tecido ósseo, um paciente foi considerado “atualmente em tratamento” caso tivesse utilizado bisfosfonados orais (alendronato, risedronato ou ibandronato) nos últimos 6 meses ou ácido zoledrônico nos últimos 12 meses.

#### 4.4.2. Procedimentos para coleta de material biológico

Neste estudo, foram coletados 20 ml de amostras de sangue total de todos os pacientes e controles. As amostras obtidas foram centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos para separação do soro que foi, em seguida, congelado a -80° C para posterior análise laboratorial dos parâmetros

inflamatórios e do metabolismo ósseo. Outros 10 ml de sangue total foram coletados apenas dos portadores de doença óssea de Paget, armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  e utilizados para análise de polimorfismos genéticos.

#### 4.4.3. Procedimento para a identificação de casos familiares

Para a diferenciação entre casos familiares e esporádicos de doença óssea de Paget os pacientes foram inquiridos sobre história familiar da doença. Adicionalmente, parentes de primeiro e segundo grau maiores de 40 anos foram convidados e realizar exames de triagem, de acordo com o protocolo utilizado por Poór e col. (89) e Gennari e col. (5). Os exames de triagem incluíram dosagem de fosfatase alcalina óssea e radiografias de: coluna lombar, crânio e bacia, incluindo as extremidades superiores dos fêmures.

#### 4.5. Análises laboratoriais

##### 4.5.1. Determinação das concentrações séricas de citocinas e de biomarcadores de metabolismo ósseo

Para avaliar a concentração sérica das citocinas pró-inflamatórias e dos biomarcadores do metabolismo ósseo foi utilizado o método de *Sandwich* Enzimaimunoensaio (ELISA), utilizando os seguintes anticorpos: anti-TNF- $\alpha$  (BD Biosciences, San Jose, CA, ref. 550610), anti-L-1 $\beta$  (BD Biosciences, San Jose, CA, ref. 557966), anti-IL-17 (Raybiotech Inc., Norcross, GA, ref. ELH-IL17-001), anti-L-6 (BD Biosciences, San Jose, CA, ref. 550799), anti-fosfatase alcalina óssea (Mybiosource, San Diego, CA, ref. MBS724100), anti-osteopontina (Abcam, Cambridge, MA, ref. AB100618), anti-esclerostina (Mybiosource, San Diego, CA, ref. MBS702938), anti-RANKL (BioVendor, Czech Republic, ref. RD193004200R), anti-osteoprotegerina (Raybiotech Inc. Norcross, GA, ref. ELH-OPG-001), anti-DKK-1 (Raybiotech INC. Norcross, GA, ref. ELH-DKK1-001), anti-sFRP-1(Mybiosource, San Diego, CA, MBS705581). Essas

análises foram realizadas no Laboratório de Pesquisa em Imunologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina.

As análises foram realizadas de acordo com as instruções dos fabricantes. Em geral, inicialmente foi elaborada uma curva padrão com concentrações crescentes conhecidas de cada proteína analisada. Na sequência, foram adicionados 100 µl de amostra do soro dos sujeitos, padrões ou a curva padrão em cada escavação (well) na mesma placa. Em seguida, a mistura foi agitada lentamente a 100 rpm. Para a incubação da reação, a placa de ELISA foi tampada e a reação foi incubada por 2 horas a temperatura ambiente. Após essa etapa, a placa de ELISA foi lavada com solução tampão de lavagem pelo número de vezes recomendado pelo fabricante do kit, tendo cada lavagem a duração de 1 minuto. A seguir, adicionaram-se 100 µl de substrato denominado TMB em cada escavação, a placa foi novamente agitada como anteriormente citado e mais uma incubação foi realizada durante 30 minutos a temperatura ambiente. Após esse procedimento, adicionou-se a essa mistura 50 µl de solução de parada da reação enzimática denominada solução STOP e a placa de ELISA foi mais uma vez agitada conforme supracitado. A leitura foi realizada após 30 minutos, em leitora de placa de ELISA, empregando feixe de luz com comprimento recomendado pelo fabricante do kit.

#### 4.6. Análise dos polimorfismo genéticos

As amostras de sangue coletadas foram armazenadas com EDTA a -80°C e posteriormente utilizadas para análise de polimorfismos dos genes: sequestossomo 1 (SQSTM1/p62), VCP, TNFRSF11B e TNFRSF11A por meio de reação de polimerase em cadeia (PCR) após extração do DNA genômico de leucócitos do sangue periférico. A análise de mutações e polimorfismos genéticos foi realizada no Laboratório de Doenças Metabólicas Ósseas da Universidade de Florença – Itália com o emprego de metodologia previamente descrita no artigo de Falchetti e col. (41).

## 4.7 Análises dos dados

### 4.7.1 Avaliação de citocinas pró-inflamatórias

Essa análise foi realizada para comparar as concentrações séricas de citocinas pró-inflamatórias em portadores de doença óssea da Paget com as concentrações apresentadas pelo grupo controle e para identificar possíveis aspectos da doença de Paget relacionados aos achados.

As concentrações séricas das seguintes citocinas foram determinadas em soro de pacientes e controles:  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-6}$  e  $\text{IL-17}$ . As concentrações séricas de fosfatase alcalina óssea foram determinadas apenas nas amostras dos pacientes. Inicialmente, foram comparados as concentrações séricas das citocinas pró-inflamatórias nas amostras de soros do grupo total de pacientes e controles. Em seguida, as concentrações séricas de citocinas em pacientes foram correlacionadas com os seguintes parâmetros clínicos: extensão do acometimento pela doença óssea de Paget, presença de atividade da doença e concentrações séricas de fosfatase alcalina óssea.

Durante o estudo, sete pacientes com doença ativa receberam tratamento com ácido zoledrônico. Esses pacientes foram submetidos a nova coleta de sangue 3 meses após o tratamento para comparação das concentrações séricas de citocinas pré e pós-tratamento. Esse intervalo foi escolhido para evitar as reações inflamatórias agudas que podem ocorrer após a infusão de ácido zoledrônico.

### 4.7.2 Avaliação de biomarcadores do metabolismo ósseo

Essa análise foi realizada para comparar as concentrações séricas de biomarcadores do metabolismo ósseo em portadores de doença óssea da Paget com as concentrações séricas apresentadas pelo grupo controle e para identificar possíveis aspectos da doença de Paget relacionados aos achados.

As concentrações séricas das seguintes proteínas foram determinados em sangues de pacientes e controles: RANKL, osteoprotegerina, esclerostina, sFRP-1, DKK-1 e osteopontina. A dosagem de fosfatase alcalina óssea foi realizada apenas nas amostras dos pacientes.

Inicialmente, as concentrações séricas dos biomarcadores do metabolismo ósseo foram comparadas nos soros de pacientes e do grupo controle. Em seguida, as concentrações séricas de biomarcadores em pacientes foram correlacionadas com os seguintes parâmetros clínicos: extensão do acometimento pela doença óssea de Paget, presença de atividade da doença e concentrações séricas de fosfatase alcalina óssea.

Durante o estudo, sete pacientes com doença ativa receberam tratamento com ácido zoledrônico. Esses pacientes foram submetidos a nova dosagem de sangue 3 meses após o tratamento para comparação das concentrações dos biomarcadores pré e pós-tratamento.

#### 4.7.3 Avaliação de polimorfismos genéticos

A análise de polimorfismos genéticos foi realizada em amostras de sangue total de todos os portadores de doença óssea de Paget incluídos no estudo e que aceitaram ceder amostras de sangue.

A população de Florianópolis é majoritariamente composta por descendentes de açorianos (13), embora outros grupos étnicos sejam importantes, particularmente descendentes de imigrantes portugueses, espanhóis, alemães e italianos. Os Açores são um arquipélago um uma população relativamente pequena e muitos de seus descendentes se estabeleceram em pequenas comunidades que permaneceram relativamente isoladas até há poucas décadas (12,13). Teoricamente, a ascendência açoriana ou algum grau de consanguinidade poderiam ter contribuído para a maior frequência de casos de doença óssea de Paget na região de Florianópolis, ainda que a prevalência da doença nos Açores seja baixa (14). Para investigar essa hipótese, a ascendência de cada sujeito foi questionada. Nos casos em que um sujeito apresentava

ascendência multiétnica, foi considerada a região com maior prevalência de doença óssea de Paget (7).

Após a determinação da presença de mutações genéticas, os dados foram correlacionados com a ascendência dos pacientes e com suas características clínicas.

#### 4.7.4 Avaliação de índices de qualidade de vida

Os pacientes responderam às versões brasileiras dos questionários SF-36 (90) e WHOQOL-bref (91) (Anexos 3 e 4). Para avaliar quais fatores estão associados à redução dos índices de qualidade de vida nesses pacientes, os resultados dos questionários foram correlacionados com características demográficas, incluindo sexo, idade e estado civil e com parâmetros de atividade da doença, incluindo tipo de acometimento, presença de atividade, extensão, concentrações séricas de fosfatase alcalina óssea e presença de complicações e sintomas da doença óssea de Paget (dor óssea, fratura, osteoartrite, hipertensão intracraniana, déficit auditivo secundário à doença).

Na presente análise, o termo estado civil foi empregado fora de seu contexto jurídico. Assim, o termo “casado” se referiu a pessoas que vivem com um companheiro e o termo solteiro englobou pessoas que não vivem com um companheiro, incluindo as divorciadas.

Por não haver resultados padronizados desses questionários para a população brasileira, não foi possível definir, na presente análise, se a doença óssea de Paget está associada à piora nos índices de qualidade de vida.

#### 4.8. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com o programa SPSS 20.0 (SPSS Inc. Chicago, EUA). De acordo com o tipo de dado, os resultados foram apresentados em percentual, média (desvio padrão) ou mediana (percentis 25 e 75).

As diferenças estatísticas de marcadores bioquímicos e das citocinas entre pacientes e o grupo controle foram avaliadas pelos testes: T de Student ou por teste de análise de variância (ANOVA) complementado, quando necessário, pelos testes post-hoc de Bonferroni e teste T de Student. Correlações entre variáveis lineares foram analisadas por regressão linear. O método estimativa de curva foi utilizado para avaliar, por diferentes regressões, qual modelo melhor se adaptava aos dados quando a análise da plotagem de duas variáveis sugeria que uma regressão linear não era adequada. Medidas repetidas foram avaliadas com o teste T de Student para amostras pareadas.

Na investigação de fatores associados à qualidade de vida em portadores de doença óssea de Paget, as comparações entre subgrupos foram realizadas com o teste U de Mann-Whitney. As correlações com variáveis contínuas foram testadas com o teste rho de Spearman. Por fim, um modelo linear generalizado foi utilizado para avaliar a associação entre os resultados dos questionários de qualidade de vida e os diversos parâmetros avaliados.

Na investigação dos fatores genéticos, as comparações entre os grupos foram realizadas com testes Chi-quadrado ou ANOVA. Para todas as análises, valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos

## 5. Considerações Éticas

O estudo foi projetado e conduzido de acordo com as *Diretrizes e Normas Reguladoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos*

(resolução 196/1996 do Conselho Nacional de Saúde) e foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa do Hospital Governador Celso Ramos e da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) – protocolo número 353461. Todos os pacientes assinaram um consentimento informado. (Anexo 1).

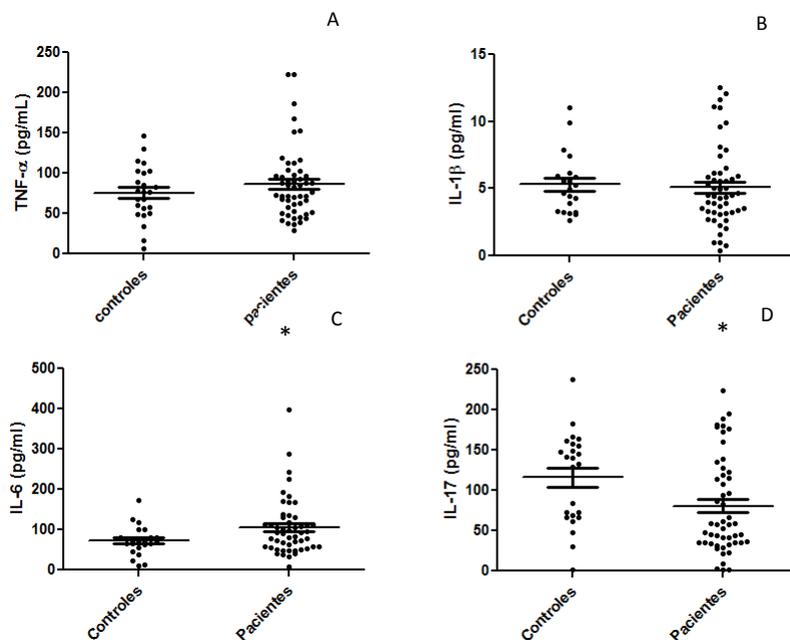
## 6. Resultados

### 6.1 Avaliação de citocinas pró-inflamatórias

Cinquenta e um pacientes, com média de idade de  $66,9 \pm 9,59$  anos, 75% do sexo feminino e 24 controles, com média de idade de  $62,42 \pm 6,97$  anos, 83,3% de sexo feminino foram incluídos nessa análise. O diagnóstico de doença óssea de Paget fora realizado em média há  $10,45 \pm 15,86$  anos, 55,1% dos pacientes relatavam história de sintomas relacionados à doença óssea de Paget, 28,6% apresentavam doença monostótica e 44,9% foram considerados estar atualmente em tratamento. História familiar de doença óssea de Paget e presença de mutações do gene do Sequestossomo 1 foram ambos encontrados em 26,5% dos pacientes, sendo que 38,5% dos pacientes com história familiar positiva apresentavam mutações do gene SQSTM1.

Não houve diferenças estatisticamente significantes entre pacientes e controles em relação às concentrações séricas de TNF- $\alpha$  ( $85,68 \pm 34,41$  pg/ml vs  $75,60 \pm 34,04$  pg/ml,  $p = 0,31$ ) e IL-1 $\beta$  ( $5,05 \pm 2,94$  pg/ml vs  $4,43 \pm 2,80$  pg/ml,  $p = 0,391$ ). Pacientes apresentaram concentrações séricas mais elevadas de IL-6 ( $108,06 \pm 71,07$  pg/ml vs  $72,03 \pm 36,33$  pg/ml,  $p = 0,024$ ), ao passo que o grupo controle apresentou maiores concentrações séricas de IL-17 ( $78,56 \pm 59,85$  pg/ml vs  $115,97 \pm 56,70$  pg/ml,  $p = 0,012$ ) (figura 2).

Uma vez que as concentrações séricas de citocinas poderiam diferir entre pacientes com doença ativa e inativa, os pacientes foram divididos de acordo com a atividade da doença e as concentrações séricas de citocinas foram comparadas com as do grupo controle. Essa abordagem revelou um padrão similar ao da comparação do grupo total de pacientes com os controles, aumento das concentrações de IL-6 e redução de IL-17 em comparação aos controles (tabela 4).



**FIGURA 2** - DOSAGEM DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS: (A) TNF-A, (B) IL-1B, (C) IL-6, (D) IL-17, EM PACIENTES COM DOENÇA ÓSSEA DE PAGET (N = 51) E CONTROLES (N = 24). CADA PONTO REPRESENTA OS RESULTADOS DE UM PACIENTE INDIVIDUAL. AS LINHAS REPRESENTAM MÉDIA E DESVIO PADRÃO DA MÉDIA (DP). \* =  $p < 0,05$ , AS COMPARAÇÕES FORAM REALIZADAS COM TESTE T DE STUDENT. TNF-A: FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA, IL-1B: INTERLEUCINA 1 BETA (B), IL-6: INTERLEUCINA 6, IL-17: INTERLEUCINA 17.

**TABELA 4 - COMPARAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS ENTRE CONTROLES E SUBGRUPOS DE PACIENTES, DIVIDIDOS DE ACORDO COM A ATIVIDADE DA DOENÇA.**

	<b>Controles (n 24)</b>	<b>PDB com doença ativa (n 23)</b>	<b>p*</b>	<b>PDB com doença inativa (n 28)</b>	<b>p**</b>
<b>TNF <math>\alpha</math> (pg/ml)</b>	75,60 (34,04)	72,66 (27,03)	0,745	94,37 (52,60)	0,195
<b>IL-1 <math>\beta</math> (pg/ml)</b>	4,43 (2,80)	6,03 (3,00)	0,066	4,71 (3,18)	0,859
<b>IL-6 (pg/ml)</b>	72,03 (36,33)	121,93 (86,79)	<b>0,015</b>	108,68 (59,89)	<b>0,023</b>
<b>IL-17 (pg/ml)</b>	115,97 (56,70)	94,95 (62,00)	0,231	68,03 (3,30)	<b>0,015</b>

Os resultados foram expressos como média e desvio padrão da média. As comparações foram realizadas com teste T de Student. PDB – pacientes com doença óssea de Paget. TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa , IL-1 $\beta$ : interleucina 1 beta, IL-6: interleucina 6, IL-17: interleucina 17. \*p = diferenças estatísticas entre os grupos PDB com doença ativa e controles, \*\*P = diferenças estatísticas entre os grupos PDB com doença inativa e controles.

Para investigar se as concentrações séricas de citocinas estariam sendo pela atividade da doença óssea de Paget, os resultados foram comparados entre subgrupos de pacientes divididos de acordo com a atividade da doença e com o estado atual de tratamento. Nesse protocolo também foi investigada a existência de correlações entre as concentrações séricas de citocinas e: extensão da doença e as concentrações séricas de fosfatase alcalina óssea.

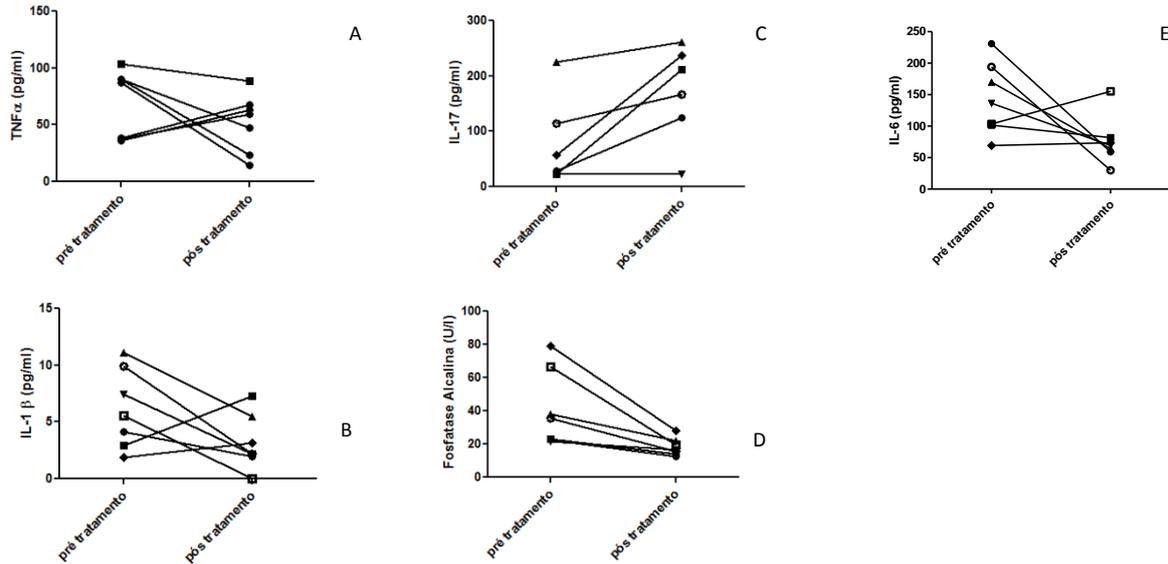
Quando os pacientes foram comparados de acordo com a presença de áreas de hipercaptação à cintilografia óssea, a única diferença estatisticamente significativa entre aqueles com doença ativa (n= 23) e inativa (n= 28) foram as concentrações séricas de fosfatase alcalina óssea ( $p = 0,017$ ) (tabela 5). Não houve diferenças estatisticamente significantes entre as concentrações séricas de citocinas entre os pacientes em vigência de tratamento (n =23) e sem tratamento atual (n = 28); embora as concentrações séricas de IL-6 fossem menores em pacientes em vigência de tratamento, a diferença não apresentou significância estatística. ( $p = 0,053$ ) (tabela 5). Não foram encontradas correlações significativas entre as concentrações séricas de citocinas e fosfatase alcalina óssea (TNF $\alpha$ :  $r = 0,053$   $p = 0,713$ , IL-1 $\beta$ :  $r = 0,134$   $p = 0,349$ , IL-6:  $r = 0,09$   $p = 0,532$ , IL-17:  $r = 0,209$   $p = 0,142$ ) ou entre as concentrações séricas de citocinas e a extensão da doença (TNF $\alpha$ :  $r = 0,179$   $p = 0,204$ , IL-1 $\beta$ :  $r = 0,308$   $p = 0,027$ , IL-6:  $r = 0,152$   $p = 0,283$ , IL-17:  $r = 0,265$   $p = 0,058$ ). As concentrações séricas de fosfatase alcalina óssea apresentaram correlação significativa com a extensão do acometimento pela doença óssea de Paget ( $r = 0,515$ ,  $p < 0,001$ ).

