CARLA GONÇALVES SCHAHIN SAAD

**Baixos níveis de esclerostina: preditor de processo
inflamatório persistente em pacientes com
espondilite anquilosante sob terapia anti-TNF α**

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

Programa de: de Ciências Médicas

Área de concentração: Processos Imunes e
Infecciosos

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosa Maria Rodrigues
Pereira

**SÃO PAULO
2012**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Saad, Carla Gonçalves Schahin

Baixos níveis de esclerostina : preditor de processo inflamatório persistente em pacientes com espondilite anquilosante sob terapia anti-TNF / Carla Gonçalves Schahin Saad. -- São Paulo, 2012.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Processos Imunes e Infecciosos.

Orientadora: Rosa Maria Rodrigues Pereira.

Descritores: 1.Espondilite anquilosante 2.Via de sinalização Wnt 3.Fator de necrose tumoral alfa 4.Inflamação 5.Formação óssea

USP/FM/DBD-328/12

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese ao meu avô, Dr. Joaquim Gonçalves Filho, precursor da Reumatologia na nossa família e que nos transmitiu a paixão pela Medicina e por esta especialidade.

Ao meu marido Luís Felipe e aos meus filhos Luís Otávio e Maria Gabriela pelo SEMPRE apoio, estímulo, amor e compreensão.

Em especial, aos meus pais, tão queridos e que sempre estiveram ao meu lado, estimulando, orientando e passando segurança. Ao Dr. Célio por transmitir o amor pela Reumatologia e pela patologia que foi o fundamento desta Tese.

As minhas irmãs, Renata e Roberta, e respectivas famílias pelo carinho, apoio e constante estímulo.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Rosa Maria Rodrigues Pereira, pelos ensinamentos e incentivo na elaboração deste trabalho. Agradeço também pelo carinho e por toda dedicação e perseverança que teve durante estes anos.

À Prof^a. Eloisa Bonfá, pelas oportunidades, carinho, apoio, pelas importantes orientações e por tantos ensinamentos como pesquisadora, desde a minha Residência Médica em Reumatologia.

Aos meus amigos do CEDMAC, que tiveram grande influência na elaboração deste projeto.

Ao Prof. Dr. Clóvis Artur Almeida da Silva, pela alegria, incentivo e paixão por orientar e ensinar pesquisa a todos que estão ao seu lado.

Aos assistentes da Reumatologia da Disciplina de Reumatologia da FMUSP, especialmente do Ambulatório de Espondiloartrites, Dr. Célio, Dr^a. Cláudia, Dr. Júlio e Dr. Percival, pela amizade, apoio e carinho.

À todos os funcionários do CEDMAC, Secretárias e Equipe de Enfermagem, pela ajuda, atendendo sempre prontamente aos meus pedidos.

Às funcionárias do Laboratório de Metabolismo Ósseo, em especial a Liliam Takayama, pela ajuda árdua na elaboração deste projeto.

Às funcionárias do Laboratório de Investigação Médica da Reumatologia, Vilma Viana Trindade e Elaine Leon, pelo carinho, apoio e ajuda sempre que foi preciso.

Às secretarias da Reumatologia, Cláudia, Marta e Iná, por estarem sempre dispostas a me ajudar.

A todos os pacientes, que tornaram possível este estudo e que são o motivo desta pesquisa.

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação.
Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentações; 2012.

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

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de gráficos

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS	4
3 MÉTODOS	6
3.1 Pacientes	7
3.2 Desenho do Estudo	8
3.3 Avaliação dos Parâmetros Clínicos na EA.....	9
3.4 Avaliação Laboratorial dos Parâmetros Inflamatórios.....	9
3.5 Avaliação Laboratorial dos Hormônios Sexuais.....	9
3.6 Avaliação Laboratorial da Via de Sinalização Wnt.....	10
3.7 Avaliação Radiológica.....	10
3.8 Densitometria Óssea	11
3.9 Análise Estatística.....	11
4 RESULTADOS	13
4.1 Dados Demográficos, Características da Doença e Densidade Mineral Óssea em Pacientes e Controles no Início do Estudo	14
4.2 Níveis Séricos de Esclerostina e da Ligação de Esclerostina nos Pacientes e Controles.....	15
4.3 Correlação Entre o Dano Radiográfico (mSASSS) e a Densidade Mineral Óssea da Coluna Lombar no Início do Estudo	15
4.4 Melhora Longitudinal dos Parâmetros Clínicos e Redução dos Parâmetros Inflamatórios após Tratamento com Anti-TNF α	16
4.5 Aumento Longitudinal da Densidade Mineral Óssea da Coluna nos Pacientes com EA após o Tratamento com Anti-TNF α	17
4.6 Avaliação Longitudinal dos Níveis Séricos de Esclerostina e da Ligação da Esclerostina após o Tratamento com Anti-TNF α	19
4.7 Níveis Séricos de Esclerostina em Pacientes Com e Sem PCR Elevada aos 12 Meses de Tratamento	20
4.8 Níveis Basais de Esclerostina como Preditor de Inflamação Persistente	22
5 DISCUSSÃO.....	24
6 CONCLUSÕES.....	28
7 ANEXOS.....	30
8 REFERÊNCIAS	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASQoL	- Ankylosing Spondylitis quality of life questionnaire
BASDAI	- Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index
BASFI	- Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index
BASMI	- Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index
Cappesq	- Comissão de ética para análise de projetos de pesquisa
CV	- Coeficiente de variação
Dkk-1	- Dickkopf-related protein 1
DMO	- Densidade mineral óssea
DO	- Densidade óptica
DP	- Desvio padrão
DXA	- Absortometria de raio X de dupla energia
EA	- Espondilite Anquilosante
ELISA	- Enzimaimunoensaio
FMUSP	- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FSH	- Hormônio folículo estimulante
ISCD	- Sociedade Internacional de Densitometria Clínica
LRP6	- Receptor de lipoproteína de baixa densidade relacionado a proteína 6;
MMP-3	- Metalloproteinase 3 da matrix
mSASSS	- Modified Stoke Ankylosing Spondylitis Spine Score
PCR	- Protein C reativa
TNF α	- Fator de necrose tumoral alfa
VHS	- Velocidade de hemossedimentação
Wnt	- Wingless

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Correlação de Spearman entre o modified Stoke ankylosing spondylitis spinal score (mSASSS) e a densidade mineral óssea (DMO) da coluna lombar.....16
- Gráfico 2 - Comparações entre os níveis séricos de esclerostina em pacientes com espondilite anquilose (EA) no início do estudo, seis meses e 12 meses após terapia anti-TNF e controles saudáveis.....20
- Gráfico 3 - Comparações entre os níveis séricos de esclerostina de pacientes com espondilite anquilose (EA) com proteína C-reativa (PCR) <5mg/dl e PCR ≥ 5mg/dl após 12 meses de terapia anti-TNF e controles saudáveis.....21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Mudanças na avaliação clínica, densidade mineral óssea e análise laboratorial após tratamento com anti-TNF α em pacientes com EA.....	18
Tabela 2 -	Parâmetros basais considerados como preditores da resposta ao anti-TNF α e da inflamação persistente (PCR $\geq$ 5 mg / l) após 12 meses de tratamento	23

RESUMO

Saad CGS. *Baixos níveis de esclerostina: preditor de processo inflamatório persistente em pacientes com espondilite anquilosante sob terapia anti-TNF α* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

Introdução: Baixas concentrações séricas de esclerostina foram descritas em pacientes com Espondilite Anquilosante (EA). No entanto, não existem dados sobre a importância deste inibidor da via de sinalização Wnt em pacientes com EA durante o tratamento com anti fator de necrose tumoral alfa (TNF α). **Objetivos:** Avaliar longitudinalmente os níveis séricos de esclerostina e sua associação com inflamação e densidade mineral óssea (DMO) em pacientes com EA em tratamento com anti-TNF α . **Métodos:** Trinta pacientes com EA em atividade foram avaliados no início, 6 e 12 meses, após terapia anti-TNF α em relação aos parâmetros clínicos (BASDAI, BASFI, BASMI e ASQoL), marcadores inflamatórios e dano radiológico basal (mSASSS). Trinta indivíduos saudáveis pareados por idade e sexo constituíram o grupo controle. As análises laboratoriais de esclerostina e da ligação de esclerostina ao receptor LRP6 e a DMO foram realizadas nos pacientes nos mesmos períodos de avaliação e comparadas aos controles. **Resultados:** Na avaliação inicial, pacientes com EA apresentavam menores concentrações séricas de esclerostina [60,5 (32,7) vs. 96,7 (52,9) pmol/l, $P=0,002$] e níveis similares de ligação de esclerostina ao receptor LRP6 ($P=0,387$) em relação aos controles. Foi observado melhora do BASDAI, BASFI, BASMI, ASQoL comparando tempo basal vs. 6 vs. 12 meses ($P<0,01$). Concomitantemente, observou-se um aumento gradual da DMO da coluna lombar ($P<0,001$) e no início do estudo os pacientes apresentavam uma correlação positiva entre avaliação radiológica basal (mSASSS) e a DMO da coluna lombar ($r=0,468$, $P<0,01$). Foi

observada também uma redução dos marcadores inflamatórios comparando tempo basal vs. 6 vs. 12 meses ($P<0,01$). Os níveis de esclerostina aumentaram progressivamente após o tratamento com anti-TNF α [60,5 (32,7) vs. 67,1 (31,9) vs. 72,7 (32,3) pmol/l, $P<0,001$]. Entretanto, após 12 meses de terapia anti-TNF α as concentrações séricas de esclerostina permaneceram significativamente mais baixas em relação os controles [72,7 (32,3) vs. 96,7 (52,9) pmol/l, $P=0,038$]. Além disso, aos 12 meses, os níveis séricos de esclerostina ficaram mais baixos nos 10 pacientes que ainda apresentavam proteína C reativa elevada ($PCR\geq 5\text{mg/l}$), comparados aos pacientes que apresentaram normalização dos níveis de PCR ($P=0,004$). Interessantemente, estes 10 pacientes com inflamação persistente já apresentavam concentrações séricas mais baixas de esclerostina quando comparados aos demais pacientes ($P=0,023$) antes do tratamento com anti-TNF α . A análise de regressão logística demonstrou que os pacientes com EA com níveis baixos de esclerostina apresentam um risco aumentado de apresentar PCR alta após 12 meses de tratamento (odds ratio = 7,43, 95% IC 1,23-45,01, $P=0,020$) quando comparados aos pacientes com níveis altos de esclerostina no tempo basal. **Conclusão:** Concentrações persistentemente baixas de esclerostina estão associados a inflamação contínua em pacientes com EA tratados com terapia anti-TNF α .