**TABELA 5 – COMPARAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE CITOCINAS E FOSFATASE ALCALINA ÓSSEA EM PORTADORES DE DOENÇA ÓSSEA DE PAGET DE ACORDO COM A ATIVIDADE DA DOENÇA E O TRATAMENTO ATUAL (USO DE BISFOSFADOS ORAIS NOS ÚLTIMOS 6 MESES OU ÁCIDO ZOLEDRÔNICO NOS ÚLTIMOS 12 MESES).**

	Atividade da doença			Tratamento atual		
	Ativa (n 23)	Inativa (n 28)	p*	Sim (n 23)	Não (n 28)	p*
<b>TNF-<math>\alpha</math> (pg/ml)</b>	72,66 (27,03)	94,37 (52,60)	0,09	89,03 (43,56)	82,69 (43,85)	0,601
<b>IL-1-<math>\beta</math> (pg/ml)</b>	6,03 (3,00)	4,71 (3,18)	0,195	5,63 (2,93)	4,53 (2,90)	0,179
<b>IL-6 (pg/ml)</b>	121,93 (86,79)	108,68 (59,89)	0,600	88,14 (43,45)	125,85 (85,75)	0,053
<b>IL-17 (pg/ml)</b>	94,95 (62,00)	68,03 (63,30)	0,194	73,23 (54,86)	83,33 (64,60)	0,545
<b>FAO (U/l)</b>	49,95 (42,13)	20,12 (8,16)	<b>0,017</b>	28,87 (16,08)	38,30 (39,89)	0,187

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média  $\pm$  desvio padrão da média. As comparações foram realizadas com teste t de Student, com nível de significância de 5%. TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa, IL-1 $\beta$ :interleucina 1 beta (B), IL-6: interleucina 6, IL-17: interleucina 17 FOA: fosfatase alcalina óssea. \*p = diferenças estatísticas entre os grupos PDB com doença ativa e inativa, \*\*p = diferenças estatísticas entre os grupos PDB com e sem tratamento atual.

Durante o período de coleta de dados, sete pacientes receberam tratamento com ácido zoledrônico 5 mg por via endovenosa. Novas amostras de sangue foram colhidas desses pacientes três meses após o tratamento para nova dosagem das concentrações séricas de citocinas e fosfatase alcalina óssea. Após o tratamento, houve redução nos valores de  $\text{TNF}\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e fosfatase alcalina óssea e aumento das concentrações séricas de IL-17 ( $\text{TNF}\alpha$ :  $71,00\pm 31,42$  pg/ml vs  $51,33\pm 31,49$  pg/ml, IL-1 $\beta$ :  $6,73\pm 3,6$  pg/ml vs  $3,39\pm 2,94$  pg/ml, IL-6:  $159,97\pm 56,80$  pg/ml vs  $78,04\pm 47,11$  pg/ml, IL-17:  $89,60\pm 83,62$  pg/ml vs  $200,51\pm 54,70$  pg/ml, fosfatase alcalina óssea  $37,06\pm 17,34$  U/l vs  $16,71\pm 9,98$  U/l) (figura 3).



**FIGURA 3** - DOSAGEM DAS CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS: (A) TNF $\alpha$ , (B) IL-1 $\beta$ , (C) IL-17, (D) FOSFATASE ALCALINA ÓSSEA E IL-17 (E) EM 7 PACIENTES COM DOENÇA ÓSSEA DE PAGET PREVIAMENTE E 3 MESES APÓS O TRATAMENTO COM ÁCIDO ZOLEDRÔNICO. CADA LINHA REPRESENTA O RESULTADO DE UM PACIENTE INDIVIDUAL. TNF $\alpha$ : FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA, IL-1 $\beta$ : INTERLEUCINA 1 BETA, IL-6: INTERLEUCINA 6, IL-17: INTERLEUCINA 17.

## 6.2 Avaliação de biomarcadores do metabolismo ósseo séricos

Cinquenta e sete pacientes, com média de idade de 66,84±9,38 anos, 64,9% do sexo feminino e 24 controles, com média de idade de 62,42±6,97 anos, 83,3% de sexo feminino foram incluídos nessa análise. O diagnóstico de doença óssea de Paget fora realizado em média há 8,51±6,36 anos, 38,6% apresentavam doença monostótica e 31,6% foram considerados estar em tratamento atualmente. História familiar de doença óssea de Paget foi relatada por 31,5% dos pacientes, presença de mutações do gene do sequestossomo 1 foi encontrada em 19,6% dos pacientes, sendo que 31,2% dos pacientes com história familiar positiva apresentavam mutações do gene SQSTM1.

Não houve diferenças estatisticamente significantes entre pacientes e o grupo controle com relação às concentrações séricas de esclerostina (11,51±6,74 pg/ml vs 12,24±6,20 pg/ml,  $p = 0,992$ ), DKK-1 (1280,14±1644,05 pg/ml vs 955,61±1007,63 pg/ml,  $p = 0,847$ ), sFRP-1 (24,33±33,79 pg/ml vs 27,78±16,67 pg/ml,  $p = 0,951$ ) e osteoprotegerina (249,63±292,25 pg/ml vs 281,71±241,34 pg/ml,  $p = 0,969$ ). Embora não se tenha observado diferenças estatisticamente significantes, os pacientes apresentaram maiores concentrações séricas de RANKL em relação aos controles, (110,27±214,40 pg/ml vs 24,69±8,00 pg/ml,  $p = 0,061$ ). As concentrações séricas de osteopontina foram significativamente mais elevadas nos pacientes do que nos controles (6724,19±6366,32 pg/ml vs 2201,33±2156,49 pg/ml,  $p = 0,002$ ) (Figura 4). Mais importante do que as concentrações séricas isoladas de osteoprotegerina e RANKL é a relação entre essas duas moléculas, já que a osteoprotegerina poderia ser considerada um antagonista competitivo do RANK. A relação entre as concentrações séricas de RANKL e osteoprotegerina foi calculada e embora os valores tenham sido mais elevados nos pacientes do que no grupo controle, a diferença não alcançou significância estatística (4,92 ±14,10 vs 0,97±2,14,  $p = 0,195$ ) (figura 4).

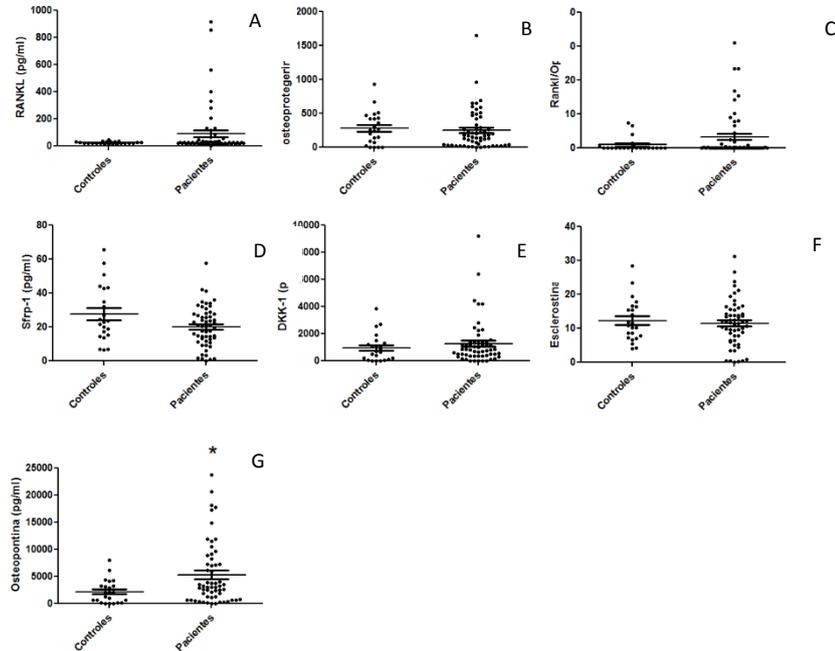


Figura 4 – Dosagem de biomarcadores do metabolismo ósseo: (A) Rankl, (B) osteoprotegerina, (C) relação entre Rankl e osteoprotegerina, (D) Dkk-1, (E) SFRP-1, (F) esclerostina e (G) osteopontina em paciente com doença óssea de Paget e controles com osteoartrite. Cada ponto representa o resultado de um paciente individual. Linhas representam média  $\pm$  desvio padrão da média. \* =  $p < 0,05$ , comparações foram realizadas com teste ANOVA. Rankl= ligante do receptor ativador de NF- $\kappa$ B, Dkk-1: Dickkopf 1, SFRP-1: proteína solúvel relacionada ao Frizzled 1.

Uma vez que as concentrações séricas de biomarcadores de metabolismo ósseo poderiam diferir entre pacientes com doença ativa e inativa, os resultados dos pacientes com doença ativa (n = 39) foram comparados com os dos controles. Essa abordagem revelou um padrão similar ao da comparação do grupo original de pacientes com os controles (tabela 6).

TABELA 6 - COMPARAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE BIOMARCADORES DO METABOLISMO ÓSSEO ENTRE PACIENTES COM DOENÇA ÓSSEA DE PAGET EM ATIVIDADE E CONTROLES.

	<b>Controles (n 24)</b>	<b>PDB com doença ativa (n 39)</b>	<b>p</b>
<b>RANKL (pg/ml)</b>	24,69 (8,00)	110,27 (214,40)	0,061
<b>Osteoprotegerina (pg/ml)</b>	281,71(241,34)	278,60 (328,49)	0,969
<b>DKK-1 (pg/ml)</b>	965,61(1007,63)	916,98 (921,26)	0,847
<b>SFRP-1 (pg/ml)</b>	27,28 (16,67)	27,23 (40,07)	0,951
<b>Esclerostina (pg/ml)</b>	12,24 (6,20)	12,25 (6,80)	0,992
<b>Osteopontina (pg/ml)</b>	2201,33 (2156,49)	6724,19 (6366,32)	<b>0,002</b>
<b>RANKL/Opg</b>	0,973 (2,14)	3,42 (7,06)	0,119

OS RESULTADOS FORAM EXPRESSOS EM MÉDIA± DESVIO PADRÃO DA MÉDIA (DP). AS COMPARAÇÕES ENTRE OS GRUPOS FORAM FEITAS COM TESTE ANOVA. RANKL= LIGANTE DO RECEPTOR ATIVADOR DE NFκB, DKK-1: DICKKOPF 1, SFRP-1: PROTEÍNA SOLÚVEL RELACIONADA AO FRIZZLED 1. RANKL/OPG- RELAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE RANKL E OSTEOPROTEGERINA.

Para investigar se as concentrações séricas de biomarcadores de metabolismo ósseo estariam sendo influenciadas pela atividade da doença óssea de Paget, as dosagens desses biomarcadores foram comparadas entre subgrupos de pacientes divididos de acordo com a atividade da doença e com o estado atual de tratamento. Nesse protocolo também foi investigado a existência de correlações entre as concentrações séricas de citocinas e: extensão da doença e as concentrações séricas de fosfatase alcalina óssea

Os resultados demonstraram que os pacientes com áreas de hipercaptação à cintilografia óssea (n=39) apresentaram concentrações séricas mais altas de fosfatase alcalina óssea ( $p = 0,032$ ) e osteopontina ( $p = 0,006$ ) e valores inferiores de DKK-1 ( $p = 0,011$ ). Não houve diferenças estatisticamente significativas nos demais parâmetros estudados ( $p > 0,05$ ) (Tabela 7). Tampouco houve diferenças estatisticamente significantes entre as concentrações séricas de biomarcadores do metabolismo ósseo entre os pacientes em vigência de tratamento (n=18) e sem tratamento atual ( $p > 0,05$ ) (tabela 7).

**TABELA 7 - COMPARAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE BIOMARCADORES DO METABOLISMO ÓSSEO EM PORTADORES DE DOENÇA ÓSSEA DE PAGET, DE ACORDO COM A ATIVIDADE DA DOENÇA E O TRATAMENTO ATUAL (USO DE BISFOSFADOS ORAIS NOS ÚLTIMOS 6 MESES OU ÁCIDO ZOLEDRÔNICO NOS ÚLTIMOS 12 MESES).**

	Atividade da Doença			Tratamento Atual		p**
	Ativa (n 39)	Inativa (n 18)	p*	Sim (n 18)	Não (n 39)	
<b>RANKL (pg/ml)</b>	110,27 (214,40)	158,83 (481,29)	0,598	69,66 (196,66)	151,43 (361,79)	0,374
<b>Osteoprotegerina (pg/ml)</b>	278,60 (328,49)	168,88 (184,55)	0,275	250,42 (202,24)	249,27 (327,98)	0,989
<b>DKK-1 (pg/ml)</b>	916,98 (921,26)	2113,27 (2493,30)	<b>0,011</b>	964,74 (739,30)	1429,54 (1922,34)	0,328
<b>sFRP-1 (pg/ml)</b>	27,23 (40,07)	18,06 (10,56)	0,346	23,95 (11,94)	24,51 (40,23)	0,955
<b>Esclerostina (pg/ml)</b>	12,25 (6,80)	9,80 (6,48)	0,214	13,29 (6,88)	10,47 (6,51)	0,096
<b>Osteopontina (pg/ml)</b>	6724,19 (6366,32)	2312,92 (2183,22)	<b>0,006</b>	5922,56 (1395,96)	5347,27(5768,54)	0,976
<b>RANKL/Opg</b>	3,42 (7,06)	8,12 (22,78)	0,248	2,23 (7,52)	6,11(16,10)	0,348
<b>FAO (U/l)</b>	59,56 (76,20)	19,77 (7,76)	<b>0,032</b>	28,59 (18,38)	55,38 (77,23)	0,154

Os resultados estão expressos em média± desvio padrão da média. As comparações foram realizadas com teste ANOVA. Rankl= ligante do receptor ativador de NFκB, Dkk-1: Dickkopf 1, SFRP-1: proteína solúvel relacionada ao Frizzled 1, Rankl/opg: relação entre as concentrações séricas de Rankl e osteoprotegerina, FAO: fosfatase alcalina óssea. \*p = diferenças estatísticas entre os grupos PDB com doença ativa e inativa, \*\*p = diferenças estatísticas entre os grupos PDB com e sem tratamento atual.

As concentrações séricas de fosfatase alcalina óssea apresentaram correlação linear significativa com as concentrações séricas de osteopontina ( $r = 0,549$ ,  $p < 0,001$ ). Não foram encontradas correlações lineares significativas entre as concentrações séricas dos demais biomarcadores e da fosfatase alcalina óssea (DKK-1:  $r = 0,065$ ,  $p = 0,636$ , sFRP1:  $r = -0,033$ ,  $p = 0,809$ , esclerostina:  $r = -0,124$ ,  $p = 0,368$ ), RANKL ( $r = 0,113$ ,  $p = 0,405$ ) e osteoprotegerina ( $r = -0,140$ ,  $p = 0,304$ ) (figura 5).

A extensão atual do acometimento pela doença, determinada pela extensão da hipercaptação à cintilografia óssea, apresentou correlação linear significativa com as concentrações séricas de osteopontina ( $r = 0,449$ ,  $p = 0,001$ ) e de fosfatase alcalina óssea ( $r = 0,547$ ,  $p < 0,001$ ) (figura 5). Não houve correlação linear significativa entre a extensão da doença e as concentrações dos demais biomarcadores pesquisados (DKK-1:  $r = -0,206$ ,  $p = 0,131$ , SFRP-1:  $r = 0,045$ ,  $p = 0,743$ , esclerostina  $r = -0,29$ ,  $p = 0,831$ , RANKL:  $r = 0,132$ ,  $p = 0,330$  e osteoprotegerina  $r = -0,023$ ,  $p = 0,868$ ).

Para avaliar se os biomarcadores poderiam estar correlacionados com as concentrações séricas de fosfatase alcalina óssea ou com a extensão da doença de maneira não linear, foi utilizado um procedimento de estimativa de curva empregando regressões com modelos linear, logarítmico, logístico, exponencial, de potência, quadrático e cúbico. Esses modelos confirmaram a correlação entre as concentrações séricas de fosfatase alcalina óssea e de osteopontina e entre as concentrações séricas de ambos biomarcadores e a extensão atual do acometimento óssea pela doença. No entanto, foi determinado que a curva que melhor se ajustou à correlação entre fosfatase alcalina óssea e osteopontina foi a do modelo de regressão logarítmico ( $r = 0,599$ ,  $p < 0,001$ ). Por outro lado, o modelo exponencial ajustou-se melhor às correlações entre a extensão da doença e as concentrações séricas de fosfatase alcalina óssea ( $r = 0,659$ ,  $p < 0,001$ ). Adicionalmente, esses modelos revelaram que as concentrações séricas de RANKL apresentavam correlação significativa, segundo o modelo exponencial, com a extensão atual da doença ( $r = 0,327$ ,  $p = 0,014$ ) e com as concentrações séricas de fosfatase alcalina ( $r = 0,324$ ,  $p = 0,015$ ) (figura 5).

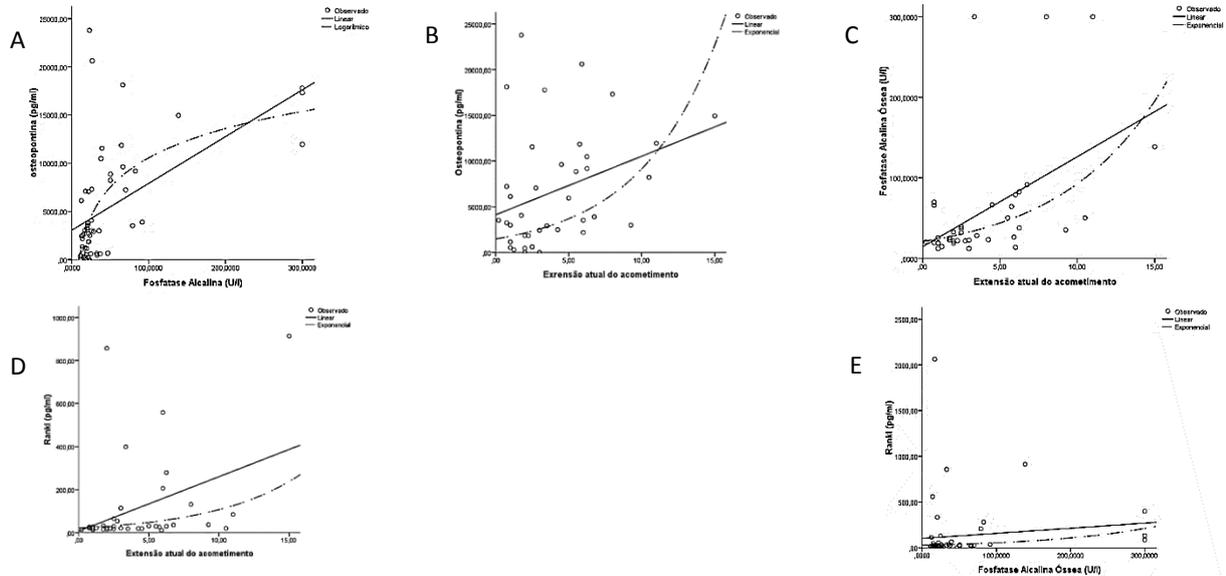
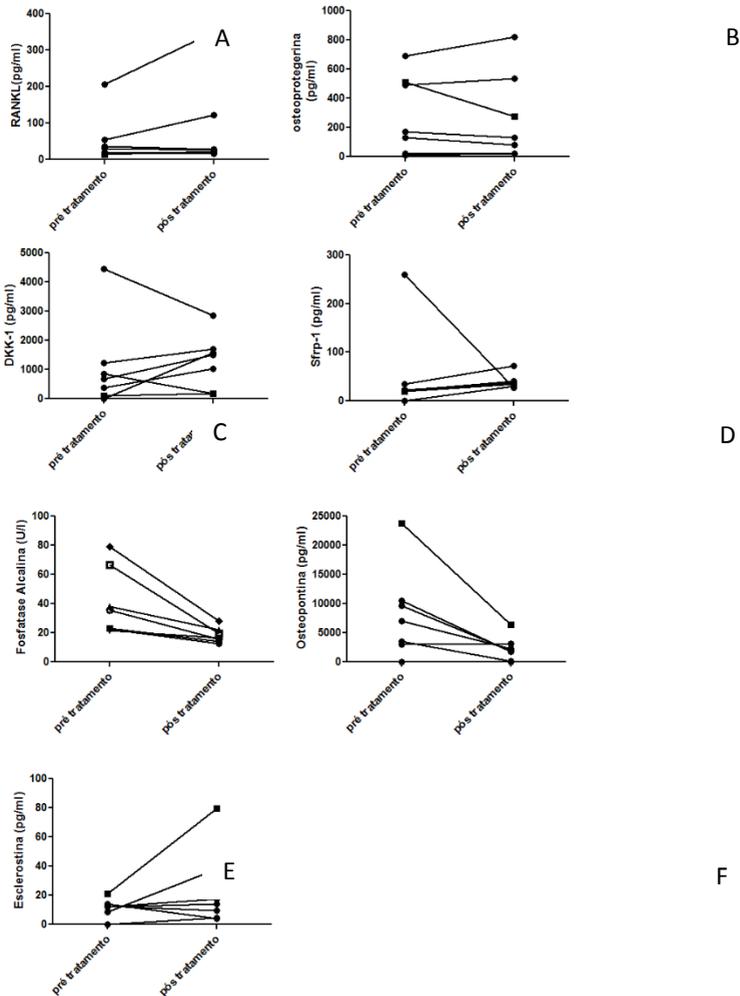


FIGURA 5 - CORRELAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE (A) OSTEOPONTINA E FOSFATASE ALCALINA ÓSSEA, (B) OSTEOPONTINA E A EXTENSÃO ATUAL DO ACOMETIMENTO PELA DOENÇA, (C) FOSFATASE ALCALINA ÓSSEA E EXTENSÃO ATUAL DO ACOMETIMENTO PELA DOENÇA, (D) RANKL E EXTENSÃO ATUAL DO ACOMETIMENTO PELA DOENÇA E (E) RANKL E FOSFATASE ALCALINA ÓSSEA EM 57 PACIENTES COM DOENÇA ÓSSEA DE PAGET. CADA PONTO REPRESENTA OS RESULTADOS DE UM PACIENTE INDIVIDUAL. AS LINHAS REPRESENTAM O RESULTADO DAS REGRESSÃO LINEAR, LOGARÍTMICA OU EXPONENCIAL.

Durante o período de coleta de dados, sete pacientes receberam tratamento com ácido zoledrônico 5 mg por via endovenosa. Novas amostras de sangue foram colhidas desses pacientes três meses após o tratamento para nova dosagem das concentrações séricas de citocinas e fosfatase alcalina óssea. Após o tratamento houve redução significativa nas concentrações séricas de fosfatase alcalina óssea ( $34,51 \pm 17,14$  U/l vs  $16,67 \pm 3,56$  U/l p = 0,035) e osteopontina ( $8208,52 \pm 7829,00$  pg/ml vs  $2263,19 \pm 2163,47$  pg/ml p = 0,041). As demais proteínas testadas apresentaram variações menos intensas e estatisticamente não significantes, cujos significados são de difícil interpretação devido ao pequeno número de pacientes (DKK-1:  $1101,52 \pm 1541,96$  pg/ml vs  $1293,21 \pm 940,27$  pg/ml, sfrp1:  $53,75 \pm 91,18$  pg/ml vs  $39,80 \pm 14,804$  pg/ml, esclerostina:  $11,52 \pm 6,32$  pg/ml vs  $23,48 \pm 27,45$  pg/ml, rankl:  $54,57 \pm 68,14$  pg/ml vs  $83,55 \pm 123,77$  pg/ml, osteoprotegerina  $289,29 \pm 269,85$  pg/ml vs  $269,15 \pm 303,43$  pg/ml) (figura 6).



**FIGURA 6 -** DOSAGEM DE BIOMARCADORES DO METABOLISMO ÓSSEO (A) RANKL, (B) OSTEOPROTEGERINA, (C) DKK-1, (D) SFRP-1, (E) OSTEOPONTINA, (F) FOSFATASE ALCALINA ÓSSEA E (G) E ESCLEROSTINA, EM 7 PACIENTES COM DOENÇA ÓSSEA DE PAGET ANTES E 3 MESES APÓS TRATAMENTO COM ÁCIDO ZOLEDRÔNICO. CADA LINHA REPRESENTA O RESULTADO DE UM PACIENTE INDIVIDUAL. RANKL= LIGANTE DO RECEPTOR ATIVADOR DE  $\text{NF}\kappa\text{B}$ , DKK-1: DICKKOPF 1, SFRP-1: PROTEÍNA SOLÚVEL RELACIONADA AO FRIZZLED 1.

### 6.3 Avaliação de polimorfismos genéticos

Nesse protocolo foram incluídos 72 pacientes, em sua maioria mulheres (62,5%), caucasianas (95,8%) com média de idade de 67,11±9,13 anos. História familiar de doença óssea de Paget foi detectada em 27% dos casos, 42,3% dos sujeitos foram considerados como tendo somente ascendência açoriana, 23,6% tinham ascendência alemã, 16,7% italiana, 8,3% ibérica (compreendendo espanhola e ascendência portuguesa, exceto dos Açores) e 8,5% apresentavam outras ascendências. A maior parte dos sujeitos apresentava doença polioestótica (62,5%).

#### 6.3.1 Análise do gene SQSTM 1

Quinze sujeitos (20,8%) apresentavam mutações no gene do SQSTM1 na região correspondente ao domínio de associação à ubiquitina da molécula do sequestossomo 1. Oito (11,1%) desses eram portadores da mutação Pro392Leu no exon 8, ao passo que os restantes apresentavam uma mutação ainda não descrita na literatura, Thr430Pro no exon 8. Os portadores desta mutação não eram aparentados. Não foram encontradas mutações no exon 7 do gene SQSTM1. Uma mutação não polimórfica em um domínio não codificante do gene SQSTM1, IVS8 +23 del15bp(CGTGCCCTCTCTG), 3'UTR, foi encontrada em dois (2,7%) sujeitos não relacionados entre si e sem história de doença familiar. Mutações polimórficas em regiões não codificantes do gene foram encontradas em 10 sujeitos: IVS7 - 60 A>G no intron 6 (em 3 sujeitos), IVS7 - 60 A>G no intron 6, IVS8 + 189 insTG, 3'UTR (em 3 sujeitos), IVS7 + 86 delAAG, no intron 7. Dois (2,7%) sujeitos eram portadores de 2 mutações (IVS7 - 60 A>G no intron 6; IVS8 + 189 insTG 3'UTR).

Em relação à história familiar, mutações em regiões codificantes do gene SQSTM1 foram encontradas em 20,4% dos casos esporádicos e em 25% dos casos familiares ( $p = 0,19$ ).

A tabela 8 relaciona as características clínicas dos portadores de mutações no domínio de associação à ubiquitina da molécula do sequestossomo 1. É digno de nota o fato que todos os portadores dessas

mutações apresentavam doença poliostótica, ao passo que essa forma da doença era apresentada por apenas 62,5% dos portadores da forma nativa do gene. A comparação de outros parâmetros clínicos revelou apenas diferenças mínimas, cuja interpretação é comprometida devido ao pequeno número de sujeitos.

Não foram encontradas associações entre a presença de mutações do gene SQSTM1 e nenhuma ascendência em particular embora, mais uma vez, o pequeno número de sujeitos em cada grupo tenha tornado a comparação difícil (tabela 9).

Foi possível recuperar dados confiáveis sobre a extensão máxima da doença de 58 pacientes, sendo 46 com a forma nativa do gene SQSTM1, 6 com a mutação P392L e 6 com a mutação T340P. Os portadores de mutações apresentaram maior extensão de acometimento ósseo (extensão: P392L:  $8,28 \pm 3,4$ ; T340P:  $8,70 \pm 3,7$ ) do que os pacientes com a forma nativa do gene (extensão:  $5,99 \pm 4,45$ ), embora a diferença não tenha alcançado significância estatística ( $p = 0,235$ ).

**TABELA 8 - COMPARAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE 72 PORTADORES DE DOENÇA ÓSSEA DE PAGET, DE ACORDO COM A PRESENÇA DE MUTAÇÕES DO DOMÍNIO DE ASSOCIAÇÃO À UBIQUITINA DO GENE SQSTM1.**

Mutação	Sexo Feminino	Poliostótica	História Familiar	Dor	Deformidades	Osteoartrite	Fraturas Secundárias à PDB	Déficit auditivo	Hidrocefalia
<b>P392L (N = 8)</b>	62,5%	100%	25%	25%	0%	40%	12,5%	0%	0%
<b>T430P (N = 7)</b>	57,1%	100%	42,9%	71,4%	28,6%	42,9%	0%	14,3%	14,3%
<b>Nativo (N = 57)</b>	63,2%	52,6%	27,8%	70,2%	17,0%	15,6%	0%	7%	7,5%
<b>p</b>	0,953	<b>0,003</b>	0,686	0,04	0,343	0,142	0,018	0,554	0,568

Os resultados foram expressos em percentuais. As comparações foram realizadas com teste Qui-quadrado bicaudado, com nível de significância de 0,05. PDB: doença óssea de Paget.

**TABELA 9 - COMPARAÇÃO DA ASCENDÊNCIA DE 72 PORTADORES DE DOENÇA ÓSSEA DE PAGET DE ACORDO COM A PRESENÇA DE MUTAÇÕES DO DOMÍNIO DE ASSOCIAÇÃO À UBIQUITINA DO GENE SQSTM1**

		<b>Açoriano</b>	<b>Ibérico</b>	<b>Alemão</b>	<b>Italiano</b>	<b>Outros</b>
<b>Mutação do gene</b>	<b>P392L (N = 8)</b>	50,0%	25%	12,5%	0%	12,5%
<b>SQSTM1</b>	<b>T430P (N = 7)</b>	28,6%	14,3%	28,6%	28,6%	0
	<b>Nativo (N = 57)</b>	43,9%	5,3%	24,6%	17,5%	8,8%
<b>Polimorfismo do gene TNFRSF11B</b>	<b>CC (N = 16)</b>	31,2%	6,2%	18,8%	31,2%	12,5%
	<b>GC (N = 31)</b>	45,2%	9,7%	22,6%	16,1%	6,5%
	<b>GG (N=25)</b>	48%	8%	28%	8%	8%
<b>Polimorfismo do gene TNFRSF11A</b>	<b>CC (N = 6)</b>	33,3%	16,7%	33,3%	16,7%	0%
	<b>CT (N = 40)</b>	17%	10%	17,5%	20%	10%
	<b>TT (N = 26)</b>	31%	3,8%	30,8%	7,7%	7,7%

Os resultados estão expressos em percentuais

### 6.3.2 Análise do gene VCP

Nenhum sujeito apresentou mutações nos exons 3 ou 5 do gene do VCP. Uma variação não polimórfica foi encontrada no exon 2 em um paciente (IVS2-42 C>T, intron 2). Contudo, uma análise *in silico* demonstrou em tal mutação não é capaz de modificar o “splicing” desse gene e portanto, provavelmente não está relacionada ao desenvolvimento da doença óssea de Paget.

### 6.3.3 Análise do gene TNFRSF11B

Os sujeitos foram avaliados em busca de um polimorfismo específico – G118C – no exon 1 do gene TNFRSF11B. Cinquenta e sete sujeitos (79,2%) eram portadores do alelo G, sendo 43,1% monoalélicos e 34,7% dialélicos. A presença dos diferentes alelos não se relacionou significativamente a nenhuma característica clínica da doença óssea de Paget (tabela 10). Tampouco foi encontrada associação entre o referido polimorfismo e qualquer ascendência em particular (tabela 6). Da mesma forma, não houve diferenças significativas entre os grupos de acordo com a extensão máxima da doença (CC 4,485±3,13 – 10 sujeitos (13,8%); GC 7,55±4,78 – 25 sujeitos (34,7%); GG 6,26±4,58 – 23 sujeitos (31,9%),  $p = 0,183$ ). Não houve diferenças significativas na frequência dos alelos em relação à história familiar (presença de qualquer um dos alelos G: casos familiares 85%, casos esporádicos 75,5%,  $p = 0,280$ ), mas a presença do alelo G foi mais comum entre mulheres do que entre homens (mulheres 84,4%, homens 70,4%,  $p = 0,851$ ).

**TABELA 10** - COMPARAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE 72 PORTADORES DE DOENÇA ÓSSEA DE PAGET DE ACORDO COM A PRESENÇA DE POLIMORFISMOS NO EXON 1 DO GENE TNFRSF11B.

<b>Alelo do gene TNFRSF11B</b>	<b>Sexo feminino</b>	<b>Poliostótica</b>	<b>História familiar</b>	<b>Dor</b>	<b>Deformidades</b>	<b>Osteoartrite</b>	<b>Fraturas</b>	<b>Déficit auditivo</b>	<b>Hidrocefalia</b>
<b>CC</b>	50,0%	62,5%	18,8%	62,5%	6,7%	27,3%	0%	12,5%	14,3%
<b>GC</b>	64,5%	61,3%	41,4%	71%	20,7%	28%	3,2%	9,7%	6,7%
<b>GG</b>	68%	64%	20,8%	60%	17,4%	9,5%	0%	0%	4,2%
<b>p*</b>	0,486	0,979	0,153	0,669	0,487	0,264	0,520	0,224	0,505
<b>Ao menos um alelo G</b>	66,7%	63,2	31,5%	66,7%	18,9%	19,6%	1,8%	5,3%	5,5%
<b>p**</b>	0,230	0,822	0,389	0,629	0,292	0,683	0,602	0,274	0,217

Os resultados foram expressos em percentuais. As comparações foram realizadas com teste Qui-quadrado bicaudado, com nível de significância de 0,05. \*p = diferenças estatísticas entre os portadores dos alelos CC, GC e GG, \*\*p = diferenças estatísticas entre os portadores dos alelos CC e de ao menos um alelo G.

### 6.3.4 Análise do gene TNFRSF11A

Os sujeitos foram avaliados em busca de um polimorfismo específico – T575C – no exon 6 do gene TNFRSF11A. O alelo C foi encontrado em 63,9% dos sujeitos, sendo 55,6% dizigóticos e 8,3% monozigóticos.

Os diferentes alelos não se associaram a nenhuma característica clínica da doença óssea de Paget (tabela 11). Não foram encontradas associações entre os polimorfismos desse gene e nenhuma ascendência específica (Tabela 9). Tampouco foram encontradas diferenças significativas entre os portadores dos diversos alelos no tocante à extensão máxima da doença (C  $7.05 \pm 5.44 - 5$  (6,9%) sujeitos; CT  $6.82 \pm 5.29 - 33$  (45,83%) sujeitos; TT  $6.88 \pm 2.71 - 20$  (27,7%) sujeitos,  $p = 0.743$ ). Não houve diferenças significativas na frequência dos alelos em relação à história familiar (presença de qualquer um dos alelos C: casos familiares 67,3%, casos esporádicos 65%,  $p = 0,522$ ). O alelo C foi encontrado mais frequentemente em homens (homens 74,1%, mulheres 60%,  $p = 0,308$ ).

**TABELA 11 - COMPARAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE 72 PORTADORES DE DOENÇA ÓSSEA DE PAGET DE ACORDO COM A PRESENÇA DE POLIMORFISMOS NO EXON 6 DO GENE TNFRSF11A.**

Alelo do gene TNFRSF11A	Sexo feminino	Poliostótica	História familiar	Dor	Deformidades	Osteoartrite	Fraturas	Déficit auditivo	Hidrocefalia
CC (N = 6)	50%	83,5%	50%	83,3%	50%	20%	0%	0%	16,7%
CT (N = 40)	57,5%	62,5%	25,6%	60%	10,3%	24,2%	2,6%	10%	7,9%
TT (N = 26)	73,1%	57,7%	29,2%	69,2%	18,2%	15,8%	0%	3,8%	4,2%
p*	0,356	0,505	0,472	0,464	0,048	0,770	0,660	0,494	0,566
Ao menos um alelo C (N = 66)	75,4%	63,8%	28,3%	61,7%	15,2%	23,9%	2,2%	8,5%	8,9%
p**	0,225	0,749	0,851	0,382	0,695	0,491	0,458	0,473	0,497

Os resultados foram expressos em percentuais. As comparações foram realizadas com teste Qui-quadrado bicaudado, com nível de significância de 0,05. p\* = diferenças estatísticas entre os portadores dos alelos CC, CT e TT, \*\*p = diferenças estatísticas entre os portadores dos alelos TT e de ao menos um alelo C.

## 6.4 Avaliação de índices de qualidade de vida

Setenta e sete pacientes foram avaliados e cinquenta foram incluídos na análise de qualidade de vida. Os sujeitos eram majoritariamente mulheres (60,8%), caucasianos (96,8%) e casados (80,6%). A média de idade dos sujeitos foi  $66,32 \pm 8,65$  anos e o tempo médio desde o diagnóstico de  $7,69 \pm 6,15$  anos. A maior parte dos pacientes apresentava doença polioestótica (74,2%) e 29% tinham história familiar positiva. À avaliação das cintilografias ósseas, 38,7% apresentavam doença em atividade; 41,9% foram considerados em vigência de tratamento. Dor óssea em algum momento foi relatada por 56,9% dos pacientes, mas apenas 32,3% apresentavam dor óssea no momento da avaliação; 19,4% apresentavam deformidades, 12,9% alguma incapacidade decorrente da doença óssea de Paget e 32,3% apresentavam osteoartrite secundária às alterações morfológicas decorrentes da doença óssea de Paget (tabela 12).

### 6.4.1 Questionário SF-36

As medianas dos escores do questionário SF-36 foram: escore total 60,91 (38,81 – 78,54) (figura 7), escore do componente saúde física: 62,60 (38,20 – 75,80) e escore do componente saúde mental: 59,70 (41,30 – 79,90). Os resultados dos escores do questionário SF-36 (Total, Saúde Física e Saúde Mental) não diferiram significativamente quando comparados em grupos divididos por: sexo, tipo de envolvimento (mono ou polioestótico), atividade da doença atual, estar em vigência de tratamento, presença de incapacidades secundárias à doença óssea de Paget ou osteoartrite secundária. Os resultados do escore total do questionário SF-36 e de ambos os seus domínios diferiram significativamente quando os pacientes foram divididos de acordo com a presença de: dor óssea atual ( $p = 0,027, 0,008$  e  $0,15$ , respectivamente) e deformidades ( $p = 0,011, 0,012$  e  $0,017$ , respectivamente). O estado civil apresentou associação significativa com o escore total do questionário SF-36 e com seu domínio Saúde Mental ( $p = 0,046$  e  $0,016$ , respectivamente), mas não com o domínio Saúde Física

(tabela 13). As concentrações séricas de fosfatase alcalina óssea e a extensão da doença apresentaram correlação significativa com o domínio Saúde Física do questionário SF-36 ( $p = 0,038$  e  $0,03$ , respectivamente). O tempo desde o diagnóstico não apresentou correlação significativa com nenhum dos escores do questionário SF-36 (tabela 14).

**TABELA 12 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE 50 PACIENTES COM DOENÇA ÓSSEA DE PAGET (PDB).**

<b>Idade (anos)</b>		66,32 (8,65)
<b>Sexo</b>	<b>Feminino</b>	60,8%
	<b>Masculino</b>	39,2%
<b>Etnia</b>	<b>Caucasianos</b>	96,8%
	<b>Afrobrasileiros</b>	3,2%
<b>Estado civil</b>	<b>Casado</b>	80,6%
	<b>Solteiro ou viúvo</b>	19,4%
<b>Forma</b>	<b>Monostótica</b>	25,8%
	<b>Poliostótica</b>	74,2%
<b>Tempo desde o diagnóstico</b>		7,69 (6,15)
<b>História familiar</b>		29%(12,9-45,2)
<b>Doença ativa à cintilografia</b>		38,7% (22,6-54,8)
<b>Tratamento atual</b>		41,9%(25,8-58,1)
<b>Extensão da doença</b>		2,21 (2,70)
<b>Fosfatase alcalina óssea (U/l)</b>		33,78 (42,83)
<b>Dor óssea</b>		32,3%(16,1-48,4)
<b>Deformidades</b>		19,4%(6,5-32,3)
<b>Incapacidade devido à PDB</b>		12,9%(3,2-25,8)
<b>Déficit auditivo</b>		3,2%(0-9,7)
<b>Hipertensão intracraniana</b>		3,2%(0-9,7)
<b>Osteoartrite secundária à PDB</b>		32,3%(19,4-51,6)
<b>Fratura secundária à PDB</b>		3,2%(0-9,7)
<b>Osteossarcoma</b>		0

Os resultados foram expressos em percentuais (Intervalo de confiança 95%) ou em média (desvio padrão). PDB= doença óssea de Paget

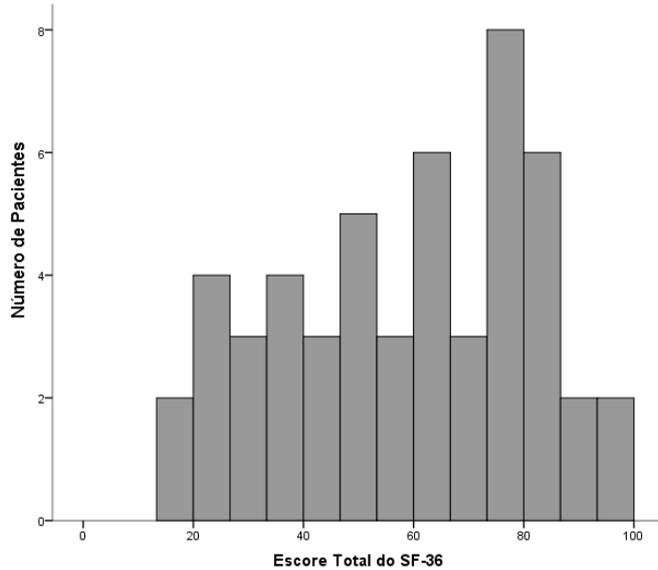
**TABELA 13 - RESULTADOS DO QUESTIONÁRIO SF-36 EM 50 PACIENTES COM DOENÇA ÓSSEA DE PAGET DIVIDIDOS DE ACORDO COM SUAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.**

		SF-36		
		Domínio Saúde Física	Domínio Saúde Mental	Escore Total
<b>Sexo</b>	<b>Feminino</b>	50,60 (38,20-72,80)	59,70 (38,80-80,90)	60,27 (38,81-75,68)
	<b>Masculino</b>	73,80 (36,60-82,80)	68,56 (41,30-79,90)	75,93 (35,43-80,18)
	<b>p</b>	0,316	0,707	0,506
<b>Estado Civil</b>	<b>Casado</b>	61,10 (40,80-75,80)	65,25 (42,7-80,90)	63,48 (40,81-79,00)
	<b>Solteiro/Viúvo</b>	44,80 (30,20-59,60)	38,50 (35,46-59,70)	45,29 (31,06-60,91)
	<b>p</b>	0,097	<b>0,016</b>	<b>0,046</b>
<b>Forma</b>	<b>Poliostótico</b>	69,60 (41,20-82,80)	60,80 (41,30-71,90)	75,68 (38,81-76,12)
	<b>Monostótico</b>	50,40 (38,20-73,80)	56,63 (41,30-71,90)	60,07 (40,56-76,12)
	<b>p</b>	0,159	0,313	0,285
<b>Atividade à cintilografia</b>	<b>Sim</b>	46,40 (30,20-69,60)	53,45 (38,50-81,80)	47,37 (35,43-75,93)
	<b>Não</b>	66,80 (48,00-75,80)	63,60 (50,36-75,50)	62,10 (47,85-79,18)
	<b>p</b>	0,114	0,213	0,131

<b>Tratamento atual</b>	<b>Sim</b>	55,10 (40,80-75,6)	60,41 (43,20-79,90)	60,59 (40,81-79,18)
	<b>Não</b>	63,6 (36,6-76,8)	56,70 (38,80-74,06)	61,31 (38,50-78,41)
	<b>p</b>	0,894	0,594	0,581
<b>Dor óssea</b>	<b>Sim</b>	42,20 (29,4-64,60)	43,20 (38,50-56,00)	47,00 (32,16-60,91)
	<b>Não</b>	69,60 (44,80-77,80)	68,39 (51,80-81,80)	72,71 (47-79,18)
	<b>p</b>	<b>0,027</b>	<b>0,008</b>	<b>0,015</b>
<b>Deformidades</b>	<b>Sim</b>	40,70 (24,30-45,80)	40,38 (32,21-48,63)	40,68 (27,31-46,57)
	<b>Não</b>	64,60 (41,20-77,80)	61,13 (43,20-80,90)	62,10 (47,00-79,18)
	<b>p</b>	<b>0,011</b>	<b>0,012</b>	<b>0,017</b>
<b>Incapacidade secundária à doença óssea de Paget</b>	<b>Sim</b>	43,50 (34,80-48,00)	53,28 (41,30-59,70)	47,42 (35,43-54,70)
	<b>Não</b>	64,60 (40,60-76,80)	60,80 (42,36-80,90)	62,10 (40,56-79,00)
	<b>p</b>	0,113	0,268	0,151
<b>Osteoartrite secundária à doença óssea de Paget</b>	<b>Sim</b>	41,40 (31,00-73,20)	46,53 (36,31-73,68)	43,78 (33,50-78,70)
	<b>Não</b>	63,10 (40,80-77,80)	67,56 (46,90-81,80)	65,90 (40,80-80,35)
	<b>p</b>	0,281	0,195	0,195

---

Os resultados estão expressos em mediana (percentis 25% e 75%). As comparações foram realizadas com teste U Mann-Whitney U com nível de significância de 5%



**FIGURA 7 – DISTRIBUIÇÃO DO ESCORE TOTAL DO QUESTIONÁRIO SF-36 EM 50 PACIENTES COM DOENÇA ÓSSEA DE PAGET.**

**TABELA 14 - CORRELAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS CONTÍNUAS E OS RESULTADOS DO QUESTIONÁRIO SF-36 EM 50 PACIENTES COM DOENÇA ÓSSEA DE PAGET.**

	SF-36					
	Domínio Saúde Física		Domínio Saúde Mental		Escore Total	
	r	p	r	p	r	p
<b>Idade (anos)</b>	-0,123	0,396	-0,092	0,523	-0,47	0,744
<b>Tempo desde o diagnóstico</b>	-0,20	0,891	-0,136	0,341	-0,54	0,708
<b>Extensão da doença</b>	-0,308	<b>0,030</b>	-0,255	0,074	-0,276	0,052
<b>Fosfatase alcalina óssea</b>	-0,307	<b>0,038</b>	-0,226	0,131	-0,272	0,068

Os resultados foram analisados com o teste Rho de Spearman com nível de significância de 5%.