Descritores: Espondilite anquilosante. Via de sinalização Wnt. Fator de necrose tumoral alfa. Inflamação. Formação óssea.

SUMMARY

Saad CGS. *Low sclerostin levels: a predictive marker of persistent inflammation in ankylosing spondylitis during anti-TNF therapy* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

Introduction: Sclerostin levels have been reported to be low in ankylosing spondylitis (AS), but there is no data regarding the possible role of this Wnt inhibitor during anti tumor necrosis factor alpha (TNF α) therapy. **Objectives:** The present study longitudinally evaluated sclerostin levels, inflammatory markers and bone mineral density (BMD) in AS patients under anti-TNF α therapy. **Methods:** Thirty active AS patients were assessed at baseline, 6 and 12 months after anti-TNF α therapy regarding clinical parameters (BASDAI, BASFI, BASMI and ASQoL), inflammatory markers, BMD and baseline radiographic damage (mSASSS). Thirty age- and sex-matched healthy individuals comprised the control group. Patients' sclerostin levels, sclerostin binding LRP6 and BMD were evaluated at the same time points and compared to controls. **Results:** At baseline, AS patients had lower sclerostin levels [60.5 (32.7) vs. 96.7 (52.9) pmol/l, $P=0.002$] and comparable sclerostin binding to LRP6 ($P=0.387$) than controls. Improvement of BASDAI, BASFI, BASMI, ASQoL was observed at baseline vs. 6 vs. 12 months ($P<0.01$). Concomitantly, a gradual increase in spine BMD ($P<0.001$) and a positive correlation between baseline mSASSS and spine BMD was found ($r=0.468$, $P<0.01$). Inflammatory parameters reduction was observed comparing baseline vs. 6 vs. 12 months ($P<0.01$). Sclerostin levels progressively increased [60.5 (32.7) vs. 67.1 (31.9) vs. 72.7 (32.3) pmol/l, $P<0.001$] after anti-TNF α treatment. At 12 months, the sclerostin levels remained significantly lower in patients compared to controls [72.7 (32.3) vs. 96.70 (52.85) pmol/l, $P=0.038$]. Moreover, sclerostin serum levels at 12 months were lower in the 10 patients with high CRP ($\geq 5\text{mg/l}$) compared to

the other 20 patients with normal CRP ($P=0.004$). Of note, these 10 patients with persistent inflammation also had lower sclerostin serum levels at baseline compared to the other patients ($P=0.023$). Univariate logistic regression analysis demonstrated that AS patients with lower sclerostin serum levels had an increased risk to have high CRP at 12 months (odds ratio=7.43, 95% CI 1.23-45.01, $P=0.020$) than those with higher sclerostin values. **Conclusion:** Persistent low sclerostin levels may underlie continuous inflammation in AS patients under anti-TNF α therapy.

Descriptors: Ankylosing spondylitis. Wnt Signaling Pathway. Tumor necrosis factor alpha. Inflammation. Bone formation.

1 INTRODUÇÃO

A espondilite anquilosante (EA) é uma doença inflamatória crônica caracterizada por neoformação óssea que leva ao crescimento de sindesmófitos e subsequente anquilose vertebral¹.

Vários biomarcadores, incluindo mediadores inflamatórios e fatores que refletem o remodelamento do tecido articular, têm sido avaliados a fim de determinar a sua relevância na EA em relação ao prognóstico clínico e a resposta terapêutica². Nesta doença, a busca de biomarcadores que regulam a formação óssea é essencial para compreender o mecanismo envolvido na regulação do crescimento ósseo e no processo inflamatório. A formação óssea na EA foi recentemente associada com a regulação da via de sinalização wingless (Wnt), uma via responsável pelo controle da osteoblastogênese³.

Os Inibidores naturais da via Wnt, como a esclerostina e o *dickkopf-related protein 1* (Dkk-1), neutralizam a atividade da via Wnt e são extremamente importantes na homeostase óssea normal, principalmente no mecanismo osteoblástico de neoformação óssea³⁻⁸. Dentre os fatores que regulam a via de sinalização Wnt β catenina destaca-se o fator de necrose tumoral alfa (TNF α), um importante mediador inflamatório com alta expressão em articulações sacroilíacas de pacientes com EA⁹⁻¹¹.

Os inibidores de TNF α são opções terapêuticas eficazes para o tratamento da doença axial e da artrite periférica nas espondiloartrites¹²⁻¹⁶. No entanto, antagonistas do TNF α não mostraram inibir o dano estrutural e a formação óssea ou progressão radiográfica dos pacientes com EA¹⁷⁻²¹, e a influência da inflamação localizada nos sítios em que se desenvolve a proliferação óssea tem sido questionada para explicar este mecanismo^{5,21}.

Além disso, um estudo recente demonstrou que a esclerostina é praticamente ausente em osteócitos de pacientes com EA⁵, reforçando a relevância dos inibidores naturais da via Wnt na patogênese da EA^{3,5-8}. Entretanto, ainda não existem dados sobre a importância deste inibidor natural da via Wnt em relação à resposta terapêutica ao anti-TNF α e sua associação com a inflamação. Neste sentido, o estudo em conjunto de biomarcadores que possam refletir os processos de reparação e inflamação é fundamental para esclarecer o benefício da terapia anti-TNF α na progressão da doença.

2 OBJETIVOS

a) Avaliação dos níveis séricos de esclerostina e de sua ligação ao receptor de lipoproteína de baixa densidade relacionado a proteína 6 (LRP6) em pacientes com EA ativa, e comparar com um grupo controle.

b) Avaliação longitudinal dos níveis séricos de esclerostina e de sua ligação ao LRP6 em pacientes com EA ativa sob terapia anti-TNF α .

c) Associação dos níveis séricos de esclerostina com os parâmetros clínicos, inflamatórios e densidade mineral óssea (DMO) em pacientes com EA ativa sob terapia anti-TNF α .

3 MÉTODOS

3.1 Pacientes

Foram incluídos 30 pacientes consecutivos com EA ativa em seguimento no Ambulatório de Espondiloartrites do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), encaminhados ao Centro de Infusão para iniciar tratamento com inibidores de TNF α . Todos os pacientes preenchiam os critérios de Nova Iorque modificados para o diagnóstico de EA²². Os pacientes foram avaliados no início do estudo e após seis e 12 meses do início da terapia com bloqueadores TNF α (19 Infliximabe, nove Adalimumabe e dois Etanercepte), em doses preconizadas. O grupo controle foi composto por 30 indivíduos saudáveis, pareados por sexo e idade.

Os critérios de inclusão foram pacientes com EA e doença ativa [*Bath AS Disease Activity Index* (BASDAI) ≥ 4 e/ou altos parâmetros inflamatórios], refratários a medicamentos anti-inflamatórios e medicações antirreumáticas modificadoras de doenças e que foram encaminhados para iniciar a terapia anti-TNF α .

Os critérios de exclusão para pacientes e controles foram a presença de outras doenças que poderiam ter um efeito sobre o metabolismo ósseo, tais como, hipertireoidismo, síndrome de má absorção, insuficiência renal e hepática, uso de álcool, uso prévio ou atual de bisfosfonatos, uso de

glicocorticoide > 5 mg/dia para os pacientes e uso de glicocorticoides em qualquer dose para o grupo controle. O uso de anti-inflamatórios não esteroides e de medicações antirreumáticas modificadoras da doença (sulfassalazina/metotrexato) foi mantido estável durante pelo menos três meses antes do estudo e permaneceu estável durante todo o estudo.

3.2 Desenho do Estudo

A análise longitudinal dos níveis séricos de esclerostina e da ligação de esclerostina ao LRP6, da DMO, dos marcadores inflamatórios e dos parâmetros clínicos foram avaliados no início do estudo, seis e 12 meses após o tratamento. A análise radiográfica dos pacientes com EA foi avaliada apenas antes do início do tratamento. A DMO, a dosagem de esclerostina e da ligação de esclerostina ao LRP6 também foram analisadas no início do estudo e após 12 meses para o grupo controle. Foi também realizada a avaliação dos hormônios sexuais nos pacientes e controles no início do estudo.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa local [Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (Cappesq) # 0239/08] da Universidade de São Paulo. Todos os participantes assinaram o termo de consentimento informado de acordo com a Declaração de Helsinki (Anexos A e B).

3.3 Avaliação dos Parâmetros Clínicos na EA

As medidas clínicas preconizadas para EA incluindo BASDAI, *Bath AS Functional Index* (BASFI), *Bath AS Metrology Index* (BASMI) and *AS quality of life questionnaire* (ASQoL) foram avaliadas no início do estudo e em cada visita de avaliação de acordo com as recomendações para seguimento de pacientes com EA²³.

3.4 Avaliação Laboratorial dos Parâmetros Inflamatórios

A atividade inflamatória laboratorial foi avaliada pelas dosagens da velocidade de hemossedimentação (VHS) em mm/h, da proteína C reativa (PCR) em mg/l e da metaloproteinase 3 da matriz (MMP-3) em ng/ml. A dosagem sérica da MMP-3 foi realizada utilizando o kit comercial de enzimaímunoensaio (ELISA) (*human total MMP-3 immunoassay ELISA kit, R&D Systems, Minneapolis, MN*), de acordo com as recomendações do fabricante.

3.5 Avaliação Laboratorial dos Hormônios Sexuais

A avaliação hormonal foi realizada no início do estudo em todos os pacientes e controles. O hormônio folículo estimulante (FSH) foi analisado em todos os pacientes e controles, a testosterona total nos pacientes do sexo masculino e o estradiol nos pacientes do sexo feminino. Todos os ensaios foram realizados no analisador de imunoensaio Cobas e 411, *Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Germany)*, de acordo com as instruções do fabricante. Os coeficientes de variação (CVs) intraensaio e interensaio foram inferiores a 6,0%.