Para a análise multivariada foram incluídos parâmetros que apresentaram associação positiva com os resultados do questionário SF-36 (dor óssea atual, deformidades, estado civil e extensão da doença) e alguns fatores teoricamente associados a piores resultados: idade, limitações e deformidades. As concentrações séricas de fosfatase alcalina óssea foram excluídas devido a sua correlação com a extensão da doença ( $r$  0,673  $p < 0,001$ ). Após a análise multivariada, os únicos parâmetros que persistiram significativamente associados aos resultados do escore total e dos domínios do questionários SF-36 foram: dor óssea e estado civil ( $p$ , respectivamente, dor: 0,001, 0,002 e 0,003; estado civil: 0,005, 0,003 e 0,015) (tabela 15).

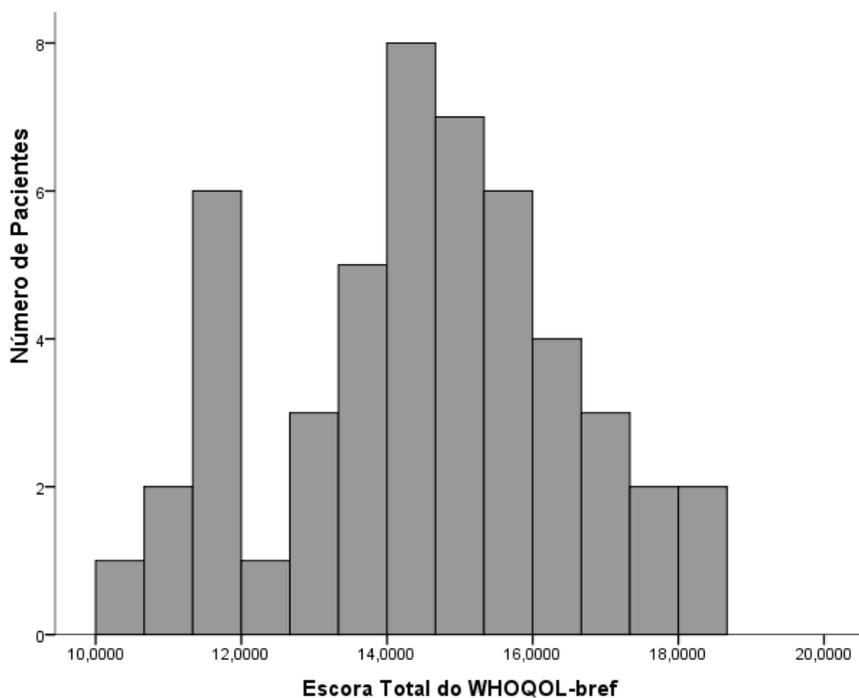
**TABELA 15 - ANÁLISE MULTIVARIADA DA RELAÇÃO ENTRE VARIÁVEIS CLÍNICAS E OS RESULTADOS DO QUESTIONÁRIO SF-36 DE 50 PACIENTES COM DOENÇA ÓSSEA DE PAGET.**

	<b>SF-36</b>					
	<b>Domínio Saúde Física</b>		<b>Domínio Saúde Mental</b>		<b>Escore Total</b>	
	<b>B</b>	<b>p</b>	<b>B</b>	<b>p</b>	<b>B</b>	<b>p</b>
<b>Estado civil</b>	21,397	<b>0,015</b>	23,746	<b>0,003</b>	22,983	<b>0,005</b>
<b>Dor óssea</b>	20,051	<b>0,003</b>	18,767	<b>0,002</b>	21,344	<b>0,001</b>
<b>Extensão da doença</b>	0,075	0,957	0,127	0,920	0,276	0,831
<b>Idade</b>	-0,727	0,055	-0,412	0,232	-0,523	0,137
<b>Deformidades</b>	12,177	0,148	12,225	0,111	12,523	0,109
<b>Incapacidade devido à doença de Paget</b>	9,294	0,305	1,132	0,891	6,376	0,448

O resultados foram expressos como estimativas de parâmetros (B).

#### 6.4.2 Questionário WHOQOL-bref

O escore mediano do questionário WHOQOL-bref foi 14,61 (13,03 – 15,69) (figura 8). As medianas dos resultados de seus domínios foram: domínio 1 (função física): 14,28 (12,00-16,14), domínio 2 (psicológico): 14,66 (13,81-17,33), domínio 3 (relações sociais): 15,33 (13,33-16,00), domínio 4 (ambiente): 14,5 (12,89-16,00). O escore total do questionário WHOQOL-bref apresentou associação significativa com: dor, incapacidade física e presença de deformidades ( $p = 0,019, 0,016$  e  $0,006$ , respectivamente). Não esteve associado a: sexo, estado civil, atividade atual da doença, tratamento atual, osteoartrite secundária ou tipo de envolvimento (mono ou poliostótico) (tabela 16). Não houve correlação entre o escore total do questionário WHOQOL-bref e: fosfatase alcalina óssea, tempo desde o diagnóstico e extensão da doença (tabela 17).



*Figura 8-* Distribuição dos resultados do questionário WHOQOL-bref em 50 pacientes com doença óssea de Paget

**TABELA 16-** RESULTADOS DO QUESTIONÁRIO WHOQOL-BREF EM 50 PACIENTES COM DOENÇA ÓSSEA DE PAGET DIVIDIDOS DE ACORDO COM SUAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.

		WHOQOL-bref		
		Domínio 1	Domínio 2	Escore total
<b>Sexo</b>	<b>Feminino</b>	14,28(11,42-15,42)	14,66(12,66-16,66)	14,83(12,92-15,69)
	<b>Masculino</b>	13,71 (10,28-15,42)	15,33 (14,00-17,33)	14,30 (13,07-16,46)
	<b>p</b>	0,674	0,325	0,897
<b>Estado Civil</b>	<b>Casado</b>	14,28 (12,00-16,00)	15,33 (14,00-17,33)	14,61 (13,53-15,69)
	<b>Solteiro/viúvo</b>	11,42 (10,29-12,57)	13,33 (12,00-14,66)	12,76 (11,84-14,92)
	<b>p</b>	<b>0,042</b>	<b>0,029</b>	0,092
<b>Forma</b>	<b>Poliostótica</b>	14,85 (13,14-15,42)	16,66 (14,66-17,33)	15,46 (14,38-16,30)
	<b>Monostótica</b>	14,00 910,29-15,42)	14,66 (12,66-15,33)	14,22 (12,64-15,23)
	<b>p</b>	0,252	<b>0,031</b>	0,069
<b>Atividade à cintilografia óssea</b>	<b>Sim</b>	13,71 (10,29-15,43)	14,66 (12,66-16,66)	14,53 (11,84-15,69)
	<b>Não</b>	14,28 (11,71-15,420)	14,99 (14,66-17,33)	14,76 (13,80-15,84)
	<b>p</b>	0,384	0,220	0,257

Tratamento atual	Sim	13,71 (11,42-14,28)	14,66 (14,00-15,33)	14,22 (13,07-15,07)
	Não	14,85 (11,14-16,00)	15,33 (13,33-17,33)	15,03 (13,15-16,46)
	p	0,147	0,322	0,324
Dor óssea	Sim	11,43 (10,29-14,28)	14,66 (12,66-15,33)	13,38 (11,84-14,92)
	Não	14,86 (12,57-16,00)	15,33 (14,00-17,33)	14,92 (14,15-16,46)
	p	<b>0,011</b>	0,123	<b>0,019</b>
Deformidades	Sim	10,00 (9,43-12,57)	13,66 (12,00-16,33)	12,45 (11,22-13,84)
	Não	14,28 (12,00-15,43)	14,99 (14,00-17,33)	14,92 (13,60-16,15)
	P	<b>0,010</b>	0,302	<b>0,006</b>
Incapacidade devido à doença óssea de Paget	Sim	11,71 (9,71-12,57)	13,00 (12,66-14,66)	12,78 (12,00-13,07)
	Não	14,28 (11,42-15,71)	15,33 (14,00-17,33)	14,87 (13,56-15,92)
	p	0,053	<b>0,021</b>	<b>0,016</b>
Osteoartrite secundária à doença óssea de Paget	Sim	11,42 (9,71-15,42)	14,66 (12,66-17,33)	14,15 (11,84-15,53)
	Não	14,28 (11,43-16,00)	14,93 (14,00-16,66)	14,61 (13,38-15,69)
	p	0,204	0,935	0,544

Os resultados estão expressos em medianas (percentis 25% e 75%). As comparações foram realizadas com teste U de Mann-Whitney, com nível de significância de 5%.

**TABELA 17** - CORRELAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS CONTÍNUAS E OS RESULTADOS DO QUESTIONÁRIO WHOQOL-BREF EM 50 PACIENTES COM DOENÇA ÓSSEA DE PAGET.

	WHOQOL-bref					
	Domínio 1		Domínio 2		Escore Total	
	r	p	r	p	r	p
<b>Idade</b>	0,008	0,956	0,069	0,637	0,094	0,519
<b>Tempo desde o diagnóstico</b>	0,001	0,995	-0,080	0,580	-0,051	0,723
<b>Extensão da doença</b>	-0,167	0,250	-0,089	0,542	-0,205	0,157
<b>Fosfatase alcalina óssea</b>	-0,226	0,131	-0,256	0,087	-0,257	0,085

Os resultados foram analisados com o teste Rho de Spearman com nível de significância de 5%.

Dentre os domínios do escore WHOQOL-bref, apenas os resultados do componentes físico (domínio 1) e psicológico (domínio 2) foram submetidos a análises adicionais. Os resultados do domínio 1 associaram-se significativamente a: estado civil, dor óssea e deformidades ( $p = 0,042, 0,011$  e  $0,010$ , respectivamente) mas não com sexo, incapacidade, tipo de envolvimento, osteoartrite secundária ou atividade da doença. Os resultados do domínio 2 apresentaram associação estatisticamente significativa com: estado civil, incapacidade e tipo de envolvimento ( $p = 0,029, 0,021$  e  $0,031$ , respectivamente), mas não com sexo, dor óssea, atividade da doença, deformidades e osteoartrite secundária (tabela 16). Não houve associação de ambos os domínios com: fosfatase alcalina óssea, idade, tempo desde o diagnóstico e extensão da doença (tabela 17).

A análise multivariada foi realizada com os mesmos parâmetros escolhidos para a análise dos resultados do questionário SF-36. Os resultados do escore total do questionário WHOQOL-bref e de seu domínio 1 associaram-se significativamente a: dor óssea, deformidades e estado civil. ( $p$ , respectivamente, escore total:  $0,040, 0,013, 0,031$ ; domínio 1:  $0,022, 0,004, 0,004$ ). O domínio 2 do questionário WHOQOL-bref apresentou associação significativa com dor e estado civil ( $p = 0,032$  e  $0,003$ , respectivamente) (tabela 18).

Os resultados dos escores totais de ambos os questionários, SF-36 e WHOQOL-bref, apresentaram boa correlação entre si ( $r = 0,741, p < 0,001$ ).

**TABELA 18** - ANÁLISE MULTIVARIADA DA RELAÇÃO ENTRE VARIÁVEIS CLÍNICAS E OS RESULTADOS DO QUESTIONÁRIO WHOQOL-BREF DE 50 PACIENTES COM DOENÇA ÓSSEA DE PAGET.

	WHOQOL-bref					
	Domínio 1		Domínio 2		Escore Total	
	B	p	B	p	B	p
<b>Estado Civil</b>	3,012	<b>0,004</b>	2,715	<b>0,003</b>	1,666	<b>0,031</b>
<b>Dor óssea</b>	2,002	<b>0,022</b>	1,625	<b>0,032</b>	1,325	<b>0,040</b>
<b>Extensão da doença</b>	0,306	0,081	0,119	0,433	0,095	0,465
<b>Idade</b>	0,064	0,143	0,049	0,197	0,580	0,710
<b>Deformidades</b>	2,917	<b>0,004</b>	0,699	0,428	1,862	<b>0,013</b>
<b>Incapacidade secundária à doença óssea de Paget</b>	0,838	0,477	0,958	0,347	1,184	0,173

O resultados foram expressos como estimativas de parâmetros (B).

## 7. DISCUSSÃO

O advento dos potentes bisfosfonados endovenosos, como o ácido zoledrônico, representou um grande avanço no tratamento da doença óssea de Paget, resultando em efetivo controle da doença na grande maioria dos pacientes (92). Ao mesmo tempo, o sucesso desse medicamento, cujo principal alvo são osteoclastos, reforçou o papel primordial dessas células na patogênese dessa doença.

No entanto, ainda há muito por ser elucidado, incluindo as bases genéticas da doença na maior parte dos casos familiares, os motivos do padrão de herança com penetrância incompleta, o papel das infecções virais e quais os outros possíveis fatores ambientais importantes na patogênese, o porquê de afetar alguns ossos e poupar outros e os mecanismos intracelulares que resultam na hiperatividade dos osteoclastos.

Os resultados do presente estudo demonstraram que portadores de doença óssea de Paget apresentam, em comparação com controles, concentrações séricas mais elevadas de IL-6 mas menores concentrações de IL-17. Não houve diferenças significativas nas concentrações séricas de TNF $\alpha$  ou IL-1 $\beta$ . É deveras interessante que as concentrações séricas de citocinas inflamatórias, ao contrário do esperado, não apresentaram relação significativa com a presença de atividade da doença, concentração de fosfatase alcalina óssea ou com a extensão do acometimento à cintilografia óssea. Contudo, o tratamento de um pequeno grupo de pacientes com ácido zoledrônico resultou com reduções das concentrações séricas de TNF  $\alpha$ , IL-1  $\beta$ , IL-6 e em aumento nas concentrações séricas de IL-17.

A literatura sobre citocinas inflamatórias em portadores de doença óssea de Paget é escassa. Há um estudo publicado que relatou concentrações aumentadas em amostras de soro de pacientes com doença óssea de Paget (93) e dois outros estudos com resultados

opostos, embora o número de pacientes avaliados tenha sido bastante menor do que o do presente estudo (82,94).

Além deste estudo, apenas um trabalho prévio investigou as concentrações séricas de IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$  (77) nessa população, não tendo encontrado, a exemplo do presente estudo, diferenças significativas entre pacientes e controles. Não há estudos publicados além do presente que relatem concentrações séricas de IL-17 em portadores de doença óssea de Paget.

O aumento da concentração de IL-6 no soro dos pacientes poderia ser produzido pelo próprio osso pagético, uma vez que já foi demonstrado hiperexpressão de IL-6 em osteoblastos e osteoclastos de ossos afetados pela doença de Paget (95), ou por células do sistema imune, cuja função poderia, em tese, ser afetada pelas mesmas mutações que predispõe à doença óssea de Paget. A última hipótese soa atraente, já que as concentrações séricas de IL-6 e IL-17 não apresentaram correlação com as concentrações séricas de fosfatase alcalina óssea ou com a extensão do acometimento ósseo. No entanto, o tratamento com ácido zoledrônico resultou em intensa redução das concentrações séricas de IL-6, IL-1  $\beta$  e TNF e em aumento das concentrações séricas de IL-17. Isso indica que a mais provável fonte das alterações é o tecido ósseo, o alvo da ação dos bisfosfonados. Uma possível hipótese para explicar esses achados aparentemente contraditórios seria um envolvimento global do esqueleto na doença de Paget, ou seja, mesmo ossos aparentemente poupados teriam um fenótipo alterado. Essa hipótese é bastante atraente, já que as alterações genéticas que predispõe à doença óssea de Paget estão presentes em todo o esqueleto e não apenas nos ossos com envolvimento radiológico.

Em um estudo recente, Gallone e col. (96) não encontraram associações entre polimorfismo dos genes que codificam as citocinas IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL6 e TNF $\alpha$  e a ocorrência da doença óssea de Paget. Esses achados sugerem que as alterações nas concentrações séricas de IL-6 podem ser decorrentes de outros genes envolvidos na expressão dessa citocina ou por infecções virais que podem ter papel importante na patogênese da doença ou, ainda pela interação desses fatores. A última hipótese é favorecida por achados recentes de que a presença da proteína do

nucleocapsídeo do vírus da caxumba aumenta e expressão de IL-6 por osteoclastos (68).

As concentrações séricas reduzidas de IL-17 em portadores da doença óssea de Paget, e seu aumento após o tratamento, é mais intrigante e demanda pesquisas adicionais. Além de ser produzida por linfócitos Th17, sua principal fonte, a IL-17 também é produzida por outros tipos celulares, incluindo osteoblastos (97), mas não por osteoclastos. A IL-6 é fundamental para a diferenciação das células Th17 (98), mas a ação concomitante de outras citocinas é necessária no processo. Isso poderia explicar porque as concentrações séricas elevadas de IL-6 não são acompanhados por igual alteração nas concentrações de IL-17. Outra explicação possível para esse fenômeno poderia ser a existência de um *feedback* negativo ente osteoclastos e linfócitos Th17, já que a IL-17 tem intensa atividade osteoclastogênica (98). Esse *feedback* poderia ser mediado por substância como o interferon  $\beta$ , uma citocina secretada por osteoclastos (99) e que apresenta efeitos negativos sobre a diferenciação de células Th17 (100).

O RANKL é uma citocina fundamental para a diferenciação e ativação de osteoclastos. Em condições fisiológicas, é secretado principalmente por osteoblastos e osteócitos, que também secretam a forma solúvel de seu receptor RANK, a osteoprotegerina (101). O efeito líquido sobre os osteoclastos depende da relação entre as quantidades secretadas de ambas as proteínas. A doença óssea de Paget é caracterizada por aumento do número de osteoclastos, que se apresentam com maior volume, hiperativos e hiper-responsivos ao RANKL (74). Além disso, já foi demonstrado aumento na expressão de RANKL em células de medula óssea de tecido pagético (102). Considerando a hiperatividade de osteoclastos, seria tentador imaginar que as concentrações séricas de RANKL deveriam estar elevadas em portadores de doença óssea de Paget, no entanto, diversos fatores podem tornar essa impressão falsa: osteoclastos hiperresponsivos necessitam, na verdade, de quantidades inferiores de RANKL; muito dos efeitos dessa citocina sobre os osteoclastos ocorre por contato célula a célula ou por forma parácrina; e o *pool* de RANKL e osteoprotegerina séricos podem ter outras fontes além do tecido ósseo (103).

No presente estudo não foi possível identificar diferenças significativas nas concentrações séricas de RANKL e osteoprotegerina ou na relação entre as duas proteínas entre pacientes e controles ou entre pacientes com e sem doença ativa. No entanto, as concentrações séricas de RANKL foram maiores em pacientes com doença óssea de Paget do que em controles e se correlacionaram significativamente com as concentrações séricas de fosfatase alcalina óssea e com o acometimento ósseo atual pela doença. Alvarez e col. (82) também não encontraram diferenças significativas nas concentrações séricas de RANKL e na relação entre RANKL e osteoprotegerina entre portadores de doença óssea de Paget e controles, embora tenha relatado valores elevados de osteoprotegerina nos pacientes. Da mesma forma que no presente estudo, os valores não tiveram alterações significativas com o tratamento com bisfosfonado, achado compartilhado por Polyzos e col. (104). No entanto, os achados do presente estudo contradizem os de Martini e col. (105) que encontraram concentrações séricas mais elevadas de RANKL e osteoprotegerina em portadores de doença óssea de Paget e aumento nas concentrações de osteoprotegerina após o tratamento. Moserti e col. (106) não avaliaram as concentrações de RANKL, mas relataram concentrações séricas aumentadas de osteoprotegerina em portadores de doença óssea de Paget e aumento com o uso de bisfosfonados. A discrepância nos resultados indica que novos estudos são necessários para determinar se a doença óssea de Paget acarreta alterações nas concentrações séricas dessas proteínas.

Para garantir a integridade óssea, as ações de osteoclastos e osteoblastos são intimamente acopladas, os osteoblastos regulam a função de osteoclastos e estes, ao reabsorver o osso, estimulam a diferenciação e a função dos osteoblastos por: secreção de citocinas, liberação de fatores de crescimento presentes na matriz óssea e por contato célula a célula. Adicionalmente, os osteócitos regulam a ambos, osteoblastos e osteoclastos (107,108). Um dos principais fatores determinantes da diferenciação dos osteoblastos é a via wnt/ $\beta$ -catenina. As glicoproteínas da família wnt são sintetizadas por vários tipos celulares, incluindo osteoclastos, que por sua vez, também podem ter sua diferenciação influenciada por proteínas dessa via (109-111). Os membros da família wnt são pouco solúveis, difíceis, portanto, de ser

mensurados em amostras sanguíneas. Os inibidores dessa via, por outro lado, podem ser mensurados, entre eles, a esclerostina, produzida majoritariamente por osteócitos, a DKK-1 e a sFRP-1, produzidas por vários tipos celulares, incluindo osteócitos (84-86). Na doença óssea de Paget, a excessiva reabsorção óssea por osteoclastos hiperativos resulta em igualmente excessiva ativação de osteoblastos. Presumivelmente, a ativação dos osteoblastos envolve sinalização pela via wnt.

No presente estudo, não foram encontradas diferenças significativas entre pacientes e controles em relação às concentrações séricas dos inibidores da via wnt: DKK-1, sFRP-1 e esclerostina. As concentrações séricas de sFRP-1 e esclerostina também não diferiram entre pacientes com doença ativa e inativa e, a exemplo da DKK-1, não variaram significativamente com o tratamento com ácido zoledrônico. Neste estudo foram encontradas concentrações séricas mais elevadas de DKK-1 em pacientes com doença ativa, mas essa observação deve ser interpretada com cuidado pois pode se dever ao acaso, suspeita reforçada pela falta de redução significativa com o tratamento. Não há, na literatura, descrição prévia de concentrações séricas de sFRP-1 em portadores de doença óssea da Paget. Em relação às concentrações séricas de DKK-1, Polyzos e col. (104) encontraram resultados semelhantes aos do presente estudo. Por outro lado, Marshall e col. (112) relataram valores elevados de DKK-1 em comparação com controles, embora não tenham encontrado diferenças entre pacientes tratados e não tratados. No único outro relato publicado sobre concentrações séricas de esclerostina em portadores de doença óssea de Paget, Yavropoulou e col. (113) reportaram valores elevados dessa citocina em portadores de doença óssea de Paget, o que contraria os nossos achados.

Os achados divergentes no tocante às concentrações séricas de inibidores da via wnt entre o presente estudo e alguns outros estudos publicados indicam a necessidade de análises adicionais, com maior número de sujeitos e com uso de ensaios bem padronizados para elucidar a questão. De qualquer forma, como essas citocinas não parecem se alterar com o tratamento da doença, é pouco provável que a dosagem dessas substâncias venha a ter aplicação clínica na avaliação do tratamento da doença óssea de Paget. Deve ser ressaltado que o fato

de não haver variações das concentrações séricas de inibidores da via wnt em portadores de doença óssea de Paget não exclui o papel dessa via na patogênese da doença. Deve ser considerado que há várias moléculas da família wnt que regulam a diferenciação de diversos tipos celulares e que o tecido ósseo não é a única fonte dos inibidores da wnt. Na verdade, caso a via wnt seja importante na ativação de osteoblastos na doença óssea de Paget, o achado de concentrações séricas de seus inibidores próximas às dos indivíduos normais poderia sinalizar uma deficiência relativa desses fatores. Estudos adicionais, com emprego do osso pagético em si, são necessários para elucidar essa questão.

A osteopontina é uma molécula expressa em vários tecidos e que possui funções diversas, que incluem: papel na adesão celular, quimiotaxia, regulação de crescimento celular, regulação do sistema imune (114-116). Nos ossos essa substância é produzida principalmente por osteoblastos, embora também seja produzida por osteoclastos, constituindo-se em um dos principais componentes da matriz extracelular óssea. A osteopontina exerce importantes funções no tecido ósseo, particularmente na regulação da nucleação e do crescimentos dos cristais de hidroxiapatita além de ter função de molécula de adesão. A osteopontina tem a capacidade de ligar-se aos cristais de hidroxiapatita e a integrinas expressas na superfície celular que, assim como o CD44, funcionam como receptores para as funções de sinalização dessa proteína. Além disso, permite a ancoragem de células à matriz óssea e é essencial para a migração dos osteoclastos. Todas suas funções podem ser reguladas por variações no grau de fosforilação da osteopontina (117, 118).

No presente estudo foi demonstrado que portadores de doença óssea de Paget apresentam concentrações séricas mais elevadas de osteopontina quando comparados ao grupo controle. Além disso, pacientes com doença ativa também apresentam concentrações séricas elevadas de osteopontina quando comparados com pacientes com doença inativa. As concentrações séricas de osteopontina apresentaram correlação positiva significativa com a extensão da doença e com as concentrações de fosfatase alcalina óssea e após o tratamento com ácido zoledrônico, apresentaram intensa redução. Esses dados indicam que a dosagem da osteopontina poderia ser utilizada como marcador de

atividade da doença óssea de Paget. Não há na literatura outros estudos publicados sobre as concentrações séricas de osteopontina em portadores de doença óssea de Paget.

A investigação das características da doença em populações com maior prevalência em uma região de aparente baixa frequência pode auxiliar a identificar os fatores causais da doença. A aparente maior frequência de casos de doença óssea de Paget na região de Florianópolis em comparação com o restante do país e mesmo com outras regiões de Santa Catarina sempre levantou indagações sobre as causas desse fenômeno.

Dentre as explicações aventadas, uma hipótese plausível seria a colonização açoriana ou alguma consanguinidade em colônias de descendentes de açorianos. No entanto, tal hipótese se revelou pouco provável, haja visto não haver predomínio de nenhum grupo étnico entre os casos investigados.

A doença óssea de Paget é considerada de etiologia multifatorial, a presença de casos familiares claramente implica fatores genéticos em sua patogênese. A investigação de fatores genéticos presentes em populações diversas é importante pois a identificação de alterações semelhantes em populações diferentes fornece evidências importantes do envolvimento dos fatores pesquisados (41). Vários genes têm sido implicados na patogênese da doença óssea de Paget, no entanto, apenas as mutações dos exons 7 e 8 do sequestossomo 1 têm sido descritas em casos familiares e esporádicos de casos típicos da doença (22,38,39-41,47,49, 72,119–125). No presente estudo, 20,8% dos pacientes apresentaram mutações desse gene, sendo 20,4% dos casos esporádicos e 25% dos casos familiares. Em geral, os estudos publicados têm reportado prevalências que variam entre 2,5-10% dos casos esporádico e 40-50% dos casos familiares (22,38,47,120, 126).

Oito dos pacientes desta casuística eram portadores da mutação do SQSTM1 mais comumente descrita, Pro392Leu. Os 7 pacientes restantes eram portadores de uma mutação até então inédita, Thr430Pro. Ambas as mutações foram descritas em casos familiares e em casos aparentemente esporádicos. Sempre é complicado afirmar que determinado portador de doença óssea de Paget representa um caso

esporádico e não familiar, devido ao padrão de herança com penetrância incompleta dessa doença e ao fato que muitos casos leves não são diagnosticados (120). Para tentar identificar casos familiares, foi realizada uma triagem de familiares de primeiro grau dos sujeitos, mas mesmo essa análise, embora aumente a precisão da informação, pode não ser capaz de identificar alguns casos familiares, que podem se apresentar muito leves para causar alterações nas concentrações séricas de fosfatase alcalina ou comprometer ossos não incluídos em nossa triagem. Devem ser consideradas, ainda, as hipóteses de que a doença ainda não tenha se manifestado nos familiares investigados ou que tenha acometido apenas gerações mais anteriores.

Embora a frequência de casos familiares entre os portadores da mutação Thr430Pro tenha sido maior do que entre os portadores da mutação Pro392Leu e do que entre os portadores da forma nativa do gene, o pequeno número de casos não permite afirmar que essa diferença não se deva ao acaso. O interessante achado dessa mutação, previamente não descrita, em uma grande proporção de pacientes de Florianópolis torna tentadora a hipótese de um ancestral em comum. Aparentemente, esses pacientes não são relacionados entre si, no entanto, a escassez de dados genealógicos confiáveis no Brasil não permite elucidar essa questão com segurança. De qualquer forma, o fato de que esses pacientes tenham reportado diferentes ascendências torna essa hipótese um pouco menos provável.

Devido ao pequeno número de pacientes, não foi possível traçar correlações nítidas entre as características clínicas da doença óssea de Paget e a presença de mutações do SQSTM1, com exceção da clara predisposição ao acometimento polioestótico conferido pela presença das mutações. Essa predisposição a acometimento mais extenso conferida pela presença de mutações do gene SQSTM1 também foi relatada em outros trabalhos (22,72,119).

Em suma, a população de portadores de doença óssea de Paget da região de Florianópolis não parece diferir significativamente das populações de outros países no tocante às características associadas às mutações do gene SQSTM1, embora a frequência das mutações tanto

entre casos esporádicos quanto entre casos familiares difira do reportado na literatura.

Mutações da proteína contendo valosina são associadas a uma forma rara de doença óssea de Paget, miopatia por corpúsculos de inclusão, doença de Paget e demência fronto temporal e, em geral, não têm sido associadas a formas típicas da doença óssea de Paget (49), embora um SNP (rs565070) dessa proteína tenha sido associado a casos de doença óssea de Paget de apresentação típica em um estudo Belga (63). Na amostra pesquisada, a exemplo do estudo de Lucas e col. (127), não foram encontradas mutações da VCP.

Mutações do gene TNFRSF11B, que codifica a osteoprotegerina, têm sido associadas a uma forma rara de doença óssea de Paget de início juvenil (49). Dois estudos relacionaram a presença de um SNP desse gene (G1181C, que codifica uma substituição lisina-aspartato no códon 3) ao desenvolvimento de casos típicos de doença óssea de Paget, particularmente no sexo feminino (59, 60), embora tal associação não tenha sido replicada em outros estudos (55). Apesar de não dispormos de análise genética de um grupo controle para nossa população, a frequência do alelo G foi maior do que a do alelo C na presente casuística e a frequência entre mulheres foi maior do que entre homens.

O gene TNFRSF11A que codifica o receptor RANK tem sido associado às síndromes osteólise expansível familiar e hiperfosfatase esquelética expansível, que apresentam alterações fenotípicas semelhantes às da doença óssea de Paget (49). Mais recentemente, SNPs desse gene têm sido associados à maior susceptibilidade para desenvolvimento de doença óssea de Paget (55 - 57). Gianfrancesco e col. (58) relataram associação da doença óssea de Paget com o SNP T575C desse gene, cuja presença também estaria relacionada a maior extensão do acometimento. Na presente casuística, a frequência do alelo C foi de 63,9% dos pacientes, mas não encontramos relação entre esse SNP e a extensão da doença. Chung e col.(57), embora não tenham encontrado em sua análise um SNP específico, relataram relação entre a susceptibilidade para a doença óssea de Paget e variações do gene TNFRSF11A e que essa associação seria mais frequente em mulheres. Na presente amostra, a frequência do alelo C foi maior entre homens.

A análise da possível relação das alterações genéticas com a ocorrência da doença óssea de Paget na região de Florianópolis somente será possível com a avaliação de controles saudáveis, dado indisponível no momento. Tampouco é possível especular se algum fator ambiental local específico poderia estar associado ao desenvolvimento da doença, particularmente pelo desconhecimento de quais fatores ambientais contribuem para sua patogênese, embora tal hipótese não possa ser de todo descartada.

Mesmo em relação aos aspectos da doença óssea de Paget já bem estabelecidos, como o tratamento, ainda há fatores a ser elucidados, incluindo quais as melhores indicações, os benefícios a longo prazo, a capacidade de prevenção de complicações e a influência sobre a qualidade de vida.

Embora seja geralmente assintomática, a doença óssea de Paget pode afetar a qualidade de vida de seus portadores, por diversas manifestações, incluindo: dor óssea, fraturas, deformidades, osteoartrite, manifestações neurológicas, entre outras. (11,128). Por esse motivo, diversos estudos têm avaliado a qualidade de vida dos portadores de doença óssea de Paget e os efeitos do tratamento sobre esses parâmetros(16,19-25).

No entanto, poucos desses estudos procuraram identificar quais os determinantes da redução de qualidade de vida nessa população. Esse conhecimento é importante para interpretar os efeitos do tratamento sobre a qualidade de vida. Caso o tratamento seja capaz de alterar os parâmetros responsáveis pela diminuição da qualidade de vida, é esperado que os índices de qualidade de vida melhorem após o tratamento. Por outro lado, se alguns importantes determinantes da qualidade de vida não forem passíveis de alteração pelo tratamento ministrado, índices de qualidade de vida terão valor limitado na avaliação de qualquer alternativa terapêutica.

No primeiro estudo a avaliar a qualidade de vida nessa população Gold e col. (24) relataram que a maioria dos portadores de doença óssea de Paget consideraram não ter uma boa qualidade de vida. Entretanto, esse estudo não empregou um questionário padronizado e, embora tenha avaliado um grande número de sujeitos, a maioria desses apresentava

comorbidades que também poderiam comprometer a qualidade de vida.

Outros estudos avaliaram a qualidade de vida em portadores de doença óssea de Paget com auxílio do questionário SF-36 (16,21,23). Em geral, esses estudos reportam redução nos índices de qualidade de vida nessa população. Contudo, apenas um desses estudos avaliou quais os preditores da redução da qualidade de vida. Langston e col. (16) encontraram como preditores do domínio Saúde Física do questionário SF-36 os seguintes fatores: dor óssea, idade e tratamento prévio com bisfosfonados, enquanto que o domínio Saúde Mental foi predito por: tratamento prévio com bisfosfonados, não ser casado e dor óssea. Assim como no presente estudo, as concentrações séricas de fosfatase alcalina óssea não apresentaram correlação significativa com os resultados do índice SF-36. Condizentemente com os resultados desse estudo, os fatores que predisseram os resultados dos escores de qualidade de vida na população ora avaliada foram dor óssea e estado civil, embora os resultados do questionário WHOQOL-bref também tenham sido preditos pela presença de deformidades.

O tratamento com bisfosfonados potentes, particularmente o ácido zoledrônico, é muito eficaz, resultando em controle do quadro algico na maior parte dos pacientes (11, 17, 20). É esperado, portanto, que o tratamento da doença óssea de Paget resulte em melhora da qualidade de vida. Alguns estudos têm avaliado essa questão, embora geralmente como um desfecho secundário. O estudo Horizon (20, 25) mostrou que o tratamento com ácido zoledrônico é capaz de melhorar a qualidade de vida em portadores de doença óssea de Paget e que esse resultado se mantém por longo período. Interessantemente, o risedronato, apesar de ser eficaz em grande parte dos pacientes, não produziu efeitos similares nos índices de qualidade de vida. Por outro lado, em outro estudo, nomeado Prisma, o tratamento não foi capaz de produzir efeitos significativos na qualidade de vida (19). Esse achado poderia ser decorrente do fato que o bisfosfonado utilizado pela maioria dos pacientes foi o risedronato, mas outros fatores precisam ser considerados, incluindo o quão apropriados os escores de qualidade de vida são como desfechos em estudos sobre tratamento de doença óssea de Paget. No presente estudo, assim como no de Langston e col (16),

dor óssea foi o único parâmetro relacionado à atividade da doença óssea de Paget capaz de prever de modo significativo os resultados do questionário SF-36. No entanto, nem todo paciente com doença óssea de Paget tem dor e a dor não é a única indicação para tratamento da doença. Outrossim, outras fontes de dor comuns nesses pacientes, como osteoartrite secundária, não são passíveis de alteração pelo tratamento habitual da doença. Além de estar indicado para controle dos sintomas agudos da doença, o tratamento da doença óssea de Paget pode ser prescrito para prevenção de complicações a longo prazo (17, 129). A prevenção de complicações pode resultar em melhor qualidade de vida a longo prazo, portanto estudos com tempos de seguimento muito longos teriam que ser empregados para identificar esses efeitos. No entanto, tais estudos ainda não foram realizados.

Concluindo, de acordo com os resultados do presente estudo, o principal fator relacionado à atividade da doença, e portanto passível de controle com o tratamento, que pode influir na qualidade de vida dos portadores de doença óssea de Paget é a dor óssea. Os demais fatores, incluindo deformidades e estado civil não podem ser alterados por tratamento medicamentoso. Há que se ressaltar que a doença óssea de Paget é muito heterogênea e assim o são as indicações de tratamento. Todos os pacientes sintomáticos têm indicação de tratamento medicamentoso, mas, de acordo com o sítio de acometimento, pacientes assintomáticos também podem ser tratados (129,130). É esperado que os primeiros manifestem melhora de seus sintomas e, portanto, aumento nos índices de qualidade de vida. Contudo, para os últimos, que, por serem assintomáticos não apresentam alterações de qualidade de vida decorrentes da doença óssea de Paget, o tratamento estaria prevenindo uma futura deterioração da qualidade de vida, o que não pode ser observado em estudos de curta duração. Dessa forma, pode-se inferir que índices de qualidade de vida não são um bom desfecho em estudos sobre tratamento de doença de Paget que tenham curta duração.

O presente estudo apresenta algumas limitações, que devem ser levadas em consideração. Na prática clínica, o método usual para avaliação da atividade da doença óssea de Paget é a dosagem das concentrações séricas de fosfatase alcalina. Contudo, no presente estudo a fosfatase alcalina óssea foi medida por ELISA, com um anticorpo que não é

utilizado na prática clínica e do qual, portanto, não dispõe de valores de referência de normalidade. No entanto, há que se ressaltar que alguns pacientes com doença óssea de Paget sintomáticos apresentam concentrações séricas de fosfatase alcalina dentro do intervalo considerado normal. Muitos desses pacientes apresentam hipercaptação à cintilografia óssea e apresentam melhora de seus sintomas com o uso de ácido zoledrônico. Portanto, nem todo paciente com doença ativa pode ser adequadamente identificado pela dosagem de fosfatase alcalina.

Outro possível viés poderia ser o uso de portadores de osteoartrite como controles. Essa escolha se justifica pela alta prevalência da osteoartrite no grupo etário comumente afetado pela doença óssea de Paget (131,132). É muito difícil encontrar pessoas com idades acima de 60 anos que não apresentem osteoartrite. Além disso, muitos daqueles que não apresentam osteoartrite são acometidos por outras doenças que afetam o metabolismo ósseo ou aumentam mediadores inflamatórios. A maior parte dos idosos com osteoartrite é assintomática e poderia, de fato, ser considerada assintomática na maioria dos estudos. É necessário enfatizar que a maioria dos controles incluídos neste estudo, a despeito de ter evidências radiográficas de osteoartrite, era assintomática, e que a maioria dos pacientes com doença óssea de Paget também apresentava osteoartrite primária.

Outra limitação que deve ser levada em consideração é o número relativamente pequeno de sujeitos em algumas comparações de subgrupos, o que aumenta o risco de resultados decorrentes do acaso. No entanto, o fato dos resultados serem consistentes em todas as análises torna essa possibilidade pouco provável.

A maior limitação da análise dos índices de qualidade de vida é o tamanho relativamente pequeno da amostra, o que resulta em número reduzido de sujeitos com complicações pouco frequentes, mas passíveis de interferir adversamente na qualidade de vida, como o déficit auditivo. Por outro lado, pacientes que apresentavam comorbidades com conhecido impacto sobre a qualidade de vida foram excluídos, eliminando, dessa forma, um grande fator de confusão, o que não foi feito nos demais estudos sobre o tema. Por não haver resultados padrão

para a população brasileira dos índices de qualidade de vida empregados no presente estudo, não foi possível comparar os resultados com os de pessoas normais. Assim, não foi possível avaliar se a doença óssea de Paget resulta em piora da qualidade de vida.

A avaliação de fatores genéticos também enfrenta algumas limitações. A primeira, por não termos sido capazes de avaliar sujeitos sem doença óssea de Paget, não foi possível determinar se as mutações e os SNPs avaliados são mais frequentes em portadores de doença óssea de Paget. Além disso, a falta de dados genealógicos confiáveis no Brasil dificulta a análise da contribuição de cada ascendência na gênese dos casos da doença na região de Florianópolis.

## 8. CONCLUSÕES

1 - O presente estudo confirmou o achado de concentrações séricas aumentados de IL-6 em portadores de doença óssea de Paget e demonstrou pela primeira vez concentrações séricas reduzidas de IL-17.

2 - As concentrações séricas de osteopontina estão aumentadas na doença óssea de Paget e se correlacionam com a extensão e a atividade da doença.

3 – Foi encontrada uma mutação inédita do gene SQSTM1 em uma grande proporção de portadores de doença óssea de Paget de Florianópolis.

4 – A dor óssea é um dos poucos fatores associados à atividade da doença de Paget que resultam em deterioração da qualidade de vida.