3.6 Avaliação Laboratorial da Via de Sinalização Wnt

As amostras de soro foram coletadas de todos os pacientes e controles, após jejum de 12 horas e foram armazenadas à -80 ° C para posterior análise. Os níveis séricos de esclerostina foram medidos pelo método de ELISA sanduíche comercial [Lot Y105, valor de referência controle: 90,5 (84 ± 25) pmol/l, Biomedica, Vienna, Austria]²⁴. Os CVs intra-ensaio e inter-ensaio foram de 5% e 6%, respectivamente. A ligação de esclerostina ao LRP6 em pacientes com EA e controles foi medida no início do estudo e após 12 meses de tratamento utilizando um ELISA funcional. Resumidamente, placas de microtitulação foram revestidas com 5 µg/ml de LRP6-Fc quimérico humano (*recombinant human LRP6-Fc chimera; R&D Systems, Minneapolis, MN*) antes de se adicionar amostras de soro, e sua detecção foi realizada com anticorpo anti-esclerostina humano biotinilado (Biomedica, Viena, Áustria). Os resultados foram expressos em densidade óptica (DO₄₅₀). Os CVs intra-ensaio e inter-ensaio foram de 5% e 3-6%, respectivamente.

3.7 Avaliação Radiológica

As imagens radiográficas da coluna cervical e lombar dos pacientes com EA foram avaliadas, no início do estudo, concomitantemente e com concordância de dois médicos treinados e com grande experiência (um reumatologista e um radiologista músculo-esquelético), utilizando o método modificado de Stoke para pontuação do dano radiológico na coluna dos pacientes com EA, *modified Stoke Ankylosing Spondylitis Spine Score* (mSASSS)²⁵.

3.8 Densitometria Óssea

A densidade mineral óssea foi medida em pacientes e controles saudáveis na coluna lombar, colo do fêmur, fêmur total e corpo inteiro por absorptometria de raio X de dupla energia (DXA). Foi utilizado o equipamento de densitometria HOLOGIC (QDR 4500) do Laboratório de Metabolismo Ósseo do Serviço de Reumatologia da FMUSP. Todas as medições da DMO foram realizadas pelo mesmo técnico. O erro de precisão para medições da DMO foi determinado com base no padrão dos protocolos da Sociedade Internacional de Densitometria Clínica (ISCD)²⁶. Determinou-se como uma mudança significativa mínima, com 95% de confiança, os valores de 0,033 g/cm² na coluna, 0,047 g/cm² no colo do fêmur, 0,039 g/cm² no fêmur total. A DMO foi expressa em g/cm².

3.9 Análise Estatística

Os resultados estão apresentados como média e desvio padrão (DP) para variáveis contínuas e percentuais para variáveis categóricas. Para avaliar diferenças entre as variáveis contínuas de pacientes e controles foi utilizado o teste t, uma vez que todos os parâmetros apresentavam distribuição normal. Parâmetros clínicos, laboratoriais e de dados densitométricos, no início do estudo, seis e 12 meses foram comparados utilizando ANOVA com correção de Huynh-Feldt quando necessário, e os testes de Bonferroni ou Friedman para multi-comparações. O teste de Kruskal-Wallis foi aplicado para comparar os níveis séricos da esclerostina aos 12 meses entre pacientes que apresentavam valores de PCR normais

(<5 mg/l), pacientes que apresentavam valores elevados de PCR (≥ 5 mg/l) e o grupo controle. A análise de regressão logística univariada foi realizada para avaliar a influência dos níveis séricos de esclerostina nos valores de PCR após 12 meses de tratamento. As diferenças entre as variáveis categóricas foram avaliadas pelo teste do qui-quadrado ou teste exato de Fisher. O teste de Spearman foi utilizado para a análise de correlação. Significância estatística foi estabelecida com valores de $P < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Dados Demográficos, Características da Doença e Densidade Mineral Óssea em Pacientes e Controles no Início do Estudo

No início do estudo, os pacientes e o grupo controle apresentavam uma média de idade (DP) de 35,7 (11,0) anos, 80% eram homens e 86,6% eram caucasianos. Os pacientes e os controles não apresentaram diferenças de peso [72,6 (13,6) *versus* 75,8 (10,3) kg, $P=0,313$], altura [1,68 (0,09) *versus* 1,71 (0,06) cm, $P=0,150$] e IMC [25,7 (4,6) *versus* 25,8 (2,9) kg/m², $P=0,909$]. A duração média da doença era de 11,9 (9,3) anos. Um terço (33,3%) dos pacientes apresentava apenas uma comprometimento axial e 66,6% dos pacientes apresentavam comprometimento axial e periférico, com sinovite ativa no início do estudo. Na avaliação inicial, foi observada uma alta atividade da doença [BASDAI de 5,11 (2,1), BASFI de 5,4 (2,7), BASMI de 4,06 (2,7)] e um escore de qualidade de vida (ASQoL) de 10,03 (5,2). Os níveis séricos de FSH [homens: 6,81 (7,79) *versus* 4,80 (2,81) UI/l, $P=0,241$; mulheres: 23,32 (29,72) *versus* 26,3 (48,43) UI/l, $P=0,900$], testosterona [6,86 (2,57) *versus* 6,72 (2,54) ng/ml, $P=0,841$], estradiol [112,74 (34,15) 145,96 *versus* (115,63) pg/ml, $P=0,515$] foram comparáveis entre pacientes com EA e controles. A DMO foi similar entre os pacientes e os controles ao nível da coluna lombar [1,032 (0,175) *versus* 1,082 (0,111) g/cm²,

P=0,201], colo do fêmur [0,864 (0,161) *versus* 0,888 (0,135) g/cm², P=0,547] e fêmur total [0,991 (0,165) *versus* 1,052 (0,111) g/cm², P=0,099].

4.2 Níveis Séricos de Esclerostina e da Ligação de Esclerostina nos Pacientes e Controles

No início do estudo, os pacientes apresentaram níveis significativamente mais baixos de esclerostina [60,5 (32,7) *versus* 96,7 (52,9) pmol/l, P=0,002] e níveis similares de ligação de esclerostina ao LRP6 [0,61 (0,13) *versus* 0,66 (0,27) DO₄₅₀, P=0,387] em relação aos controles saudáveis.

Ainda no início do estudo, os níveis de esclerostina eram comparáveis entre os pacientes com comprometimento periférico e os pacientes sem comprometimento periférico [69,9 (29,6) *versus* 55,7 (33,9) pmol/l, P=0,269], e entre os pacientes com mais de cinco anos de duração de doença e os pacientes com menos de cinco anos de duração de doença [48,13 (33,50) *versus* 65,76 (31,71) pmol/l, P=0,180].

4.3 Correlação Entre o Dano Radiográfico (mSASSS) e a Densidade Mineral Óssea da Coluna Lombar no Início do Estudo

As análise radiográfica dos pacientes com EA no início do estudo demonstrou uma média do mSASSS (DP) de 21,1 (17,8) unidades. No início do estudo, o mSASSS dos pacientes apresentou correlação com a DMO da coluna lombar (r=0,468, P<0,01) (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Correlação de Spearman entre o modified Stoke ankylosing spondylitis spinal score (mSASSS) e a densidade mineral óssea (DMO) da coluna lombar

4.4 Melhora Longitudinal dos Parâmetros Clínicos e Redução dos Parâmetros Inflamatórios após Tratamento com Anti-TNF α

Foi observada uma melhora clínica significativa em todas as variáveis clínicas: BASDAI, BASFI, BASMI e ASQoL ($P < 0,01$) comparando o início do estudo *versus* seis meses *versus* 12 meses após o tratamento (Tabela 1).

Concomitantemente, foi observado uma redução dos níveis de VHS, PCR e de MMP-3 ($P < 0,001$) após a terapia anti-TNF α comparando o início do estudo *versus* seis meses *versus* 12 meses (Tabela 1). Os parâmetros clínicos e inflamatórios não apresentaram diferença significativa após seis meses de tratamento (seis meses *versus* 12 meses, $P > 0,05$). Após 12 meses de tratamento, 10 (33,3%) pacientes ainda apresentavam níveis de PCR elevada (≥ 5 mg/l).

4.5 Aumento Longitudinal da Densidade Mineral Óssea da Coluna nos Pacientes com EA após o Tratamento com Anti-TNF α

Os pacientes com EA apresentaram um aumento significativo da DMO na coluna lombar ($P < 0,001$) comparando o início do estudo versus seis meses *versus* 12 meses após a terapia com anti-TNF α . Não foi observada nenhuma alteração significativa na DMO do colo de fêmur e do fêmur total (Tabela 1).

O grupo controle não apresentou diferença nos valores da DMO da coluna lombar entre o início do estudo e os 12 meses de seguimento [1,082 (0,111) *versus* 1,079 (0,117) g/cm², $P = 0,681$].

Tabela 1 - Mudanças na avaliação clínica, densidade mineral óssea e análise laboratorial após tratamento com anti-TNF α em pacientes com EA

	Basal	6 meses	12 meses	P
BASDAI	5,11 (2,1)	2,78 (2,4)	2,78 (2,5)	< 0,001
BASFI	5,40 (2,7)	2,96 (2,6)	2,85 (2,7)	< 0,001
BASMI	4,06 (2,7)	3,23 (2,6)	3,07 (2,7)	0,003
AsQoL	10,03 (5,2)	6,43 (6,4)	6,40 (6,05)	0,001
VHS, mm	23,75 (23,1)	8,16 (15,6)	7,3 (13,1)	< 0,001
Proteína c reativa, mg/dl	37,03 (47,9)	3,35 (4,1)	7,21 (20,1)	< 0,001
MMP-3, ng/ml	48,6 (42,5)	21,6 (22,5)	23,3 (30,8)	< 0,001
DMO coluna lombar, g/cm ²	1,032 (0,175)	1,049 (0,169)	1,065 (0,169)	< 0,001
DMO colo de fêmur, g/cm ²	0,864 (0,160)	0,865 (0,159)	0,864 (0,161)	0,051
DMO femur total, g/cm ²	0,990 (0,165)	0,986 (0,165)	0,999 (0,171)	0,981
Esclerostina, pmol/l	60,5 (32,7)	67,1 (31,9)	72,7 (32,3)	< 0,001
Ligação da esclerostina ao LRP6, DO₄₅₀	0,61 (0,13)	NA	0,60 (0,14)	0,472

Valores expressos em média (DP).

EA = espondilite anquilosante; BASDAI = Bath AS Disease Activity Index; BASFI = Bath AS Functional Index; BASMI = Bath AS Metrology Index; ASQoL = AS quality of life questionnaire; VHS = velocidade de hemossedimentação; MMP-3 = metaloproteinase 3 da matriz; DMO = densidade mineral óssea; LRP6 = receptor de lipoproteína de baixa densidade relacionado a proteína 6; DO = densidade óptica; NA = não analisado.