## 9. REFERÊNCIAS

1. Paget J. On a Form of Chronic Inflammation of Bones (Osteitis Deformans). *Medico-Chir Trans.* 1877;60:37–64.9.
2. Reddy SV. Etiology of Paget's disease and osteoclast abnormalities. *J Cell Biochem.* 2004 Nov 1;93(4):688–96.
3. Reddy SV, Mena C, Singer FR, Demulder A, Roodman GD. Cell biology of Paget's disease. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* 1999 Oct;14 Suppl 2:3–8.
4. Smith SE, Murphey MD, Motamedi K, Mulligan ME, Resnik CS, Gannon FH. From the archives of the AFIP. Radiologic spectrum of Paget disease of bone and its complications with pathologic correlation. *Radiogr Rev Publ Radiol Soc North Am Inc.* 2002 Oct;22(5):1191–216.
5. Gennari L, Di Stefano M, Merlotti D, Giordano N, Martini G, Tamone C, et al. Prevalence of Paget's disease of bone in Italy. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* 2005 Oct;20(10):1845–50.
6. Eekhoff MEMW, van der Klift M, Kroon HM, Cooper C, Hofman A, Pols HAP, et al. Paget's disease of bone in The Netherlands: a population-based radiological and biochemical survey--the Rotterdam Study. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* 2004 Apr;19(4):566–70.
7. Cooper C, Harvey NC, Dennison EM, van Staa TP. Update on the epidemiology of Paget's disease of bone. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* 2006 Dec;21 Suppl 2:P3–8.
8. Cooper C, Dennison E, Schafheutle K, Kellingray S, Guyer P, Barker D. Epidemiology of Paget's disease of bone. *Bone.* 1999 May;24(5 Suppl):3S–5S.

9. Guañabens N, Garrido J, Gobbo M, Piga AM, del Pino J, Torrijos A, et al. Prevalence of Paget's disease of bone in Spain. *Bone*. 2008 Dec;43(6):1006–9.
10. Griz L, Caldas G, Bandeira C, Assunção V, Bandeira F. Paget's disease of bone. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2006 Aug;50(4):814–22.
11. Werner de Castro GR, Heiden GI, Zimmermann AF, Morato EF, Neves FS, Toscano MA, et al. Paget's disease of bone: analysis of 134 cases from an island in Southern Brazil: another cluster of Paget's disease of bone in South America. *Rheumatol Int*. 2012 Mar;32(3):627–31.
12. Ferreira SL. “Nós não somos de origem”: Populares de ascendência açoriana e africana numa freguesia do Sul do Brasil (1780-1960) [Tese de Doutorado]. [Florianópolis, SC]: Universidade Federal de Santa Catarina; 2006.
13. Muniz YCN. Marcadores genéticos de ancestralidade em comunidades fundadas por açorianos na Ilha de Santa Catarina [Tese de Doutorado]. [Ribeirão Preto]: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2008.
14. Armas JB, Pimentel F, Guyer PB, Cooper C, Pye SR, O'Neill TW. Prevalence of Paget's Disease of Bone in Terceira Island, Azores. *Bone*. 2002 Apr;30(4):649–50.
15. Van Staa TP, Selby P, Leufkens HGM, Lyles K, Sprafka JM, Cooper C. Incidence and natural history of Paget's disease of bone in England and Wales. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2002 Mar;17(3):465–71.
16. Langston AL, Campbell MK, Fraser WD, MacLennan G, Selby P, Ralston SH. Clinical determinants of quality of life in Paget's disease of bone. *Calcif Tissue Int*. 2007 Jan;80(1):1–9.

17. Ralston SH, Langston AL, Reid IR. Pathogenesis and management of Paget's disease of bone. *Lancet*. 2008 Jul 12;372(9633):155–63.
18. Mangham DC, Davie MW, Grimer RJ. Sarcoma arising in Paget's disease of bone: declining incidence and increasing age at presentation. *Bone*. 2009 Mar;44(3):431–6.
19. Langston AL, Campbell MK, Fraser WD, MacLennan GS, Selby PL, Ralston SH. Randomized trial of intensive bisphosphonate treatment versus symptomatic management in Paget's disease of bone. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2010 Jan;25(1):20–31.
20. Reid IR, Lyles K, Su G, Brown JP, Walsh JP, del Pino-Montes J, et al. A single infusion of zoledronic acid produces sustained remissions in Paget disease: data to 6.5 years. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2011 Sep;26(9):2261–70.
21. Seton M, Moses AM, Bode RK, Schwartz C. Paget's disease of bone: the skeletal distribution, complications and quality of life as perceived by patients. *Bone*. 2011 Feb;48(2):281–5.
22. Visconti MR, Langston AL, Alonso N, Goodman K, Selby PL, Fraser WD, et al. Mutations of SQSTM1 are associated with severity and clinical outcome in paget disease of bone. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2010 Nov;25(11):2368–73.
23. Saraux A, Brun-Strang C, Mimaud V, Vigneron A-M, Lafuma A. Epidemiology, impact, management, and cost of Paget's disease of bone in France. *Jt Bone Spine Rev Rhum*. 2007 Jan;74(1):90–5.
24. Gold DT, Boisture J, Shipp KM, Pieper CF, Lyles KW. Paget's disease of bone and quality of life. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 1996 Dec;11(12):1897–904.

25. Reid IR, Miller P, Lyles K, Fraser W, Brown JP, Saidi Y, et al. Comparison of a single infusion of zoledronic acid with risedronate for Paget's disease. *N Engl J Med*. 2005 Sep 1;353(9):898–908.
26. Reddy SV. Etiologic factors in Paget's disease of bone. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2006 Feb;63(4):391–8.
27. Ralston SH, Langston AL, Reid IR. Pathogenesis and management of Paget's disease of bone. *Lancet*. 2008 Jul 12;372(9633):155–63.
28. Siris ES. Seeking the elusive etiology of Paget disease: a progress report. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 1996 Nov;11(11):1599–601.
29. Siris ES, Lyles KW, Singer FR, Meunier PJ. Medical management of Paget's disease of bone: indications for treatment and review of current therapies. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2006 Dec;21 Suppl 2:P94–98.
30. Montagu MFA. Paget's disease (Osteitis deformans) and heredity. *Am J Hum Genet*. 1949 Sep;1(1):94–5.
31. Siris ES. Epidemiological aspects of Paget's disease: family history and relationship to other medical conditions. *Semin Arthritis Rheum*. 1994 Feb;23(4):222–5.
32. Sofaer JA, Holloway SM, Emery AE. A family study of Paget's disease of bone. *J Epidemiol Community Health*. 1983 Sep;37(3):226–31.
33. Morales-Piga AA, Rey-Rey JS, Corres-González J, García-Sagredo JM, López-Abente G. Frequency and characteristics of familial aggregation of Paget's disease of bone. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 1995 Apr;10(4):663–70.

34. Daroszewska A, Ralston SH. Genetics of Paget's disease of bone. *Clin Sci Lond Engl* 1979. 2005 Sep;109(3):257–63.
35. Leach RJ, Singer FR, Ench Y, Wisdom JH, Pina DS, Johnson-Pais TL. Clinical and cellular phenotypes associated with sequestosome 1 (SQSTM1) mutations. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2006 Dec;21 Suppl 2:P45–50.
36. Barker DJ. The epidemiology of Paget's disease. *Metab Bone Dis Relat Res*. 1981;3(4-5):231–3.
37. Hocking LJ, Herbert CA, Nicholls RK, Williams F, Bennett ST, Cundy T, et al. Genomewide search in familial Paget disease of bone shows evidence of genetic heterogeneity with candidate loci on chromosomes 2q36, 10p13, and 5q35. *Am J Hum Genet*. 2001 Nov;69(5):1055–61.
38. Laurin N, Brown JP, Morissette J, Raymond V. Recurrent mutation of the gene encoding sequestosome 1 (SQSTM1/p62) in Paget disease of bone. *Am J Hum Genet*. 2002 Jun;70(6):1582–8.
39. Hocking LJ, Lucas GJA, Daroszewska A, Cundy T, Nicholson GC, Donath J, et al. Novel UBA domain mutations of SQSTM1 in Paget's disease of bone: genotype phenotype correlation, functional analysis, and structural consequences. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2004 Jul;19(7):1122–7.
40. Johnson-Pais TL, Wisdom JH, Weldon KS, Cody JD, Hansen MF, Singer FR, et al. Three novel mutations in SQSTM1 identified in familial Paget's disease of bone. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2003 Oct;18(10):1748–53.
41. Falchetti A, Di Stefano M, Marini F, Del Monte F, Mavilia C, Strigoli D, et al. Two novel mutations at exon 8 of the Sequestosome 1 (SQSTM1) gene in an Italian series of patients affected by Paget's disease of bone (PDB). *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2004 Jun;19(6):1013–7.

42. Rhodes EC, Johnson-Pais TL, Singer FR, Ankerst DP, Bruder JM, Wisdom J, et al. Sequestosome 1 (SQSTM1) mutations in Paget's disease of bone from the United States. *Calcif Tissue Int.* 2008 Apr;82(4):271–7.
43. Rea SL, Walsh JP, Ward L, Magno AL, Ward BK, Shaw B, et al. Sequestosome 1 mutations in Paget's disease of bone in Australia: prevalence, genotype/phenotype correlation, and a novel non-UBA domain mutation (P364S) associated with increased NF-kappaB signaling without loss of ubiquitin binding. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* 2009 Jul;24(7):1216–23.
44. Layfield R, Hocking LJ. SQSTM1 and Paget's disease of bone. *Calcif Tissue Int.* 2004 Nov;75(5):347–57.
45. Layfield R, Searle MS. Disruption of ubiquitin-mediated processes in diseases of the brain and bone. *Biochem Soc Trans.* 2008 Jun 1;36(3):469.
46. McManus S, Roux S. The adaptor protein p62/SQSTM1 in osteoclast signaling pathways. *J Mol Signal.* 2012;7:1.
47. Hocking LJ, Lucas GJA, Daroszewska A, Mangion J, Olavesen M, Cundy T, et al. Domain-specific mutations in sequestosome 1 (SQSTM1) cause familial and sporadic Paget's disease. *Hum Mol Genet.* 2002 Oct 15;11(22):2735–9.
48. Kurihara N, Hiruma Y, Zhou H, Subler MA, Dempster DW, Singer FR, et al. Mutation of the sequestosome 1 (p62) gene increases osteoclastogenesis but does not induce Paget disease. *J Clin Invest.* 2007 Jan;117(1):133–42.
49. Ralston SH, Layfield R. Pathogenesis of Paget disease of bone. *Calcif Tissue Int.* 2012 Aug;91(2):97–113.

50. Hughes AE, Ralston SH, Marken J, Bell C, MacPherson H, Wallace RG, et al. Mutations in TNFRSF11A, affecting the signal peptide of RANK, cause familial expansile osteolysis. *Nat Genet.* 2000 Jan;24(1):45–8.
51. Nakatsuka K, Nishizawa Y, Ralston SH. Phenotypic characterization of early onset Paget’s disease of bone caused by a 27-bp duplication in the TNFRSF11A gene. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* 2003 Aug;18(8):1381–5.
52. Whyte MP, Hughes AE. Expansile skeletal hyperphosphatasia is caused by a 15-base pair tandem duplication in TNFRSF11A encoding RANK and is allelic to familial expansile osteolysis. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* 2002 Jan;17(1):26–9.
53. Sparks AB, Peterson SN, Bell C, Loftus BJ, Hocking L, Cahill DP, et al. Mutation screening of the TNFRSF11A gene encoding receptor activator of NF kappa B (RANK) in familial and sporadic Paget’s disease of bone and osteosarcoma. *Calcif Tissue Int.* 2001 Mar;68(3):151–5.
54. Wuyts W, Van Wesenbeeck L, Morales-Piga A, Ralston S, Hocking L, Vanhoenacker F, et al. Evaluation of the role of RANK and OPG genes in Paget’s disease of bone. *Bone.* 2001 Jan;28(1):104–7.
55. Chung PYJ, Beyens G, Boonen S, Papapoulos S, Geusens P, Karperien M, et al. The majority of the genetic risk for Paget’s disease of bone is explained by genetic variants close to the CSF1, OPTN, TM7SF4, and TNFRSF11A genes. *Hum Genet.* 2010 Dec;128(6):615–26.
56. Albagha OME, Visconti MR, Alonso N, Langston AL, Cundy T, Dargie R, et al. Genome-wide association study identifies variants at CSF1, OPTN and TNFRSF11A as genetic risk factors for Paget’s disease of bone. *Nat Genet.* 2010 Jun;42(6):520–4.

57. Chung PYJ, Beyens G, Riches PL, Van Wesenbeeck L, de Freitas F, Jennes K, et al. Genetic variation in the TNFRSF11A gene encoding RANK is associated with susceptibility to Paget's disease of bone. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2010 Dec;25(12):2592–605.
58. Gianfrancesco F, Rendina D, Di Stefano M, Mingione A, Esposito T, Merlotti D, et al. A nonsynonymous TNFRSF11A variation increases NFκB activity and the severity of Paget's disease. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2012 Feb;27(2):443–52.
59. Daroszewska A, Hocking LJ, McGuigan FE, Langdahl B, Stone MD, Cundy T, et al. Susceptibility to Paget's Disease of Bone Is Influenced by a Common Polymorphic Variant of Osteoprotegerin. *J Bone Miner Res*. 2004;19(9):1506–11.
60. Beyens G, Daroszewska A, de Freitas F, Fransen E, Vanhoenacker F, Verbruggen L, et al. Identification of sex-specific associations between polymorphisms of the osteoprotegerin gene, TNFRSF11B, and Paget's disease of bone. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2007 Jul;22(7):1062–71.
61. Kovach MJ, Waggoner B, Leal SM, Gelber D, Khardori R, Levenstien MA, et al. Clinical delineation and localization to chromosome 9p13.3-p12 of a unique dominant disorder in four families: hereditary inclusion body myopathy, Paget disease of bone, and frontotemporal dementia. *Mol Genet Metab*. 2001 Dec;74(4):458–75.
62. Watts GDJ, Wymer J, Kovach MJ, Mehta SG, Mumm S, Darvish D, et al. Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia is caused by mutant valosin-containing protein. *Nat Genet*. 2004 Apr;36(4):377–81.
63. Chung PYJ, Beyens G, de Freitas F, Boonen S, Geusens P, Vanhoenacker F, et al. Indications for a genetic association of a VCP polymorphism with the pathogenesis of sporadic Paget's

disease of bone, but not for TNFSF11 (RANKL) and IL-6 polymorphisms. *Mol Genet Metab*. 2011 Jul;103(3):287–92.

64. Goode A, Layfield R. Recent advances in understanding the molecular basis of Paget disease of bone. *J Clin Pathol*. 2010 Mar;63(3):199–203.
65. Johnson BW, Oshinskie L. Diagnosis and management of angioid streaks. *J Am Optom Assoc*. 1988 Sep;59(9):704–11.
66. Kurihara N, Hiruma Y, Yamana K, Michou L, Rousseau C, Morissette J, et al. Contributions of the measles virus nucleocapsid gene and the SQSTM1/p62(P392L) mutation to Paget's disease. *Cell Metab*. 2011 Jan 5;13(1):23–34.
67. Kurihara N, Reddy SV, Mena C, Anderson D, Roodman GD. Osteoclasts expressing the measles virus nucleocapsid gene display a pagetic phenotype. *J Clin Invest*. 2000 Mar;105(5):607–14.
68. Wang F-M, Sarmasik A, Hiruma Y, Sun Q, Sammut B, Windle JJ, et al. Measles virus nucleocapsid protein, a key contributor to Paget's disease, increases IL-6 expression via down-regulation of FoxO3/Sirt1 signaling. *Bone*. 2013 Mar;53(1):269–76.
69. Helfrich MH, Hobson RP, Grabowski PS, Zurbriggen A, Cosby SL, Dickson GR, et al. A negative search for a paramyxoviral etiology of Paget's disease of bone: molecular, immunological, and ultrastructural studies in UK patients. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2000 Dec;15(12):2315–29.
70. López-Abente G, Morales-Piga A, Elena-Ibáñez A, Rey-Rey JS, Corres-González J. Cattle, pets, and Paget's disease of bone. *Epidemiol Camb Mass*. 1997 May;8(3):247–51.

71. Khan SA, Brennan P, Newman J, Gray RE, McCloskey EV, Kanis JA. Paget's disease of bone and unvaccinated dogs. *Bone*. 1996 Jul;19(1):47–50.
72. Gennari L, Gianfrancesco F, Di Stefano M, Rendina D, Merlotti D, Esposito T, et al. SQSTM1 gene analysis and gene-environment interaction in Paget's disease of bone. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2010 Jun;25(6):1375–84.
73. Hadjidakis DJ, Androulakis II. Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci*. 2006 Dec;1092:385–96.
74. Neale SD, Smith R, Wass JA, Athanasou NA. Osteoclast differentiation from circulating mononuclear precursors in Paget's disease is hypersensitive to 1,25-dihydroxyvitamin D(3) and RANKL. *Bone*. 2000 Sep;27(3):409–16.
75. Lee S-H, Kim T-S, Choi Y, Lorenzo J. Osteoimmunology: cytokines and the skeletal system. *BMB Reports*. 2008 Jul 31;41(7):495–510.
76. Mena C, Barsony J, Reddy SV, Cornish J, Cundy T, Roodman GD. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 hypersensitivity of osteoclast precursors from patients with Paget's disease. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2000 Feb;15(2):228–36.
77. Neale SD, Schulze E, Smith R, Athanasou NA. The influence of serum cytokines and growth factors on osteoclast formation in Paget's disease. *QJM Mon J Assoc Physicians*. 2002 Apr;95(4):233–40.
78. Haynes DR, Barg E, Crotti TN, Holding C, Weedon H, Atkins GJ, et al. Osteoprotegerin expression in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis, spondyloarthropathies and osteoarthritis and normal controls. *Rheumatol Oxf Engl*. 2003 Jan;42(1):123–34.

79. Bezerra MC, Carvalho JF, Prokopowitsch AS, Pereira RMR. RANK, RANKL and osteoprotegerin in arthritic bone loss. *Braz J Med Biol Res Rev Bras Pesqui Médicas E Biológicas Soc Bras Biofísica Al.* 2005 Feb;38(2):161–70.
80. Pioli G, Girasole G, Pedrazzoni M, Sansoni P, Erroi A, Davoli L, et al. Spontaneous release of interleukin-1 (IL-1) from medullary mononuclear cells of pagetic subjects. *Calcif Tissue Int.* 1989 Oct;45(4):257–9.
81. Hoyland JA, Freemont AJ, Sharpe PT. Interleukin-6, IL-6 receptor, and IL-6 nuclear factor gene expression in Paget's disease. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* 1994 Jan;9(1):75–80.
82. Alvarez L, Peris P, Guañabens N, Vidal S, Ros I, Pons F, et al. Serum osteoprotegerin and its ligand in Paget's disease of bone: relationship to disease activity and effect of treatment with bisphosphonates. *Arthritis Rheum.* 2003 Mar;48(3):824–8.
83. Wang Y, Li Y-P, Paulson C, Shao J-Z, Zhang X, Wu M, et al. Wnt and the Wnt signaling pathway in bone development and disease. *Front Biosci Landmark Ed.* 2014;19:379–407.
84. Burgers TA, Williams BO. Regulation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling within and from osteocytes. *Bone.* 2013 Jun;54(2):244–9.
85. Maeda K, Takahashi N, Kobayashi Y. Roles of Wnt signals in bone resorption during physiological and pathological states. *J Mol Med Berl Ger.* 2013 Jan;91(1):15–23.
86. Bonewald LF, Johnson ML. Osteocytes, Mechanosensing and Wnt Signaling. *Bone.* 2008 Apr;42(4):606–15.
87. Dieppe P, Peterfy C, Watt I. Osteoarthritis and related disorders: imaging. *Rheumatology.* Londres: Mosby; p. 8:4.1–8:4.10.