4.6 Avaliação Longitudinal dos Níveis Séricos de Esclerostina e da Ligação da Esclerostina após o Tratamento com Anti-TNF α

Os níveis séricos de esclerostina aumentaram progressivamente comparando o início do estudo versus 6 meses versus 12 meses após o tratamento biológico [60,5 (32,7) *versus* 67,1 (31,9) *versus* 72,7 (32,3) pmol/l, $P < 0,001$] (Tabela 1 e Gráfico 2) e a comparação entre seis e 12 meses evidenciou que estes níveis continuaram aumentando neste período ($P = 0,024$). Entretanto, aos 12 meses, os níveis séricos de esclerostina permaneceram significativamente mais baixos nos pacientes em quando comparados com os controles [72,7 (32,3) *versus* 96,70 (52,9) pmol/l, $P = 0,038$] (Gráfico 2). Não foi observada nenhuma alteração nos níveis da ligação da esclerostina ao LRP6 entre o início do estudo e os 12 meses de tratamento anti-TNF α [0,61 (0,13) *versus* 0,60 (0,14) DO₄₅₀, $P = 0,472$].

O grupo controle não apresentou diferença em relação aos níveis séricos de esclerostina entre o início do estudo e os 12 meses de seguimento [96,7 (52,9) *versus* 99,6 (63,5) pmol/l, $P = 0,381$].

Gráfico 2 - Comparações entre os níveis séricos de esclerostina em pacientes com espondilite anquilose (EA) no início do estudo, seis meses e 12 meses após terapia anti-TNF e controles saudáveis

4.7 Níveis Séricos de Esclerostina em Pacientes Com e Sem PCR Elevada aos 12 Meses de Tratamento

Foi realizado uma nova análise após 12 meses de tratamento entre os pacientes com inflamação persistente (PCR $\geq 5\text{mg/l}$) e os pacientes sem inflamação (PCR $<5\text{mg/l}$). Nesta análise, foi observado que os níveis séricos de esclerostina aos 12 meses apresentavam-se mais baixos nos 10 pacientes com PCR elevada em comparação com os outros 20 pacientes com níveis normais de PCR [50,8 (16,6) *versus* 83,6 (33,0) pmol/l, $P=0,021$]. Confirmando estes dados, foi encontrado uma correlação de Spearman negativa entre os valores de esclerostina e de PCR ($r=-0,57$, $P=0,001$), e entre os valores de esclerostina e VHS ($r=-0,59$, $P<0,001$). Além disso, após

12 meses de tratamento, os pacientes com PCR normal apresentavam valores comparáveis dos níveis de esclerostina em relação ao grupo controle [83,6 (33,0) *versus* 96,7 (52,9) pmol/l, $P=0,609$] e os pacientes com PCR persistentemente elevada apresentavam níveis significativamente mais baixos de esclerostina quando comparados ao grupo controle [50,8 (16,6) *versus* 96,7 (52,9) pmol/l, $P=0,004$] (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Comparações entre os níveis séricos de esclerostina de pacientes com espondilite anquilose (EA) com proteína C-reativa (PCR) <5mg/dl e PCR $\geq$ 5mg/dl após 12 meses de terapia anti-TNF e controles saudáveis

4.8 Níveis Basais de Esclerostina como Preditor de Inflamação Persistente

A análise univariada da associação entre os possíveis fatores prognósticos de resposta a terapia com anti-TNF α (idade, duração da doença, BASDAI, mSASSS, DMO coluna, níveis de VHS, PCR e MMP-3 e níveis séricos de esclerostina) e a inflamação persistente aos 12 meses de acordo com os valores de PCR (10 pacientes com PCR ≥ 5 mg/l versus 20 pacientes com PCR < 5 mg/l), demonstrou que apenas os níveis basais baixos de esclerostina foram significativamente associados com a inflamação persistente aos 12 meses de tratamento [41,4 (19,5) *versus* 70,0 (33,3) pmol/l, $P=0,023$] (Tabela 2). A análise de regressão logística univariada demonstrou que os pacientes com níveis séricos mais baixos de esclerostina, valores menores que 65 pg/ml (mediana entre a média dos níveis séricos esclerostina durante o período do estudo dos pacientes com EA), apresentaram um risco aumentado de PCR elevada após 12 meses de tratamento (*odds ratio* = 7,43, 95% CI 1,23-45,01, $P=0,020$).

Tabela 2 - Parâmetros basais considerados como preditores da resposta ao anti-TNF α e da inflamação persistente (PCR $\geq$ 5 mg / l) após 12 meses de tratamento

Parâmetros basais	PCR $\geq$ 5mg/l n=10	PCR < 5mg/l n=20	P
Idade, anos	31,6 (10,8)	37,7 (10,8)	0,157
Duração de doença, anos	10,6 (8,9)	12,5 (9,4)	0,598
mSASSS	16,5 (14,9)	23,4 (19,0)	0,329
DMO na coluna lombar, g/cm ²	1,020 (0,191)	1,040 (0,168)	0,771
BASDAI	4,89 (2,1)	5,56 (2,2)	0,415
PCR, mg/l	58,13 (71,1)	26,5 (27,4)	0,166
VHS, mm/h	38,5 (34,9)	16,7 (9,8)	0,176
MMP-3, ng/ml	70,2 (52,3)	37,8 (33,0)	0,090
Esclerostina, pmol/l	41,4 (19,5)	70,0 (33,3)	0.023

Valores expressos em média (DP).

EA = espondilite anquilosante; mSASSS = modified Stoke Ankylosing Spondylitis Spine Score; DMO = densidade mineral óssea; BASDAI = Bath AS Disease Activity Index; PCR = proteína C reativa; VHS = velocidade de hemossedimentação; MMP-3 = metaloproteinase 3 da matriz.

5 DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo a identificar que os baixos níveis séricos de esclerostina podem ser preditores de inflamação persistente em pacientes com EA sob terapia anti-TNF α .

Uma vantagem do desenho deste estudo foi a exclusão de doenças e de medicamentos que possam interferir no metabolismo ósseo como a insuficiência renal, o hiperparatireoidismo²⁷ e o uso bisfosfonatos²⁸ e que poderiam regular a expressão de esclerostina em osteócitos e, conseqüentemente, afetar os níveis séricos desta proteína. Além disso, o perfil hormonal normal dos pacientes com EA eliminou a interferência desta variável de confusão nos nossos resultados, uma vez que as concentrações de FSH no soro foram recentemente identificadas como um fator determinante dos níveis séricos de esclerostina²⁹.

A esclerostina é uma proteína expressa quase que exclusivamente no osso^{30,31}, especificamente nos osteócitos, e é um inibidor importante da atividade dos osteoblastos através da ligação com o LRP5/LRP6 inibindo a via canônica de sinalização Wnt^{4,32}. Esta via de sinalização Wnt é responsável pela formação óssea, estimulando a proliferação e diferenciação dos osteoblastos⁴. Nosso estudo confirmou e ampliou a observação anterior de um único estudo em que os níveis séricos de esclerostina eram mais baixos em pacientes com EA comparados aos controles saudáveis⁵.

Além disso, demonstramos que o bloqueio de TNF α induziu um aumento gradual dos níveis séricos deste inibidor da via de sinalização Wnt, entretanto estes níveis permaneceram mais baixos nos pacientes com EA após 12 meses de tratamento com terapia anti-TNF α do que os níveis dos indivíduos saudáveis. Esta descoberta sugere que a esclerostina pode ser a responsável pela persistente ploriferação óssea, com formação de sindesmófitos, demonstrada previamente em pacientes com EA sob a terapia anti-TNF α ¹⁷⁻²¹. Esta hipótese foi reforçada no nosso estudo pelo achado do aumento gradual da densidade óssea na coluna, a qual havia sido correlacionada com o dano radiográfico, mSASSS, no início do estudo. Novos estudos são necessários para determinar se a normalização de esclerostina estará associada à redução do dano radiográfico após longo prazo nos pacientes com EA sob terapia anti-TNF α .

A interrelação entre o TNF α e a esclerostina, descrita previamente, sugere que a regulação deste inibidor da via Wnt pode ser influenciada pela inflamação e/ou resolução deste processo nos pacientes com EA³³. Os níveis séricos persistentemente baixos de esclerostina restritos ao subgrupo de pacientes com inflamação contínua sugerem que a disfunção do osteócito que ocorre nos pacientes com EA⁵ não foi revertida neste subgrupo, apesar do bloqueio de TNF α . Além disso, os níveis iniciais de esclerostina parecem ser preditivos da resposta inflamatória a terapia anti-TNF α , evidenciado pelos pacientes com níveis basais mais altos de esclerostina, e que apresentaram uma rápida resposta inflamatória após este tratamento¹²⁻¹⁶.

Desta forma, especulamos que o mecanismo envolvido no desenvolvimento de sindesmófitos está provavelmente associado à inflamação persistente localizada na borda vertebral (osso cortical), associado a baixos níveis séricos de esclerostina, e um subsequente aumento da formação óssea neste local³⁴. Em contraste, a perda óssea no corpo vertebral previamente descrita em pacientes com EA e não observado no presente estudo, pode estar relacionada a ativação dos osteoclastos, envolvendo a via de ativação do ligante do receptor do fator nuclear kappa-B, secundária a inflamação no osso trabecular ou consequência da redução da mobilidade e da atividade física destes pacientes^{34,35}.

A ligação de esclerostina ao LPR6 foi similar nos pacientes e controles e não foi influenciada pelo tratamento anti-TNF α , indicando que os níveis baixos de esclerostina não foram influenciados pela ligação com o receptor. Estes achados foram diferentes do descrito para o Dkk-1, outra molécula inibitória da via Wnt, em que os valores diminuídos desta proteína em pacientes com EA eram decorrentes de uma menor ligação ao LPR6^{3,6,8}.

6 CONCLUSÕES

a) Os pacientes com EA ativa apresentaram níveis significativamente mais baixos de esclerostina comparado com controles saudáveis e valores semelhantes da ligação de esclerostina ao LRP6.

b) Os níveis de esclerostina aumentaram gradualmente após 12 meses de tratamento com anti-TNF α , mas permaneceram significativamente menores quando comparados ao grupo controle.

c) Os níveis persistentemente baixos de esclerostina foram associados com a inflamação contínua em pacientes com EA sob terapia anti-TNF α .

Novos estudos são necessários para determinar se os níveis baixos de esclerostina podem ser marcadores de inflamação subjacente à formação óssea em pacientes com EA durante a terapia anti-TNF α .