88. Meunier PJ, Salson C, Mathieu L, Chapuy MC, Delmas P, Alexandre C, et al. Skeletal distribution and biochemical parameters of Paget's disease. *Clin Orthop*. 1987 Apr;(217):37–44.
89. Poór G, Donáth J, Fornet B, Cooper C. Epidemiology of Paget's disease in Europe: the prevalence is decreasing. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2006 Oct;21(10):1545–9.
90. Ciconelli RM, Ferraz MB, Santos W, Meinão I, Quaresma MR. Tradução para a língua portuguesa e validação do questionário genérico de avaliação de qualidade de vida SF-36 (Brasil SF-36). 1999;143–50.
91. Fleck MP, Louzada S, Xavier M, Chachamovich E, Vieira G, Santos L, et al. Aplicação da versão em português do instrumento abreviado de avaliação da qualidade de vida "WHOQOL-bref".
92. Reid IR. Pharmacotherapy of Paget's disease of bone. *Expert Opin Pharmacother*. 2012 Apr;13(5):637–46.
93. Roodman GD, Kurihara N, Ohsaki Y, Kukita A, Hosking D, Demulder A, et al. Interleukin 6. A potential autocrine/paracrine factor in Paget's disease of bone. *J Clin Invest*. 1992 Jan;89(1):46–52.
94. Natale VM, Filho WJ, Duarte AJ. Cellular immunity aspects in elderly subjects with Paget's disease of bone. *Calcif Tissue Int*. 1997 May;60(5):410–4.
95. Teramachi J, Zhou H, Subler MA, Kitagawa Y, Galson DL, Dempster DW, et al. Increased IL-6 Expression in Osteoclasts is Necessary but not Sufficient for the Development of Paget's Disease of Bone. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2013 Dec 11;

96. Gallone S, Di Stefano M, Fenoglio P, Rubino E, Criasia A, Pinessi L, et al. Proinflammatory cytokine gene polymorphisms and susceptibility to Paget's disease of bone: An association study. *Cytokine*. 2011 Dec;56(3):560–3.
97. Rizzo A, Di Domenico M, Carratelli CR, Mazzola N, Paolillo R. Induction of proinflammatory cytokines in human osteoblastic cells by *Chlamydia pneumoniae*. *Cytokine*. 2011 Nov;56(2):450–7.
98. Okamoto K, Takayanagi H. Osteoclasts in arthritis and Th17 cell development. *Int Immunopharmacol*. 2011 May;11(5):543–8.
99. Abraham AK, Ramanathan M, Weinstock-Guttman B, Mager DE. Mechanisms of interferon-beta effects on bone homeostasis. *Biochem Pharmacol*. 2009 Jun 15;77(12):1757–62.
100. Ramgolam VS, Markovic-Plese S. Interferon-beta inhibits Th17 cell differentiation in patients with multiple sclerosis. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2010 Jun;10(2):161–7.
101. Komori T. Functions of the osteocyte network in the regulation of bone mass. *Cell Tissue Res*. 2013 May;352(2):191–8.
102. Menea C, Reddy SV, Kurihara N, Maeda H, Anderson D, Cundy T, et al. Enhanced RANK ligand expression and responsiveness of bone marrow cells in Paget's disease of bone. *J Clin Invest*. 2000 Jun;105(12):1833–8.
103. Dovio A, Data V, Angeli A. Circulating osteoprotegerin and soluble RANKL: do they have a future in clinical practice? *J Endocrinol Invest*. 2005;28(10 Suppl):14–22.
104. Polyzos SA, Anastasilakis AD, Efstathiadou Z, Kita M, Litsas I, Avramidis A, et al. The effect of zoledronic acid on serum dickkopf-1, osteoprotegerin, and RANKL in patients with Paget's

- disease of bone. *Horm Metab Res Horm- Stoffwechselforschung Horm Métabolisme*. 2009 Nov;41(11):846–50.
105. Martini G, Gennari L, Merlotti D, Salvadori S, Franci MB, Campagna S, et al. Serum OPG and RANKL levels before and after intravenous bisphosphonate treatment in Paget's disease of bone. *Bone*. 2007 Feb;40(2):457–63.
  106. Mossetti G, Rendina D, De Filippo G, Viceconti R, Di Domenico G, Cioffi M, et al. Interleukin-6 and osteoprotegerin systems in Paget's disease of bone: relationship to risedronate treatment. *Bone*. 2005 Mar;36(3):549–54.
  107. Matsuo K, Otaki N. Bone cell interactions through Eph/ephrin. *Cell Adhes Migr*. 2012 Mar 1;6(2):148–56.
  108. O'Brien CA, Nakashima T, Takayanagi H. Osteocyte control of osteoclastogenesis. *Bone*. 2013 Jun;54(2):258–63.
  109. Pederson L, Ruan M, Westendorf JJ, Khosla S, Oursler MJ. Regulation of bone formation by osteoclasts involves Wnt/BMP signaling and the chemokine sphingosine-1-phosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Dec 30;105(52):20764–9.
  110. Qiang Y-W, Chen Y, Brown N, Hu B, Epstein J, Barlogie B, et al. Characterization of Wnt/beta-catenin signalling in osteoclasts in multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2010 Mar;148(5):726–38.
  111. Glass DA 2nd, Bialek P, Ahn JD, Starbuck M, Patel MS, Clevers H, et al. Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev Cell*. 2005 May;8(5):751–64.
  112. Marshall MJ, Evans SF, Sharp CA, Powell DE, McCarthy HS, Davie MWJ. Increased circulating Dickkopf-1 in Paget's disease of bone. *Clin Biochem*. 2009 Jul;42(10-11):965–9.

113. Yavropoulou MP, van Lierop AH, Hamdy NAT, Rizzoli R, Papapoulos SE. Serum sclerostin levels in Paget's disease and prostate cancer with bone metastases with a wide range of bone turnover. *Bone*. 2012 Jul;51(1):153–7.
114. Shin T. Osteopontin as a two-sided mediator in acute neuroinflammation in rat models. *Acta Histochem*. 2012 Dec;114(8):749–54.
115. Haylock DN, Nilsson SK. Osteopontin: a bridge between bone and blood. *Br J Haematol*. 2006;134(5):467–74.
116. Das R, Philip S, Mahabeleshwar GH, Bulbule A, Kundu GC. Osteopontin: It's Role in Regulation of Cell Motility and Nuclear Factor  $\kappa$ B-mediated Urokinase Type Plasminogen Activator Expression. *IUBMB Life*. 2005;57(6):441–7.
117. Kazanecki CC, Uzwiak DJ, Denhardt DT. Control of osteopontin signaling and function by post-translational phosphorylation and protein folding. *J Cell Biochem*. 2007;102(4):912–24.
118. McKee MD, Pedraza CE, Kaartinen MT. Osteopontin and wound healing in bone. *Cells Tissues Organs*. 2011;194(2-4):313–9.
119. Falchetti A, Di Stefano M, Marini F, Ortolani S, Olivieri MF, Bergui S, et al. Genetic epidemiology of Paget's disease of bone in Italy: sequestosome1/p62 gene mutational test and haplotype analysis at 5q35 in a large representative series of sporadic and familial Italian cases of Paget's disease of bone. *Calcif Tissue Int*. 2009 Jan;84(1):20–37.
120. Eekhoff EWM, Karperien M, Houtsma D, Zwinderman AH, Dragoiescu C, Kneppers ALJ, et al. Familial Paget's disease in The Netherlands: occurrence, identification of new mutations in the sequestosome 1 gene, and their clinical associations. *Arthritis Rheum*. 2004 May;50(5):1650–4.

121. Bolland MJ, Tong PC, Naot D, Callon KE, Wattie DJ, Gamble GD, et al. Delayed development of Paget's disease in offspring inheriting SQSTM1 mutations. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2007 Mar;22(3):411–5.
122. Cundy T, Naot D, Bava U, Musson D, Tong PC, Bolland M. Familial Paget disease and SQSTM1 mutations in New Zealand. *Calcif Tissue Int*. 2011 Sep;89(3):258–64.
123. Gu J-M, Zhang Z-L, Zhang H, Hu W-W, Wang C, Yue H, et al. Thirteen Chinese patients with sporadic Paget's disease of bone: clinical features, SQSTM1 mutation identification, and functional analysis. *J Bone Miner Metab*. 2012 Sep;30(5):525–33.
124. Wright T, Rea SL, Goode A, Bennett AJ, Ratajczak T, Long JE, et al. The S349T mutation of SQSTM1 links Keap1/Nrf2 signalling to Paget's disease of bone. *Bone*. 2013 Feb;52(2):699–706.
125. Collet C, Michou L, Audran M, Chasseigneaux S, Hilliquin P, Bardin T, et al. Paget's disease of bone in the French population: novel SQSTM1 mutations, functional analysis, and genotype-phenotype correlations. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2007 Feb;22(2):310–7.
126. Beyens G, Van Hul E, Van Driessche K, Franssen E, Devogelaer J-P, Vanhoenacker F, et al. Evaluation of the role of the SQSTM1 gene in sporadic Belgian patients with Paget's disease. *Calcif Tissue Int*. 2004 Aug;75(2):144–52.
127. Lucas GJA, Mehta SG, Hocking LJ, Stewart TL, Cundy T, Nicholson GC, et al. Evaluation of the role of Valosin-containing protein in the pathogenesis of familial and sporadic Paget's disease of bone. *Bone*. 2006 Feb;38(2):280–5.
128. Ralston SH. Pathogenesis of Paget's disease of bone. *Bone*. 2008 Nov;43(5):819–25.

129. Selby P., Davie MW., Ralston S., Stone M. Guidelines on the management of Paget's disease of bone. *Bone*. 2002 Sep;31(3):366–73.
130. Singer FR. Paget disease: when to treat and when not to treat. *Nat Rev Rheumatol*. 2009 Sep;5(9):483–9.
131. Van Saase JL, van Romunde LK, Cats A, Vandenbroucke JP, Valkenburg HA. Epidemiology of osteoarthritis: Zoetermeer survey. Comparison of radiological osteoarthritis in a Dutch population with that in 10 other populations. *Ann Rheum Dis*. 1989 Apr;48(4):271–80.
132. Arden N, Nevitt MC. Osteoarthritis: epidemiology. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2006 Feb;20(1):3–25.

ANEXOS

## **Anexo 1**

### **CONSENTIMENTO INFORMADO**

#### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

##### **Consentimento pós informação**

Você está sendo convidado a participar voluntariamente de um estudo de pesquisa clínica sobre doença óssea de Paget, Esta folha de informação tem como objetivo fornecer-lhe maiores detalhes sobre este estudo, de tal forma que você possa decidir se deseja ou não participar do mesmo.

A doença óssea de Paget é uma doença crônica que, ao afetar os ossos, pode causar dor, deformidades, fraturas, sintomas neurológicos, artrose e acarretar o desenvolvimento de neoplasias malignas. Muitas pessoas acometidas não apresentam sintomas mas podem apresentar futuramente. Apesar de terem sido identificados alguns fatores genéticos ligados ao desenvolvimento da doença, sua causa não foi completamente elucidada. Recentemente, foi confirmada a presença de um grande número de pessoas afetadas por essa doença na região de Florianópolis – SC e há necessidade de pesquisar o porquê desse fenômeno. Em torno de 30% dos portadores doença óssea de Paget apresentam familiares acometidos pela mesma doença, a identificação de mutações géticas que propiciem seu surgimento pode identificar pessoas com maior risco e propiciar tratamento precoce.

O estudo tem como objetivo avaliar alterações dos níveis de substâncias relacionadas a processos inflamatórias e ao metabolismo ósseo no sangue de portadores de doença óssea de Paget. Para possibilitar comparações, será necessário colher também sangue de portadores de osteoartrite, designados controles. Será avaliada, ainda, a presença de alterações genéticas em portadores de doença óssea de Paget. Não será realizada nenhuma análise genética dos indivíduos que participarem da pesquisa como controles.

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

Pesquisa: Avaliação clínico-laboratorial de portadores de doença óssea de Paget.

Responsáveis: Dr. Gláucio R. W. de Castro, Profa. Dra. Tânia Silvia Fröde

Dados do paciente

Nome do paciente: RG:

CPF:

Data de nascimento:

Endereço:

Telefone:

Eu, abaixo assinado, aceito participar voluntariamente de uma pesquisa para estudar alterações genéticas e laboratoriais na doença óssea de Paget. Estou ciente que para participar do estudo terei que responder a um questionário e ser submetido a coleta de sangue de veia periférica. Por tratar-se de procedimento invasivo, a coleta de sangue apresenta alguns riscos, incluindo dor local, tromboflebite, formação de ecimoses e alergia ao curativo.. Sei que os riscos serão minimizados pelo emprego de métodos adequados que terei suporte adequado em caso de intercorrências, O material coletado servirá para análise de citocinas, de marcadores de metabolismo ósseo e para pesquisa de mutações associadas à doença óssea de Paget. Sei que posso sair do estudo em qualquer momento e que isso não irá prejudicar o meu tratamento no ambulatório de doenças osteometabólicas do Hospital Governador Celso Ramos. Estou ciente que a pesquisa de polimorfismos genéticos será realizada apenas para portadores de doença óssea de Paget, não para os controles, e seus resultados serão identificados apenas por códigos, não havendo identificação do paciente. Esses resultados poderão ser conhecidos apenas por mim e por meu médico, mediante prévia

autorização. Sei que terei acesso a aconselhamento genético caso necessário.

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

Data  
responsável

Assinatura do pacientes ou

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

Gláucio R. W. de Castro

Telefones:

Dr. Gláucio Castro —(48)91133176

Profa. Dra. Tânia Silvia Fröde – (48)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
 Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão  
 Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

**CERTIFICADO**

**Nº 869**

O Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Santa Catarina, instituído pela PORTARIA N.º0584 GR 99 de 04 de novembro de 1999, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEPESH, considerando o conteúdo no Regimento Interno do CEPESH, **CERTIFICA** que os procedimentos que envolvem seres humanos no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP.

**APROVADO**

**PROCESSO:** 869

**FR:** 353461

**TÍTULO:** Estudo de resposta inflamatória em pacientes portadores de doença óssea de Paget

**AUTOR:** Tania Sirlva Frode, Gláucio Ricardo Werner de Castro

FLORIANÓPOLIS, 26 de Julho de 2010.

\_\_\_\_\_  
 Coordenador do CEPESH/UFSC



**Anexo 3** - Reprodução do questionário SF-36 validado para a língua portuguesa (Brasil)

ESTADO GERAL DE SAÚDE – SF 36 – Versão em português do *Medical Outcomes Study 36 – Item short form health survey*

Questionário traduzido e validado para o português em 1997 por Ciconelli (MARTINEZ, 2002)

Instruções: Esta parte da pesquisa questiona vocês sobre sua saúde. Estas informações nos manterão informados de como você se sente e quão bem você é capaz de fazer suas atividades de vida diária. Responda cada questão marcando a resposta como indicado. Caso você esteja inseguro em como responder, por favor tente responder o melhor que puder.

Em geral, você diria que sua saúde é:  
(circule uma)

Excelente	1
Muito boa	2
Boa	3
Ruim	4
Muito ruim	5

Comparada há um ano atrás, como você classificaria sua saúde em geral, agora?

(circule uma)

- |  |   |
|--|---|
| Muito melhor agora do que há um ano atrás    | 1 |
| Um pouco melhor agora do que há um ano atrás | 2 |
| Quase a mesma de um ano atrás                | 3 |
| Um pouco pior agora do que há um ano atrás   | 4 |
| Muito pior agora do que há um ano atrás      | 5 |

Os seguintes itens são sobre atividades que você poderia fazer atualmente durante um dia comum. Devido a sua saúde, você tem dificuldade para fazer essas atividades? Nesse caso, quanto?

Atividades	Sim. Dificulta muito	Sim. Dificulta um pouco	Não. dificulta de modo algum
a) Atividades vigorosas, que exigem muito esforço, tais como correr, levantar objetos pesados, participar em esportes árduos	1	2	3
b) Atividades moderadas, tais como mover uma mesa, passar aspirador de pó, jogar bola, varrer a casa	1	2	3
c) Levantar ou carregar mantimentos	1	2	3
d) Subir vários lances de escada	1	2	3
e) Subir um lance de escada	1	2	3
f) Curvar-se, ajoelhar-se ou dobrar-se	1	2	3
g) Andar mais de 1 quilômetro	1	2	3

h) Andar vários quartos	1	2	3
i) Andar um quarto	1	2	3
j) Tomar banho ou vestir-se	1	2	3

Durante as últimas 4 semanas, você teve algum dos seguintes problemas com o seu trabalho ou com alguma atividade diária regular, como consequência de sua saúde física?

(circule uma em cada linha)

	Sim	Não
a) Você diminuiu a quantidade de tempo que se dedicava ao seu trabalho ou a outras atividades?	1	2
b) Realizou menos tarefas do que você gostaria?	1	2
c) Esteve limitado no seu tipo de trabalho ou em outras atividades?	1	2
d) Teve dificuldade de fazer seu trabalho ou outras atividades (p. ex.: necessitou de um esforço extra)?	1	2

Durante as últimas 4 semanas, você teve algum dos seguintes problemas com o seu trabalho ou outra atividade regular diária, como consequência de algum problema emocional (como sentir-se deprimido ou ansioso)?

(circule uma em cada linha)

	Sim	Não

a) Você diminuiu a quantidade de tempo que dedicava ao seu trabalho ou a outras atividades?	1	2
b) Realizou menos tarefas do que você gostaria?	1	2
c) Não trabalhou ou não fez qualquer das atividades com tanto cuidado como geralmente faz?	1	2

Durante as últimas 4 semanas, de que maneira sua saúde física ou problemas emocionais interferiram nas suas atividades sociais normais, em relação a família, vizinhos, amigos ou em grupo?

(circule uma)

De forma nenhuma	1
Ligeiramente	2
Moderadamente	3
Bastante	4
Extremamente	5

7. Quanta dor no corpo você teve durante as últimas 4 semanas?  
(circule uma)

Nenhuma	1
Muito leve	2
Leve	3
Moderada	4
Grave	5
Muito grave	6

Durante as últimas 4 semanas, quanto a dor interferiu com o seu trabalho normal (incluindo tanto o trabalho fora de casa como dentro de casa)? (circule uma)

De maneira alguma	1
Um pouco	2
Moderadamente	3
Bastante	4
Extremamente	5

Estas questões são sobre como você se sente e como tudo tem acontecido com você durante as últimas 4 semanas. Para cada questão, por favor dê uma resposta que mais se aproxime da maneira como você se sente. Em relação as últimas 4 semanas.

(circule um número para cada linha)

	Todo tempo	A maior parte do tempo	Uma boa parte do tempo	Alguns partes do tempo	Uma pequena parte do tempo	Nunca
a) Quanto tempo você tem se sentido cheio de vigor, cheio de vontade, cheio de força?	1	2	3	4	5	6
b) Quanto tempo você tem se sentido uma pessoa muito nervosa?	1	2	3	4	5	6

c) Quanto tempo você tem se sentido tão deprimido que nada pode animá-lo?	1	2	3	4	5	6
d) Quanto tempo você tem se sentido calmo ou tranquilo?	1	2	3	4	5	6
e) Quanto tempo você tem se sentido com muita energia?	1	2	3	4	5	6
f) Quanto tempo você tem se sentido desanimado e abatido?	1	2	3	4	5	6
g) Quanto tempo você tem se sentido esgotado?	1	2	3	4	5	6
h) Quanto tempo você tem se sentido uma pessoa feliz?	1	2	3	4	5	6
i) Quanto tempo você tem se sentido cansado?	1	2	3	4	5	6

Durante as últimas 4 semanas, quanto do seu tempo a sua física ou problemas emocionais interferiram com as suas atividades sociais (como visitar amigos, parentes, etc.)?

(circule uma)

Todo o tempo 1

A maior parte do tempo 2

Alguma parte do tempo	3
Uma pequena parte do tempo	4
Nenhuma parte do tempo	5

O quanto verdadeiro ou falso é cada uma das afirmações para você?

(circule um número em cada linha)

	Definitivamente verdadeira	A maioria das vezes verdadeira	Não sei	A maioria das vezes falsa	Definitivamente falsa
a) Eu costumo adoecer um pouco mais facilmente que as outras pessoas	1	2	3	4	5
b) Eu sou tão saudável quanto qualquer pessoas que eu conheço	1	2	3	4	5
c) Eu acho que a minha saúde vai piorar	1	2	3	4	5
d) Minha saúde é excelente	1	2	3	4	5

## Anexo 4

### Questionário WHOQOL-abreviado

Instruções					
<p>Este questionário é sobre como você se sente a respeito de sua qualidade de vida, saúde e outras áreas de sua vida. Por favor responda a todas as questões. Se você não tem certeza sobre que resposta dar em uma questão, por favor, escolha entre as alternativas a que lhe parece mais apropriada. Esta, muitas vezes, poderá ser sua primeira escolha.</p> <p>Por favor, tenha em mente seus valores, aspirações, prazeres e preocupações. Nós estamos perguntando o que você acha de sua vida, tomando como referência as duas últimas semanas. Por exemplo, pensando nas últimas duas semanas, uma questão poderia ser:</p>					
	nada	Muito pouco	moderadamente	muito	completamente
Você recebe dos outros o apoio	1	2	3	4	5

de que necessit a?					
-----------------------	--	--	--	--	--

Você deve circular o número que melhor corresponde ao quanto você recebe dos outros o apoio de que necessita nestas últimas duas semanas. Portanto, você deve circular o número 4 se você recebeu "muito" apoio como abaixo.

	nada	Muito pouco	médio	muito	completamente
Você recebe dos outros o apoio de que necessita?	1	2	3	4	5

Você deve circular o número 1 se você não recebeu "nada" de apoio.

Por favor, leia cada questão, veja o que você acha e circule no número e lhe parece a melhor resposta.

		muito ruim	Ruim	nem ruim nem boa	boa	muito boa
--	--	------------	------	------------------	-----	-----------

1	Como você avaliaria sua qualidad e de vida?	1	2	3	4	5
		muito insati sfeito	Insati sfeito	nem satisf eito nem insati sfeito	satis feito	muit o satis feito
2	Quão satisf eito(a) você está com a sua saúde ?	1	2	3	4	5

As questões seguintes são sobre o quanto você tem sentido algumas coisas nas últimas duas semanas.

		na da	mui to pou co	mai s ou me nos	basta nte	extrema mente
3	Em que medida você acha que sua dor (física) impede você de fazer o que você precisa ?	1	2	3	4	5
4	O quanto você precisa de algum tratamento médico para levar sua	1	2	3	4	5

	vida diária?					
5	O quanto você aproveitou a vida?	1	2	3	4	5
6	Em que medida você acha que a sua vida tem sentido?	1	2	3	4	5
7	O quanto você consegue se concentrar?	1	2	3	4	5
8	Quão seguro(a) você	1	2	3	4	5

	se sente em sua vida diária?					
9	Quão saudável é o seu ambiente físico (clima, barulho, poluição, atrativos)?	1	2	3	4	5

As questões seguintes perguntam sobre quão completamente você tem sentido ou é capaz de fazer certas coisas nestas últimas duas semanas.						
		na da	muito pouco	médio	mu ito	completa mente

1 0	Você tem energia suficiente para seu dia a dia?	1	2	3	4	5
1 1	Você é capaz de aceitar sua aparência física?	1	2	3	4	5
1 2	Você tem dinheiro suficiente para satisfazer suas necessidades?	1	2	3	4	5
1 3	Quão disponíveis para você estão as informações que precisa	1	2	3	4	5

	no seu dia-a-dia?					
1 4	Em que medida você tem oportunidades de atividade de lazer?	1	2	3	4	5

As questões seguintes perguntam sobre quão bem ou satisfeito você se sentiu a respeito de vários aspectos de sua vida nas últimas duas semanas.

		muito ruim	ruim	nem ruim nem bom	bom	muito bom
1 5	Quão bem você é capaz de se locomover?	1	2	3	4	5

		muito insatisfeito	Insatisfeito	nem satisfeito nem insatisfeito	satisfeito	Muito satisfeito
16	Quão satisfeito(a) você está com o seu sono?	1	2	3	4	5
17	Quão satisfeito(a) você está com sua capacidade de desempenhar as atividades do seu	1	2	3	4	5

	dia-a-dia?					
18	Quão satisfeito(a) você está com sua capacidade para o trabalho?	1	2	3	4	5
19	Quão satisfeito(a) você está consigo mesmo?	1	2	3	4	5
20	Quão satisfeito(a) você está com suas	1	2	3	4	5

	relações pessoais (amigos, parentes, conhecidos, colegas)?					
2 1	Quão satisfeito(a) você está com sua vida sexual?	1	2	3	4	5
2 2	Quão satisfeito(a) você está com o apoio que você recebe	1	2	3	4	5

	de seus amigos ?					
2 3	Quão satisfei to(a) você está com as condiç ões do local onde mora?	1	2	3	4	5
2 4	Quão satisfei to(a) você está com o seu acesso aos serviço s de saúde?	1	2	3	4	5
2 5	Quão satisfei	1	2	3	4	5

	to(a) você está com o seu meio de transp orte?					
--	--	--	--	--	--	--

As questões seguintes referem-se à com que frequência você sentiu ou experimentou certas coisas nas últimas duas semanas.

		nu nc a	Alg um as vez es	frequen temen te	muito frequen temen te	se mp re
2 6	Com que frequ ência você tem sentim ent os negati vos tais como mau	1	2	3	4	5

	humor, desespero, ansiedade, depressão?					
--	--	--	--	--	--	--

Alguém lhe ajudou a preencher este questionário?