7 ANEXOS

Anexo A - Aprovação Cappesq do Projeto de Pesquisa # 0239/08

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Ao

Departamento de Clínica Médica

O Coordenador da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa-CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo **APROVOU ad-referendum** em 13.12.11 a execução do subprojeto intitulado: "**Avaliação dos parâmetros do metabolismo ósseo em pacientes com espondiloartrites pré e pós tratamento com anti-TNF**", que será tese de doutorado da aluna **CARLA GONÇALVES SCHAHIN SAAD**, tendo como orientadora o Profa. Dra. **Rosa Maria Rodrigues Pereira**.

O referido projeto faz parte do **Protocolo de Pesquisa nº 0239/08**, intitulado "**Avaliação dos parâmetros do metabolismo ósseo em pacientes com espondiloartrites pré e pós tratamento com anti-TNF**", aprovado por esta CAPPesq em 14.05.08.

CAPPesq, 04 de Novembro de 2011.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Anexo B - Termo de Consentimento

Anexo I

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**1. NOME:**DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO.....

BAIRRO: CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA**1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA : "AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DO METABOLISMO ÓSSEO EM PACIENTES COM ESPONDILOARTRITES PRÉ E PÓS TERAPIA ANTI-TNF"**

PESQUISADOR : Profa. Dra. Rosa Maria Rodrigues Pereira

CARGO/FUNÇÃO: Assistente da Reumatologia - FMUSP

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 45920

UNIDADE DO HCFMUSP: Clínica Médica - Disciplina de Reumatologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:RISCO MÍNIMO ☒RISCO MÉDIO ☐RISCO BAIXO ☐RISCO MAIOR ☐**4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 4 anos**

1 - Desenho do estudo e objetivo(s): Você está sendo convidado para participar de um protocolo de 4 anos de duração para estudar como a sua doença e várias substâncias de seu corpo se comportam antes, durante e após o tratamento com a(s) medicação(ões) que você vai receber no Centro Multidisciplinar de Dispensação de Medicação de Alto Custo (CEMDIMAC) do Hospital das Clínicas da FMUSP. Durante esses 4 anos, vamos ver se sua doença ficou controlada (ou seja, se você não sente mais dores nem inchaço nas juntas), se apareceram deformidades ou se suas juntas ficaram diferentes, se houve lesão das juntas ou do osso. Vamos estudar também se existiu(ram) alguma(s) característica(s) de sua doença ou de substâncias do seu sangue logo no começo do tratamento ou durante o tratamento, que mostrariam como seria a resposta da sua doença ao(s) tratamento(s) recebido(s), ou seja, se seria uma doença boa de tratar ou não com esses medicamentos. Com isso poderemos tratar melhor as pessoas que tenham a mesma doença e indicar com mais precisão para outras pessoas o tipo de remédio que você veio receber aqui. Com isso, poderemos impedir que a doença se torne mais grave em outras pessoas.

2 - Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros: Você será atendido de acordo com a rotina do CEMDIMAC do Hospital das Clínicas da FMUSP. O médico responsável pelo seu tratamento continuará sendo o médico que o encaminhou para receber o imunobiológico, ou seja, esse novo tratamento: ele checará seus exames, orientará seu tratamento e o acompanhará em caso de complicações. Você receberá esse novo tratamento, na veia, ou seja, por infusão, ou então, embaixo da pele, por uma pequena injeção, o que chamamos de aplicação por via subcutânea (igual a uma aplicação de insulina em paciente com diabetes). No CEMDIMAC, será realizada contagem de articulações dolorosas (doídas) e edemaciadas (inchadas) e serão feitos questionários sobre sua qualidade de vida e limitações pela doença.

3 - Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados - coleta de sangue por punção periférica da veia do antebraço; exames radiológicos: Serão colhidos exames de sangue antes da primeira infusão e a em períodos de 2 a 3 meses de intervalo. Esses exames necessitarão da coleta de um pouco de sangue (20mL - menos que uma xícara de café). Eles não serão utilizados para acompanhamento de efeitos colaterais individuais, ou seja, de efeitos desagradáveis ou problemas que possam surgir com o tratamento, e não serão vistos pelo médico do CEMDIMAC antes das infusões. Serão colhidos somente para fins de estudo. Parte deste sangue será guardado para estudo de marcadores, ou seja, testes para substâncias que poderão indicar que tipo de paciente responde melhor a esse tipo de remédio, que tipo de paciente tem mais risco de ter efeitos colaterais, ou testes para substâncias que poderão ajudar os médicos a entender melhor o funcionamento da sua doença no corpo em resposta a esses tratamentos. Seu sangue também será usado para estudar a resposta das células de seu corpo a diferentes agentes, incluindo organismos que poderão vir a causar doenças durante seu tratamento pelo efeito de diminuição da imunidade provocado pelo(s) remédio(s). Também vamos guardar parte de seu sangue (DNA) para estudar se existem marcadores da sua doença, da gravidade da sua doença ou da possibilidade de marcadores de resposta de sua doença à medicação. Ou seja, da mesma maneira que no DNA existem marcadores que mostram se uma criança é ou não filha de um casal, existem marcadores para doença, ou seja, que podem mostrar se a pessoa tem uma chance maior de ter uma doença, que tipo de doença é, se esta doença será mais grave ou se responderá aos remédios. Tudo que será estudado no seu sangue é em relação à sua doença, para entender melhor a doença e melhor tratá-la. No início do tratamento e anualmente, será preciso realizar radiografias de suas articulações, para ver a progressão da doença, bem como exames de densitometria óssea. Não há procedimentos, exames ou remédios experimentais, não se aplicará em você nada além do que foi proposto pelo seu médico, de acordo com as recomendações do(s) fabricante(s) do(s) remédio(s) do(s) qual(is) você fará uso. Lembre-se de que todos os exames que forem feitos neste centro são para fins de pesquisa. Os exames e o acompanhamento da sua doença individualmente serão feitos e checados pelo seu médico.

4 - Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3: Desconforto levíssimo relativo à necessidade coleta de sangue por punção venosa, ou seja, risco de formar um hematoma ou mancha roxa no lugar da picada para retirada de pequena quantidade de sangue para os exames. Entretanto, o sangue será colhido exatamente da mesma punção que será feita para que você possa receber a medicação se for medicação na veia. Se a sua medicação for de aplicação sob a pele, necessitará de uma punção venosa adicional antes do início do tratamento e a cada 2 a 3 meses. Risco referente à radiação das radiografias.

5 - Benefícios para o participante : Conhecimento do metabolismo ósseo do paciente em uso de terapia imunobiológica.

6 - Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar: não se aplica.

7 - Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Você terá acesso a qualquer momento a todas informações relacionadas ao estudo, que poderão também ser relatadas ao seu médico. Os médicos do CEMDIMAC e demais membros da equipe estarão disponíveis para responder a suas dúvidas. O principal investigador é o Dra. Rosa Maria Rodrigues Pereira, que pode ser encontrado no endereço Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Avenida Dr. Arnaldo , 455 3º Andar sala 3190 CEP 01246903 Telefone(s): 3061-7492/3061-7490. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) - Rua Ovídio Pires de Campos, 225 - 5º andar - tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 - E-mail: cappesq@hcnnet.usp.br.

8 - É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição: Sua participação neste estudo é voluntária. A qualquer momento seu consentimento poderá ser retirado. Não haverá qualquer prejuízo para o seu tratamento aqui no hospital. Você continuará a receber o tratamento, mesmo que não queira participar do protocolo de estudo. Se decidir sair do estudo não precisa declarar o motivo.

9 - Direito de confidencialidade - As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente: Todos os dados referentes a você e seu tratamento são confidenciais, somente o médico do CEMDIMAC e sua equipe sabem que você estará participando deste estudo. Se o estudo for publicado, você não será identificado pelo nome.

10 - Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores: não se aplica.

11 - Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12 - Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas. Os recursos do Hospital das Clínicas estarão disponíveis para qualquer assistência a sua saúde por problemas relacionados à pesquisa, devendo entrar em contato com o Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas. Entretanto, a responsabilidade de acompanhamento e tratamento dos efeitos colaterais inerentes ao uso da(s) medicação(ões) não observados durante o tempo em que você estiver no CEMDIMAC será do médico que prescreveu o(s) medicamento(s). O tratamento é indicado pelo médico assistente do paciente e autorizado

de acordo com as normas do SUS para dispensação de imunobiológicos. Não é experimental - rotina do Hospital.

13 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DO METABOLISMO ÓSSEO EM PACIENTES COM ESPONDILOARTRITES PRÉ E PÓS TERAPIA ANTI-TNF". Eu discuti com a Profa. Dra. Rosa Maria Rodrigues Pereira sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concorde voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

1. Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas. Você terá acesso a qualquer momento a todas informações relacionadas ao estudo, que poderão também ser relatadas ao seu médico. Os médicos do CEMDIMAC e demais membros da equipe estarão disponíveis para responder a suas dúvidas.
2. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência. Sua participação neste estudo é voluntária. A qualquer momento seu consentimento poderá ser retirado. Não haverá qualquer prejuízo para o seu tratamento aqui no hospital. Você continuará a receber o tratamento, mesmo que não queira participar do protocolo de estudo. Se decidir sair do estudo não precisa declarar o motivo.
3. Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade. Todos os dados referentes a você e seu tratamento são confidenciais, somente o médico do CEMDIMAC e sua equipe sabem que você estará participando deste estudo. Se o estudo for publicado, você não será identificado pelo nome.
4. Disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa. Os recursos do Hospital das Clínicas estarão disponíveis para qualquer assistência a sua saúde por problemas relacionados à pesquisa, devendo entrar em contato com o Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas. Entretanto, a responsabilidade de acompanhamento e tratamento dos efeitos colaterais inerentes ao uso da(s) medicação(ões) não observados durante o tempo em que você estiver no CEMDIMAC será do médico que prescreveu o(s) medicamento(s).
5. Viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa. Não se aplica. O tratamento é indicado pelo médico assistente do paciente e autorizado de acordo com as normas do SUS para dispensação de imunobiológicos. Não é experimental - rotina do Hospital.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Dra. Rosa Maria Rodrigues Pereira - 3061-7213 Dra. Eloisa Silva Dutra de Oliveira Bonfá - 3061-7492, 3061-7490, Dra. Carla Gonçalves S Saaad, Dra. Ana Cristina de Medeiros, Dr. Julio César Bertaccini- 3061-7200, 3069-6384, 3061-7492.

Em caso de questões quanto à ética da pesquisa ou dos seus direitos como paciente, favor dirigir-se à CAPPESQ. Tel:3069-6642

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

Não se aplica

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, _____ de _____ de 20____

Assinatura do sujeito da pesquisa
ou responsável legal

Assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

Anexo C - Carta de aceite para publicação na Revista *Arthritis Research & Therapy*

Subject: Re: Arthritis Research & Therapy Manuscript No: 1244019086788034 – Action required
From: ART Editorial (editorial@arthritis-research.com)
To: rosamariarp@yahoo.com;
Date: Friday, September 14, 2012 7:18 AM

Dear Prof Pereira,

Re: Arthritis Research & Therapy Manuscript No: 1244019086788034
“Low sclerostin levels: a predictive marker of persistent inflammation in ankylosing spondylitis during anti-TNF therapy?”

Carla GS Saad, Ana CM Ribeiro, Julio CB Moraes, Liliam Takayama, Celio R Gonçalves, Marcelo B Rodrigues, Ricardo M Oliveira, Clovis A Silva, Eloisa Bonfa and Rosa MR Pereira

Thank you for submitting your revised manuscript. I am pleased to inform you that your manuscript has been provisionally accepted by AR&T. However, before I can proceed with the acceptance, please address the following issues, as your current manuscript does not confirm to journal style.

Please complete and return a single copy of our competing interests form, which is available at <http://arthritis-research.com/authors/competinginterests>.

As corresponding author it is your responsibility to ensure that this form contains the competing interests of all authors; we do not require individual forms from each author. If applicable, please modify the competing interests statement in your manuscript so that it reflects the declaration on the form.

I look forward to receiving your completed form shortly.

Best wishes,

Hemali Parekh

Editorial Assistant– *Arthritis Research & Therapy*

BioMed Central
236 Gray's Inn Road
London, WC1X 8HB

T: +44 (0)20 3192 2000
F: +44 (0)20 3192 2011
E: hemali.parekh@biomedcentral.com

Anexo D - Artigo aceito para publicação na Revista Arthritis Research & Therapy

Low sclerostin levels: a predictive marker of persistent inflammation in ankylosing spondylitis during anti-TNF therapy?

Carla G S Saad¹ (goncalves-carla@uol.com.br)

Ana C M Ribeiro¹ (ana.demedeiros@gmail.com)

Julio C B Moraes¹ (juliocbmoraes@yahoo.com.br)

Liliam Takayama¹ (metosseo@lim17.fm.usp.br)

Celio R Goncalves¹ (goncalves.reuma@uol.com.br)

Marcelo B Rodrigues² (bordalo.m@gmail.com)

Ricardo M de Oliveira³ (ricardo@rdo.med.br)

Clovis A Silva¹ (clovis.silva@icr.usp.br)

Eloisa Bonfa¹ (eloisa.bonfa@hc.fm.usp.br)

Rosa M.R. Pereira¹ (rosamariarp@yahoo.com)

Division of Rheumatology¹, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Av Dr Arnaldo, 455 3º andar sala 3105, São Paulo, Brazil

Department of Radiology², Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Av Dr Enéas de Carvalho Aguiar 250, São Paulo, Brazil

RDO Diagnósticos Médicos³, Av Brasil 1150, São Paulo, Brazil

Corresponding author:

Rosa M.R. Pereira M.D., Ph.D.

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - Reumatologia

Av. Dr. Arnaldo, nº 455, 3º andar, sala 3105

São Paulo, SP, 05403-010, Brazil

Phone number: +5511-30617213

Fax: +5511-30617490. E-mail: rosamariarp@yahoo.com

Abstract

Introduction Sclerostin levels have been reported to be low in ankylosing spondylitis (AS), but there is no data regarding the possible role of this Wnt inhibitor during anti-TNF therapy. The present study longitudinally evaluated sclerostin levels, inflammatory markers and bone mineral density (BMD) in AS patients under anti-TNF therapy.

Methods Thirty active AS patients were assessed at baseline, 6 and 12 months after anti-TNF therapy regarding clinical parameters, inflammatory markers, BMD and baseline radiographic damage (mSASSS). Thirty age- and sex-matched healthy individuals comprised the control group. Patients' sclerostin levels, sclerostin binding LRP6 and BMD were evaluated at the same time points and compared to controls.

Results At baseline, AS patients had lower sclerostin levels [60.5 (32.7) vs. 96.7 (52.9) pmol/l, $P=0.002$] and comparable sclerostin binding to LRP6 ($P=0.387$) than controls. Improvement of BASDAI, BASFI, BASMI, ASQoL was observed at baseline vs. 6 vs. 12 months ($P<0.01$). Concomitantly, a gradual increase in spine BMD ($P<0.001$) and a positive correlation between baseline mSASSS and spine BMD was found ($r=0.468$, $P<0.01$). Inflammatory parameters reduction was observed comparing baseline vs. 6 vs. 12 months ($P<0.01$). Sclerostin levels progressively increased [60.5 (32.7) vs. 67.1 (31.9) vs. 72.7 (32.3) pmol/l, $P<0.001$]. At 12 months, the sclerostin levels remained significantly lower in patients compared to controls [72.7 (32.3) vs. 96.70 (52.85) pmol/l, $P=0.038$]. Moreover, sclerostin serum levels at 12 months were lower in the 10 patients with high CRP ($\geq 5\text{mg/l}$)

compared to the other 20 patients with normal CRP ($P=0.004$). Of note, these 10 patients with persistent inflammation also had lower sclerostin serum levels at baseline compared to the other patients ($P=0.023$). Univariate logistic regression analysis demonstrated that AS patients with lower sclerostin serum levels had an increased risk to have high CRP at 12 months (odds ratio=7.43, 95% CI 1.23-45.01, $P=0.020$) than those with higher sclerostin values.

Conclusion Persistent low sclerostin levels may underlie continuous inflammation in AS patients under anti-TNF therapy.

Keywords: ankylosing spondylitis, sclerostin, anti-TNF, inflammation, bone formation

Introduction

Ankylosing spondylitis (AS) is a chronic inflammatory rheumatic disease characterized by new bone growth that leads to syndesmophyte formation and subsequent vertebral ankylosis [1].

Several biomarkers, including inflammatory mediators and factors that reflect joint tissue turnover, have been evaluated in order to determine their relevance in AS clinical prognosis and therapy response [2]. In this disease, the search for biomarkers that regulate bone formation is essential to understand the underlying mechanism regulating bone growth and inflammatory process. Bone formation in AS has been recently associated with upregulation of wingless (Wnt) signaling, a pathway implicated in osteoblastogenesis [3]. Natural inhibitors of Wnt, such as sclerostin and Dkk-1, neutralize Wnt pathway activity and are critically important in normal bone homeostasis, particularly osteoblastic new bone formation [3-8]. Interestingly, tumor necrosis factor (TNF) α , an inflammatory mediator, is overexpressed in sacroiliac joints [9] and may also regulate the Wnt/ β catenin signaling pathway and the Wnt proteins [10-11].

Anti-TNF α agents are efficient therapeutic option for treating axial disease and peripheral arthritis in spondyloarthritis [12-16]. However, TNF-blockers do not appear to inhibit structural damage, bone formation or radiographic progression in AS patients [17-21] and a role for inflammation particularly at sites that develop bony proliferation has been suggested [5,21].

In addition, the recent observation that sclerostin is nearly absent in AS osteocytes [5] supports the hypothesis that natural inhibitors of the Wnt pathway are relevant players in the pathogenesis of AS [3,5-8]. However, there is no data regarding the relevance of this Wnt inhibitor in anti-TNF therapy response and inflammation. In this regard, combinations of biomarkers reflecting inflammatory and reparative process is critical to clarify the scope of anti- TNF α therapeutic benefit. We, therefore, assessed sclerostin serum levels, clinical parameters, inflammatory markers and bone mineral density (BMD) in active AS patients during anti-TNF therapy.

Materials and methods

Subjects

Thirty consecutive active AS patients followed at the Spondyloarthritis Outpatient Clinic and referred to the Infusion Center were evaluated at baseline, 6 and 12 months after the initiation of anti-TNF therapy at standard dose (19 Infliximab, 9 Adalimumab, 2 Etanercept). All of them fulfilled the modified New York classification criteria for definite AS [22]. Thirty sex- and age-matched healthy individuals comprised the control group.

Inclusion criteria were active disease patients [Bath AS Disease Activity Index (BASDAI) ≥ 4 and or high inflammatory parameters] refractory to nonsteroidal anti-inflammatory drugs and disease-modifying antirheumatic drugs who were referred for anti-TNF therapy. Exclusion criteria for both groups were other diseases that may have an effect on bone metabolism such as hyperthyroidism, malabsorption syndrome, kidney and liver failure, alcohol, prior or current use of bisphosphonates and current glucocorticoid use (> 5 mg/day) for patients and glucocorticoid use for control group. Baseline AS treatment with non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and/or disease-modifying antirheumatic drugs (sulfasalazine/methotrexate) was stable for at least 3 months and remained stable throughout the study.

Study design

Longitudinal sclerostin serum levels/binding, BMD, inflammatory markers and clinical outcomes were evaluated at baseline, 6 and 12 months after treatment. Radiographic analysis in AS patients was assessed at baseline.

Bone mineral density and sclerostin measurements were also analyzed at baseline and 12 months for the controls.

This study was approved by the Local Ethics Committee on Human Research at the University of São Paulo. All participants gave written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki.

Clinical Outcomes of AS

Clinical indices including BASDAI, Bath AS Functional Index (BASFI), Bath AS Metrology Index (BASMI) and AS quality of life questionnaire (ASQoL) were measured at baseline and at each follow-up visit, as recommended previously [23].

Laboratory assessment of inflammatory parameters

Inflammation was evaluated by erythrocyte sedimentation rate (ESR) in mm/h and C reactive protein (CRP) in mg/l. Serum matrix metalloproteinase 3 (MMP-3) levels were measured in ng/ml using a commercially available enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) (human total MMP-3 immunoassay ELISA kit, R&D Systems, Minneapolis, MN), according to the manufacturer's recommendations.

Laboratory assessment of hormones

Hormonal determinations were performed at study entry in AS patients and controls. Serum follicle stimulating hormone (FSH) were analysed in all patients and controls, total testosterone in men and estradiol in women. All assays were performed on Cobas e 411 Immunoassay Analyzer, Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Germany), according to the manufacturer's instruction. The intra-assay and interassay CVs were less than 6.0%.