.....

Quanto tempo você levou para preencher este questionário?

.....

## Anexo 4

## Artigo Publicado

International Immunopharmacology 18 (2014) 277–281



Contents lists available at ScienceDirect

International Immunopharmacology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/intimp](http://www.elsevier.com/locate/intimp)

Short communication

## Inflammatory cytokines in Paget's disease of bone

Gláucio Ricardo Werner de Castro<sup>a,b,\*</sup>, Ziliani Buss<sup>c</sup>, Julia Salvan Da Rosa<sup>c</sup>, Tânia Silvia Fröde<sup>c</sup><sup>a</sup> Medicine School, Campus Pedra Branca, Universidade do Sul de Santa Catarina, Palhoça, SC, Brazil<sup>b</sup> Rheumatology Unit, Hospital Governador Celso Ramos, Florianópolis, SC, Brazil<sup>c</sup> Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 6 November 2013

Received in revised form 28 November 2013

Accepted 5 December 2013

Available online 17 December 2013

## Key words:

Paget's disease of bone

Cytokines

TNF  $\alpha$ Interleukin 1  $\beta$ 

Interleukin 6

Interleukin 17

## ABSTRACT

This study was undertaken to evaluate the expression of inflammatory cytokines in patients with Paget's disease of bone (PDB). Serum levels of tumoral necrosis factor- $\alpha$ , interleukin 1 $\beta$ , interleukin-6 and interleukin-17 were measured in 51 patients with PDB and in 24 controls with primary osteoarthritis. Compared to controls, patients with Paget's disease of bone presented higher levels of interleukin 6 and reduced interleukin 17, but levels of tumoral necrosis factor  $\alpha$  and interleukin 1  $\beta$  did not differ significantly. We found no significant differences when patients were compared according to disease activity or current treatment. There were no correlations between cytokine levels and bone-specific alkaline phosphatase or extension of Paget's disease of bone on bone scintigraphs. In conclusion, patients with PDB present significant differences on levels of certain cytokines in comparison to primary osteoarthritis patients, but these alterations did not appear to have a clear correlation with parameters of disease activity or severity.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

## Anexo 5

Artigo submetido para publicação

Determinants of quality of life assessed by SF-39 and WHOQOL-bref in a sample of patients with Paget's disease of bone.

Gláucio Ricardo Werner de Castro, MD, MSc.<sup>1,2</sup>, Sylvania Ana Fernandes de Castro, PT<sup>3</sup>, Ivanio Alves Pereira, MD, PhD<sup>1,4</sup>, Adriana Fontes Zimmermann, MD, PhD<sup>2,4</sup>, Maria Amazile Toscano, MD<sup>5</sup>, Fabricio Souza Neves, MD, PhD<sup>4</sup>, Maria Aparecida Scottini, MD<sup>1</sup>, Juliane Paupitz, MD<sup>2</sup>, Julia Salvan da Rosa, MSc<sup>6</sup>, Ziliani Buss, PhD<sup>6</sup>, Tânia Silvia Fröde, PhD<sup>6</sup>

1 - Medicine School. Campus Pedra Branca. Universidade do Sul de Santa Catarina. Palhoça/SC. Brazil.

2 – Rheumatology Unit. Hospital Governador Celso Ramos. Florianópolis/SC. Brazil

3 – Private Office. Florianopolis/SC. Brazil

4 – Rheumatology Unit. Hospital Universitário. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianopolis/SC. Brazil

5- Centro Catarinense de Reabilitação, Florianopolis/SC. Brazil

6 - Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Catarina. Florianópolis/SC. Brazil

**Corresponding author:** Gláucio Ricardo Werner de Castro. Rheumatology Unit. Hospital Governador Celso Ramos. R. Irmã Bernwarda, 297. Centro. Florianópolis/SC. Brazil. ZIP 88015-270. Phone/FAX: +55 (48) 33338017

E-mail: [castrogrwc@gmail.com](mailto:castrogrwc@gmail.com)

Abstract

Paget's disease of bone (PDB) is usually asymptomatic, but may cause bone pain and complications that can adversely affect the quality of life of the symptomatic PDB patient. Studies evaluating quality of life in PDB

patients have been published but few of them have focused on determinants of quality of life in this population. This study was undertaken to evaluate parameters associated to quality of life in PDB patients.

### Methods

Patients with PDB were evaluated with SF-36 and WHOQOL questionnaires. Patients with other diseases that could cause significant impairment to quality of life were excluded. We searched for correlations between tests results and: age, time from diagnosis, type of involvement, pain related to PDB limitation to daily activities, deformities, bone specific alkaline phosphatase, extent of involvement and treatment.

### Results

Fifty patients were included. Results of SF-36 total score and of both its physical and mental health domains were correlated to bone pain and deformities. Marital status was significantly correlated with SF-36 total score and Mental Health. BAP levels and disease extension were significantly correlated to SF-36 Physical Health domain. After multivariate analysis, the only parameters that remained significantly associated to SF-36 total score and to its Mental Health and Physical Health domains were pain and marital status.

WHOQOL-bref total score was significantly associated with: pain, physical impairment and deformities. WHOQOL-bref Domain 1 (physical) score was significantly associated with marital status, pain and deformities and Domain 2 (psychological) score was associated with marital status, physical impairment, and kind of involvement. After multivariate analysis, presence of pain, deformities and marital status were significantly associated to results of WHOQOL-bref total score and its Domain 1). WHOQOL-bref domain 2 results were significantly predicted by pain and marital status.

### Conclusion

The main disease related factor associated with SF-36 results in PDB patients was bone pain and with WHOQOL-bref, bone pain and deformities. Because of the heterogeneity of manifestations of this

disease and the long period necessary for some complications to develop, quality of life questionnaires might not be an appropriate endpoint for short-term studies of treatment of PDB.

**Key words: Paget's disease of bone, quality of life, SF-36, WHOQOL-bref**

## **Introduction**

Paget's disease of bone (PDB) is a common osteometabolic disease characterized by increased and disorganized bone turnover. It is usually asymptomatic, but may cause bone pain, fractures, deformities, secondary osteoarthritis, neurologic and cardiac complications and, in rare cases, neoplasm. [1] [2]. These complications can adversely affect the quality of life of the symptomatic PDB patient. Therefore, studies evaluating quality of life in PDB patients and how this is affected by treatment have been published.[3][4][5][6][7][8][9][10]

Few of these studies have focused on determinants of quality of life in this population. This kind of data is important in evaluation of treatment effects on quality of life. If the parameters related to poor quality of life are affected by currently available treatments, an increase in quality of life is expected after the treatment. On the other hand, if some important parameters are not influenced by PDB's treatment, then measures of quality of life would have limited role in evaluation of different therapeutic options. The present study was undertaken to evaluate parameters associated to quality of life in PDB patients.

## **Methods**

Patients with PDB followed by rheumatologists in Florianopolis , Brazil, were invited to participate in this study . Exclusion criteria were: incapacity to understand the questionnaires and presence of any other chronic disease that may adversely affect quality of life, including: depression, dementia, systemic inflammatory diseases, primary osteoarthritis of the lower limber, neurological syndromes not due to PDB, acute or chronic infections, peripheral arterial insufficiency,

ischemic cardiac disease, heart failure, chronic pulmonary diseases, renal or hepatic insufficiency, neoplasm and osteoporotic fractures.

PDB and osteoarthritis were diagnosed by typical findings on X-rays. Disease activity was evaluated by <sup>99m</sup>Tc MDP bone scintigraphs; a patient was considered to have active disease if bone scintigraph shows high uptake suggestive of PDB and other possible diagnosis were excluded by x-rays or other computed tomography. Disease extension was evaluated by X-rays and bone scintigraphs, previous and recent. The method described by Meunier et al.[11] was used to calculate disease extension on bone scintigraphs. A patient was considered to be in current treatment if he had used oral bisphosphonates (alendronate, risedronate or ibandronate) in the past 6 months or zoledronic acid in the past 12 months. No patient has taken calcitonin, intravenous ibandronate or pamidronate in the past 12 months. Fasting blood samples were collected for determination of bone-specific alkaline phosphatase (BAP) by enzyme-linked immunosorbent assay (Mybiosource, San Diego, CA, ref. MBS724100) .

Patients were asked to answer to the Brazilian versions of SF-36 [12] and WHOQOL-bref [13] questionnaires. Results were further compared among subgroups defined by clinical characteristics and correlated to disease activity and extension parameters. Study protocol was approved by local ethical committee (protocol number 353461). All subjects signed an informed consent form, this study was conducted in accordance to the principles of the Declaration of Helsinki[14].

#### Statistical Analysis

Comparisons of subgroups were done with Mann-Whitney U test. Correlations between continuous variables were analyzed by Spearman's rho correlation. Generalized linear model regression was used to assess the association between the results of quality of life tests and PDB parameters. Results are presented as mean (SD) or median (25 - 75 percentiles).

Statistical analysis was performed with SPSS 18.0, with a level of significance of 0.05.

## Results

Seventy seven PDB patients were screened and 50 patients were included. Reasons for exclusions are listed in table 1. Subjects were mainly women (60.8%), Caucasian (96.8%) and married (80.6%). They had a mean age of  $66.32 \pm 8.65$  years and had  $7.69 \pm 6.15$  years from diagnosis. Most subjects had polyostotic disease (74.2%) and 29% had a positive familial history. 41.9% were considered to be on active treatment and 38,7% were considered to have active disease on bone scintigraphs. Bone pain related do PDB in any moment was reported by 56.9% of subjects, but only 32.3% had current bone pain, 19.4% had deformities secondary to PDB, 12.9% any physical impairments due to PDB and 32.3% had osteoarthritis considered to be secondary to PDB. (table 2)

### SF-36

Median total score in SF-36 questionnaire was 60.91 (38.81 – 78.54) (figure 1), median score of Physical health component was 62.60 (38.20 – 75.80) and of mental health component was 59.70 (41.30 – 79.90). Results of SF-36 total score and its Physical health and Mental Health components were not significantly different when subjects were divided according to: sex, kind of involvement (monostotic or polyostotic), current disease activity, current treatment of PDB, presence of physical impairments due to PDB, presence of secondary osteoarthritis . Results of SF-36 total score and of both its physical and mental health domains were significantly different when patients were categorized according to: present bone pain (p: 0.027, 0.008 and 0.15, respectively) and deformities secondary to PDB (p 0.011, 0.0,12 and 0.017, respectively) Marital status was significantly correlated with SF-36 total score and Mental Health domain (p:0.046 and 0.016, respectively) , but not with Physical Health domain. (table 3). BAP levels and disease extension were significantly correlated to SF-36 Physical Health domain (p:0.038 and 0.03, respectively), but not to SF-36 total score or to Mental Health domain. Time from diagnosis was neither associated to SF-36 total score nor to any of its domains. (table 4)

In regression analysis, we included parameters with significant association to variations in SF-36 results (current bone pain, deformities,

marital status and disease extension) and some factors theoretically associated to worse results: age, presence of impairments and deformities. BAP levels were excluded because they were correlated with disease extension (Pearson correlation  $r = 0,673$   $p < 0,001$ ). After regression, the only parameters that remained significantly associated to SF-36 total score and to its Mental Health and Physical Health domains were pain and marital status (value of  $p$ , respectively, pain: 0.001, 0.002 and 0.003; marital status: 0.005, 0.003 and 0.015) (table 5).

#### WHOQOL-bref

Median score of WHOQOL-bref questionnaire was 14,61 (13.03 – 15.69) (figure 2). Results of its domains were: domain 1 (physical function): 14.28 (12.00-16.14), domain 2 (psychological): 14.66 (13.81-17.33), domain 3 (social relationship): 15.33 (13.33-16.00), domain 4 (environment): 14.5 (12.89-16.00). WHOQOL-bref total score was significantly associated with: pain, physical impairment and presence of deformities ( $p$ : 0.019, 0.016, 0.006 respectively). It was not associated with: sex, marital status, disease activity, current treatment, presence of secondary osteoarthritis or kind of involvement (monostotic or polyostotic). (table 6) There was no correlation between WHOQOL-bref score and: BAP, age, time from diagnosis and disease extension.(table 7)

Concerning to WHOQOL-bref domains, only the results of physical (domain 1) and the psychological (domain 2) components were further analyzed. Domain 1 score was significantly associated with marital status, pain and deformities, ( $p$ : 0.042, 0,011, 0.010, respectively) but not with sex, physical impairment, kind of involvement or osteoarthritis, disease activity or current treatment. Median results of domain 2 score were associated with marital status, physical impairment, and kind of involvement (0.029, 0.021, 0.031, respectively), but not with sex pain, current treatment, disease activity, deformities and osteoarthritis (table 6). WHOQOL-bref domains 1 and 2 were not associated to: BAP, age, time from diagnosis and disease extension. (table 7)

Regression was performed with the same parameters chosen for SF-36 analysis. Presence of pain, deformities and marital status were significantly associated to results of WHOQOL-bref total score and its

Domain 1 in regression (p results, respectively: total score: 0.040, 0.013, 0.031; domain 1: 0.022, 0.004, 0.004). WHOQOL-bref domain 2 results were significantly predicted by pain and marital status (p0.032 and 0.003, respectively) (table 8).

Results of SF36 total score and WHOQol-bref total score were well correlated ( $r = 0,741 < p, 0,001$ ).

## Discussion

Paget's disease of bone can be completely asymptomatic in one extreme of its clinical presentation, but in the other extreme it can cause life-threatening complications, such as intracranial hypertension, severe heart failure and osteosarcoma. Between these extremes, many patients experience manifestations that could impair their quality of life, like bone pain, secondary osteoarthritis, fractures, peripheral nerve compressions and hearing impairment. [1][2]

In the first study to evaluate quality of life in this population, Gold et al. [9] have found that the majority of PDB patients considered that they did not have good quality of life. However, that study did not employ a standardized questionnaire and, although a high number of subjects were evaluated, a large number of them had PDB complications or comorbidities that can adversely affect quality of life.

Other studies have evaluated quality of life in PDB patients using SF-36 questionnaire [8] [6] [3]. In general, these studies have reported reduced quality of life in this population, but only one of them has searched for predictors of quality of life. Langston et al. [3] have found that SF36 Physical Health domain was predicted by: bone pain, age and previous bisphosphonate treatment and the Mental Health domain by previous bisphosphonate treatment, not being married and bone pain. As in our study, BAP levels were not correlated to SF-36 results.

In line with the previous findings the factors that significantly predicted results of both quality of life scores in our population were bone pain and marital status. WHOQOL-bref results were also predicted by deformities.

Treatment of PDB with potent bisphosphonates, particularly zoledronic acid, is very efficient in controlling disease activity and reduces bone pain in most patients[2] [15][5]. By reducing disease activity, treatment is also expected to prevent long term complications of PDB. Therefore, it would be expected that treatment with bisphosphonates results in improved quality of life in PDB and some studies have evaluated this question, usually as a secondary end point. The Horizon study [5][10] has shown that zoledronic acid was able to improve quality of life in PDB patients and this result was maintained for a long time. Interestingly, risedronate, in spite of being effective in a large proportion of patients, did not produce similar effects on quality of life. By the other side, in another study, the PRISM trial, treatment of PDB was not able to induce improvements in quality of life [4]. This might have happened because most patients used risedronate, but other factors should be considered, including the appropriateness of Quality of Life scores as endpoints in studies of PDB treatment. In the present study, as in the study of Langston et al [3], bone pain was the only parameter directly related to PDB that significantly predicts SF-36 results, but not every PDB patient has pain and pain is not the only indication for treatment of this disease. Moreover, other sources of pain, such as secondary osteoarthritis, are not affected by treatment of PDB. Besides control of symptoms, treatment of PDB is also indicated to prevent long-term complications[15][16], so, a very long follow-up period should be employed in order to detect long term effects on quality of life due to prevention of complications. Another factor that could impair the utility of quality of life questionnaires in evaluation of PDB treatment is the high prevalence of comorbidities in elder people, the population most affected by PDB.

The main limitation of the present study is the relatively small sample, which results in low number of subjects with some PDB complications that could impair quality of life but that are not highly prevalent, like hearing impairment. Besides, we were not able to compare our results to those of normal Brazilian population because there are not reference values of these tests for our population. By the other hand, we were able to exclude subjects with concomitant diseases that also affect

quality of life, therefore eliminating a confusion factor, which was not done by other studies that have evaluated quality of life in PDB.

In conclusion, the main disease related factor associated with SF-36 results in PDB patients was bone pain and with WHOQOL-bref, bone pain and deformities. Because of the heterogeneity of manifestations of this disease and the long period necessary for some complications to develop, questionnaires like those might not be an appropriate endpoint for short-term studies of treatment of PDB.

## References

1. Ralston SH. Pathogenesis of Paget's disease of bone. *Bone*. 2008 Nov;43(5):819–25.
2. Werner de Castro GR, Heiden GI, Zimmermann AF, Morato EF, Neves FS, Toscano MA, et al. Paget's disease of bone: analysis of 134 cases from an island in Southern Brazil: another cluster of Paget's disease of bone in South America. *Rheumatol. Int.* 2012 Mar;32(3):627–31.
3. Langston AL, Campbell MK, Fraser WD, MacLennan G, Selby P, Ralston SH. Clinical determinants of quality of life in Paget's disease of bone. *Calcif. Tissue Int.* 2007 Jan;80(1):1–9.
4. Langston AL, Campbell MK, Fraser WD, MacLennan GS, Selby PL, Ralston SH. Randomized trial of intensive bisphosphonate treatment versus symptomatic management in Paget's disease of bone. *J. Bone Miner. Res.* 2010 Jan;25(1):20–31.
5. Reid IR, Lyles K, Su G, Brown JP, Walsh JP, Del Pino-Montes J, et al. A single infusion of zoledronic acid produces sustained remissions in Paget disease: data to 6.5 years. *J. Bone Miner. Res.* 2011 Sep;26(9):2261–70.
6. Seton M, Moses AM, Bode RK, Schwartz C. Paget's disease of bone: the skeletal distribution, complications and quality of life as perceived by patients. *Bone*. 2011 Feb;48(2):281–5.
7. Visconti MR, Langston AL, Alonso N, Goodman K, Selby PL, Fraser WD, et al. Mutations of SQSTM1 are associated with severity and clinical outcome in paget disease of bone. *J. Bone Miner. Res.* 2010 Nov;25(11):2368–73.
8. Saraux A, Brun-Strang C, Mimaud V, Vigneron A-M, Lafuma A. Epidemiology, impact, management, and cost of Paget's disease of bone in France. *Joint Bone Spine*. 2007 Jan;74(1):90–5.
9. Gold DT, Boisture J, Shipp KM, Pieper CF, Lyles KW. Paget's disease of bone and quality of life. *J. Bone Miner. Res.* 1996 Dec;11(12):1897–904.
10. Reid IR, Miller P, Lyles K, Fraser W, Brown JP, Saidi Y, et al. Comparison of a single infusion of zoledronic acid with risedronate for

Paget's disease. *N. Engl. J. Med.* 2005 Sep 1;353(9):898–908.

11. Meunier PJ, Salson C, Mathieu L, Chapuy MC, Delmas P, Alexandre C, et al. Skeletal distribution and biochemical parameters of Paget's disease. 1987 Apr;37–44.

12. Ciconelli RM, Ferraz MB, Santos W, Meinão I, Quaresma MR. Tradução para a língua portuguesa e validação do questionário genérico de avaliação de qualidade de vida SF-36 (Brasil SF-36). 1999;143–50.

13. Fleck MP, Louzada S, Xavier M, Chachamovich E, Vieira G, Santos L, et al. Aplicação da versão em português do instrumento abreviado de avaliação da qualidade de vida “WHOQOL-bref”.

14. WMA Declaration of Helsinki - Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects [Internet]. [cited 2012 Sep 6]. Available from:  
<http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>

15. Ralston SH, Langston AL, Reid IR. Pathogenesis and management of Paget's disease of bone. *Lancet.* 2008 Jul 12;372(9633):155–63.

16. Selby P., Davie MW., Ralston S., Stone M. Guidelines on the management of Paget's disease of bone. *Bone.* 2002 Sep;31(3):366–73.