Laboratory evaluation of the Wnt signaling pathway

Serum samples were obtained from all patients and controls after fasting and stored at -80°C until further analysis. Serum sclerostin levels were measured by a commercial sandwich ELISA KIT [Lot Y105, reference control: 90.5 (84 ± 25) pmol/l, Biomedica, Vienna, Austria] [24]. The intra-assay and interassay coefficient of variation (CVs) were 5% and 6%, respectively. AS patients' and controls' binding of sclerostin to the low-density lipoprotein receptor-related protein 6 (LRP6) was measured using a functional ELISA at baseline and 12 months. Briefly, microtiter plates were coated with 5 µg/ml of a chimeric human LRP6-Fc (recombinant human LRP6-Fc chimera; R&D Systems, Minneapolis, MN) prior to the addition of serum samples, and detection was performed using human anti-sclerostin biotinylated antibody (Biomedica, Vienna, Austria). The results were expressed in optical density (OD₄₅₀). The CVs intra e inter assay of this analysis was 5% and 3-6%, respectively.

Radiological Assessment

Radiographic images of the cervical and lumbar spine were evaluated in AS patients concomitantly by two trained readers (1 rheumatologist and 1 musculoskeletal radiologist) with agreement, using the modified Stoke Ankylosing Spondylitis Spine Score (mSASSS) [25] at baseline.

Bone Densitometry

Bone mineral density was measured in patients and healthy controls by dual X-ray absorptiometry (DXA) using HOLOGIC densitometry equipment (QDR 4500 densitometry) at the lumbar spine, femoral neck, total femur and whole

body at Bone Metabolism Laboratory of Rheumatology Division. All BMD measurements were performed by the same experienced technologist. Precision error for BMD measurements was determined based on standard International Society for Clinical Densitometry (ISCD) protocols [26]. We calculated the least significant change with 95% confidence to be 0.033 g/cm² at spine, 0.047 g/cm² at the femoral neck, 0.039 g/cm² at the total femur. BMD was expressed in g/cm².

Statistical analysis

Results are presented as mean and standard deviation (SD) for continuous variables and percentages for categorical variables. Data for continuous variables were compared by the t-test to evaluate differences between patients and controls, since all parameters had a normal distribution. Clinical, laboratory and densitometric data were compared at baseline, 6 and 12 months using ANOVA with Huynh-Feldt correction when it was applicable, and Bonferroni or Friedman-tests for multi-comparisons. Kruskal-Wallis was applied to compare sclerostin serum levels at 12 months among patients with normal CRP values (<5mg/l), high CRP values (≥ 5mg/l) and control group. Univariate logistic regression analysis was performed to evaluate the influence of sclerostin serum levels in CRP at 12 months. Differences between categorical variables were evaluated using the chi-square or Fisher exact test. Spearman's analysis was used for correlation analysis. Statistical significance was established at P <0.05.

Results

Baseline demographics, disease characteristics and bone mineral density in patients and controls

At baseline, AS patients and control group had a mean (SD) age of 35.7 (11.0) years, 80% were men and 86.6% were Caucasian. Patients and healthy controls had comparable weight [72.6 (13.6) vs. 75.8 (10.3) kg, $P=0.313$], height [1.68 (0.09) vs. 1.71 (0.06) cm, $P=0.150$] and BMI [25.7 (4.6) vs. 25.8 (2.9) kg/m², $P=0.909$]. The mean disease duration was 11.9 (9.3) years, one-third (33.3%) of patients had only axial involvement and 66.6% of patients had axial and peripheral involvement with active synovitis at study entry. Baseline clinical assessment revealed a high disease activity [BASDAI of 5.11 (2.1), BASFI of 5.4 (2.7), BASMI of 4.06 (2.7)] and a quality of life score (ASQoL) of 10.03 (5.2). AS patients and controls were comparable regarding serum FSH [men: 6.81 (7.79) vs. 4.80 (2.81) IU/L, $P=0.241$; women: 23.32 (29.72) vs. 26.3 (48.43) IU/L, $P=0.900$], testosterone [6.86 (2.57) vs. 6.72 (2.54) ng/mL, $P=0.841$], estradiol [112.74 (34.15) vs. 145.96 (115.63) pg/mL, $P=0.515$]. Patients and healthy subjects had comparable BMD at the lumbar spine [1.032 (0.175) vs. 1.082 (0.111) g/cm², $P=0.201$], femoral neck [0.864 (0.161) vs. 0.888 (0.135) g/cm², $P=0.547$] and total femur [0.991 (0.165) vs. 1.052 (0.111) g/cm², $P=0.099$].

Sclerostin serum levels and binding in patients and controls

At baseline, AS patients presented significantly lower sclerostin levels [60.5 (32.7) vs. 96.7 (52.9) pmol/l, $P=0.002$] and similar sclerostin binding to LRP6 [0.61 (0.13) vs. 0.66 (0.27) OD₄₅₀, $P=0.387$] compared to healthy controls.

Also at baseline, no difference was observed in sclerostin levels between patients with peripheral involvement versus non-peripheral involvement [69.9 (29.6) vs. 55.7 (33.9) pmol/l, $P=0.269$], and patients with > 5 years of disease duration versus patients with < 5 years of disease duration [48.13 (33.50) vs. 65.76 (31.71) pmol/l, $P=0.180$].

Correlation between baseline radiographic damage (mSASSS) and lumbar spine bone mineral density

Radiographic analyses revealed a mean (SD) mSASSS of 21.1 (17.8) units at baseline. mSASSS at baseline correlated with BMD of the lumbar spine at baseline ($r=0.468$, $P<0.01$) (Figure 1).

Longitudinal improvement of clinical parameters and reduction of inflammatory parameters after anti-TNF treatment.

A significant clinical improvement was observed comparing baseline vs. 6 months vs. 12 months regarding the following clinical variables: BASDAI, BASFI, BASMI and AsQoL ($P<0.01$) (Table 1).

A concomitant reduction in ESR, CRP and MMP-3 levels ($P<0.001$) was observed after anti-TNF therapy comparing baseline vs. 6 months vs. 12 months (Table 1). No difference in these inflammatory parameters was found comparing 6 and 12 months ($P>0.05$). At 12 months 10 (33.3%) patients remained with high CRP (≥ 5 mg/l).

12 months-longitudinal increase of spine bone mineral density after anti-TNF treatment in AS patients.

A significant increase in lumbar spine BMD ($P<0.001$) was found from

baseline vs. 6 months vs. 12 months after anti-TNF therapy whereas no significance change was observed for femoral neck and total femur BMD (Table 1).

Regarding the control group, no difference was observed at lumbar spine BMD comparing baseline and 12 months [1.082(0.111) vs. 1.079(0.117) g/cm² $P=0.681$].

Longitudinal evaluation of sclerostin serum levels and binding after anti-TNF treatment

Serum levels of sclerostin gradually increased from baseline vs. 6 months vs. 12 months after biological treatment [60.5 (32.7) vs. 67.1 (31.9) vs. 72.7 (32.3) pmol/l, $P<0.001$] (Table 1 and Figure 2). These levels continued to increase between 6 to 12 months of anti-TNF therapy ($P=0.024$). However, at 12 months, sclerostin levels remained significantly lower in patients compared to controls [72.7 (32.3) vs. 96.70 (52.9) pmol/l, $P=0.038$] (Figure 2). No change was observed in sclerostin binding to LRP6 at baseline and after 12 months of anti-TNF treatment [0.61 (0.13) vs. 0.60 (0.14) OD₄₅₀, $P=0.472$].

In control group no difference in sclerostin serum levels was detected comparing baseline and 12 months [96.7 (52.9) vs. 99.6 (63.5) pmol/l, $P=0.38$]

Sclerostin levels in patients with and without persistent high CRP at 12 months

Further analysis comparing patients with persistent inflammation (CRP $\geq$ 5mg/l) and those without inflammation (CRP<5mg/l) at 12 months was performed. Sclerostin serum levels at 12 months were lower in the 10 patients with high CRP compared to the other 20 patients with normal levels [50.8 (16.6) vs. 83.6 (33.0) pmol/l, $P=0.021$]. Reinforced this finding a negative Spearman correlation between sclerostin and CRP ($r= -0.57$, $P=0.001$) and ESR ($r= -0.59$, $P<0.001$) was observed. Moreover, at 12 months, patients with normal CRP had comparable values of sclerostin levels to control group [83.6 (33.0) vs. 96.7 (52.9) pmol/l, $P=0.609$] while patients with persistent high CRP had significantly lower sclerostin levels than control group [50.8 (16.6) vs. 96.7 (52.9) pmol/l, $P=0.004$] (Figure 3).

Sclerostin levels at baseline as predictor of persistent inflammation

The association between baseline predictors of anti-TNF response (age, disease duration, BASDAI, mSASSS, spine BMD, CRP level, ESR level, MMP-3 and sclerostin) and persistent inflammation at 12 months (10 patients with CRP $\geq$ 5mg/l vs. 20 patients with CRP<5mg/l) in univariate analysis revealed that only baseline low sclerostin levels were significantly associated with persistent inflammation at 12 months [41.4 (19.5) vs. 70.0 (33.3) pmol/l, $P=0.023$] (Table 2). Univariate logistic regression analysis demonstrated that AS patients with lower sclerostin serum levels (<65 pg/ml, AS median time-averaged of sclerostin serum levels) had an increased risk to have high CRP at 12 months (odds ratio=7.43, 95% CI 1.23-45.01, $P=0.020$) than those with higher sclerostin values.

Discussion

This is the first study to identify low sclerostin serum levels as a possible marker of persistent inflammation in AS patients under anti-TNF therapy.

An important advantage of the present study design was the exclusion of diseases and drugs that may interfere in bone metabolism since kidney failure, hyperparathyroidism [27] and bisphosphonates [28] could regulate sclerostin expression in osteocytes and consequently affect the sclerostin serum levels. Also, the normal hormonal status of AS patients excludes the interference of this confounding variable in our results since FSH serum levels were recently identified as stronger determinant of sclerostin serum levels [29].

Sclerostin is expressed almost exclusively in bone [30,31], specifically by osteocytes, and it is a key inhibitor of osteoblast activity by binding LRP5/LRP6 and inhibiting canonical Wnt signaling [4,32]. This Wnt signaling increases bone formation by stimulating the osteoblasts proliferation and differentiation [4]. We confirmed and extended previous observation of a single study that serum sclerostin is lower in AS patients compared to healthy controls [5].

In addition, we demonstrated that TNF blockage induces a gradual increase in the level of this inhibitor but these levels at 12 months remained lower than healthy individuals. This finding suggests that sclerostin may underlie the persistent syndesmophyte bone formation reported for this disease, despite anti-TNF therapy [17-21]. This hypothesis is reinforced by

the finding of a gradual increase in spine BMD which was correlated with baseline mSASSS. Further longitudinal studies are necessary to determine if sclerostin normalization is associated with reduced long-term radiographic progression.

Cross-talk between TNF and sclerostin appears to occur, therefore the regulation of this Wnt inhibitor factor could be influenced by inflammation and/or resolution of this process in AS patients [33]. The persistent low sclerostin serum levels restricted to the subgroup of patients with continuous high inflammatory parameters suggest that osteocyte dysfunction associated with AS disease [5] was not reverted in these patients in spite of TNF blockage. Moreover, baseline sclerostin levels seemed to be predictive of anti-TNF inflammatory response since AS patients with higher baseline sclerostin levels had a rapid inflammatory response as expected for this treatment [12-16] and a concomitantly gradual increase in this Wnt inhibitor.

We speculated therefore that the mechanism involved in the syndesmophyte development is probably associated to persistent inflammation localized in vertebral corner (cortical bone) with low sclerostin levels and a subsequent increase of bone formation on this site [34]. In contrast, the bone loss of vertebra body previously reported in this disease and not observed in the present study could be related to osteoclast activation, mainly due to receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) pathway possibly as a result of inflammation in the trabecular bone or due to the known reduced mobility and physical activity of these patients [34,35].

The sclerostin binding to LPR6 was comparable to controls and was not influenced by anti-TNF treatment, suggesting that the observed low level in patients is not due to hampered receptor binding. In contrast, concerning Dkk-1, another molecule that controls osteoblastogenesis, the defect of this inhibitor in AS patients seems to be associated to the reduced affinity to LPR6 [3,6,8].

In conclusion, our results demonstrated that persistent low sclerostin serum levels are associated with continuous inflammation in AS patients under anti-TNF therapy. Further studies are necessary to determine if this alteration may be a marker of inflammation underlying bone formation in AS patients during anti-TNF therapy.

List of abbreviations

AS = ankylosing spondylitis; Wnt =wingless; TNF =tumor necrosis factor; BMD = bone mineral density; NSAIDs = non-steroidal anti-inflammatory drugs; BASDAI = Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index; BASFI = Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index, BASMI = Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index; ASQoL = Ankylosing Spondylitis quality of life questionnaire; ESR = erythro sedimentation rate; CRP = C reactive protein; MMP-3 = matrix metalloproteinase 3; ELISA = enzyme-linked immunoabsorbent assay; FSH = serum follicle stimulating hormone; LRP6 = low-density lipoprotein receptor-related protein 6; OD₄₅₀ = optical density; mSASSS = modified Stoke Ankylosing Spondylitis Spine Score; DXA = dual X-ray absorptiometry; ISCD = International Society for Clinical Densitometry; SD = standard deviation; RANKL = receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand.

Competing Interest: None declared.

Authors' contributions:

CGSS: study concept and design, assist in subject recruitment, acquisition of subject and data, interpretation of data and drafting the manuscript.

ACMR: assist in subject recruitment, acquisition of data.

JCBM: assist in subject recruitment, acquisition of data.

LT: laboratorial and densitometry data.

CRG: assist in subject recruitment.

MBR: radiographic analysis.

RMO: laboratorial data.

CAS: study concept and design.

EB: study concept and design, interpretation of data and revising the manuscript.

RMRP: study concept and design, acquisition of subject and data, interpretation of data and drafting the manuscript.

All authors have read the latest version of the manuscript and gave final approval to this version.

Acknowledgments

This study was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP #2009/51897-5 to EB), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (#300248/2008-3 to CAS, #301411/2009-3 to EB and #300559/2009-7 to RMRP) Federico Foundation (to CGSS, CAS, EB and RMRP).

Table 1: Changes in clinical assessments, bone mineral density and laboratory analysis following anti-TNF treatment in AS patients.

	Baseline	6 months	12 months	<i>P</i>
BASDAI	5.11 (2.1)	2.78 (2.4)	2.78 (2.5)	<0.001
BASFI	5.40 (2.7)	2.96 (2.6)	2.85 (2.7)	<0.001
BASMI	4.06 (2.7)	3.23 (2.6)	3.07 (2.7)	0.003
AsQoL	10.03 (5.2)	6.43 (6.4)	6.40 (6.05)	0.001
ESR, mm	23.75 (23.1)	8.16 (15.6)	7.3 (13.1)	<0.001
C reactive protein, mg/dl	37.03 (47.9)	3.35 (4.1)	7.21 (20.1)	<0.001
MMP-3, ng/ml	48.6 (42.5)	21.6 (22.5)	23.3 (30.8)	< 0.001
BMD lumbar spine, g/cm ²	1.032 (0.175)	1.049 (0.169)	1.065 (0.169)	<0.001
BMD femoral neck, g/cm ²	0.864 (0.160)	0.865 (0.159)	0.864 (0.161)	0.051
BMD total femur, g/cm ²	0.990 (0.165)	0.986 (0.165)	0.999 (0.171)	0.981
Sclerostin, pmol/l	60.5 (32.7)	67.1 (31.9)	72.7 (32.3)	< 0.001
Sclerostin binding to LRP6, OD ₄₅₀	0.61 (0.13)	ND	0.60 (0.14)	0.472

Values are expressed as mean (SD).

AS = ankylosing spondylitis; BASDAI = Bath AS Disease Activity Index; BASFI = Bath AS Functional Index; BASMI = Bath AS Metrology Index; ASQoL = AS quality of life questionnaire; BMD = bone mineral density; ESR = erythrocyte sedimentation rate; MMP-3 = matrix metalloproteinase 3; LRP6 = low-density lipoprotein receptor-related protein 6; OD = optical density; ND = not done.

Table 2: AS baseline parameters considered as predictors of anti-TNF response and persistent inflammation (CRP $\geq$ 5mg/l) at 12 months.

Baseline parameters	CRP $\geq$ 5mg/l n=10	CRP < 5mg/l n=20	<i>P</i>
Age, years	31.6 (10.8)	37.7 (10.8)	0.157
Disease duration, years	10.6 (8.9)	12.5 (9.4)	0.598
mSASSS	16.5 (14.9)	23.35 (19.0)	0.329
BMD lumbar spine, g/cm ²	1.020 (0.191)	1.040 (0.168)	0.771
BASDAI	4.89 (2.1)	5.56 (2.2)	0.415
C reactive protein, mg/l	58.13 (71.1)	26.5 (27.4)	0.166
ESR, mm/h	38.5 (34.9)	16.7 (9.8)	0.176
MMP-3, ng/ml	70.2 (52.3)	37.8 (33.0)	0.090
Sclerostin, pmol/l	41.4 (19.5)	70.0 (33.3)	0.023

Values are expressed as mean (SD).

AS = ankylosing spondylitis; mSASSS = modified Stoke Ankylosing

Spondylitis Spine Score; BMD = bone mineral density; BASDAI = Bath AS

Disease Activity Index; ESR = erythrocyte sedimentation rate; MMP-3 =

matrix metalloproteinase 3.

References:

1. Sieper J, Braun J, Rudwaleit M, Boonen A, Zink A: **Ankylosing spondylitis: an overview.** *Ann Rheum Dis* 2002, **61 Suppl 3**:iii8-18.
2. Maksymowych WP: **Biomarkers in spondyloarthritis: from pathophysiology to disease assessment.** *Joint Bone Spine* 2012, **79**:4-6.
3. Diarra D, Stolina M, Polzer K, Zwerina J, Ominsky MS, Dwyer D, Korb A, Smolen J, Hoffmann M, Scheinecker C, van der Heide D, Landewe R, Lacey D, Richards WG, Schett G: **Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling.** *Nat Med* 2007, **13**:156-63.
4. Krishnan V, Bryant HU, Macdougald OA: **Regulation of bone mass by Wnt signaling.** *J Clin Invest* 2006, **116**:1202-9.
5. Appel H, Ruiz-Heiland G, Listing J, Zwerina J, Herrmann M, Mueller R, Haibel H, Baraliakos X, Hempfing A, Rudwaleit M, Sieper J, Schett G: **Altered skeletal expression of sclerostin and its link to radiographic progression in ankylosing spondylitis.** *Arthritis Rheum* 2009, **60**:3257-62.
6. Daoussis D, Liossis SN, Solomou EE, Tsanaktsi A, Bounia K, Karampetsou M, Yiannopoulos G, Andonopoulos AP: **Evidence that Dkk-1 is dysfunctional in ankylosing spondylitis.** *Arthritis Rheum* 2010, **62**:150-8.
7. Uderhardt S, Diarra D, Katzenbeisser J, David JP, Zwerina J, Richards W, Kronke G, Schett G: **Blockade of Dickkopf (DKK)-1 induces fusion of sacroiliac joints.** *Ann Rheum Dis* 2010, **69**:592-7

8. Heiland GR, Appel H, Poddubnyy D, Zwerina J, Hueber A, Haibel H, Baraliakos X, Listing J, Rudwaleit M, Schett G, Sieper J: **High level of functional dickkopf-1 predicts protection from syndesmophyte formation in patients with ankylosing spondylitis.** *Ann Rheum Dis* 2012, **71**:572-4.
9. François RJ, Neure L, Sieper J, Braun J: **Immunohistological examination of open sacroiliac biopsies of patients with ankylosing spondylitis: detection of tumour necrosis factor alpha in two patients with early disease and transforming growth factor beta in three more advanced cases.** *Ann Rheum Dis* 2006, **65**:713-20.
10. Vincent C, Findlay DM, Welldon KJ, Wijenayaka AR, Zheng TS, Haynes DR, Fazzalari NL, Evdokiou A, Atkins GJ: **Pro-inflammatory cytokines TNF-related weak inducer of apoptosis (TWEAK) and TNFalpha induce the mitogen-activated protein kinase (MAPK)-dependent expression of sclerostin in human osteoblasts.** *J Bone Miner Res* 2009, **24**:1434-49.
11. Qadir AS, Lee HL, Baek KH, Park HJ, Woo KM, Ryoo HM, Baek JH: **Msx2 is required for TNF- α -induced canonical Wnt signaling in 3T3-L1 preadipocytes.** *Biochem Biophys Res Commun* 2011, **408**:399-404.

12. Braun J, van den Berg R, Baraliakos X, Boehm H, Burgos-Vargas R, Collantes-Estevez E, Dagfinrud H, Dijkmans B, Dougados M, Emery P, Geher P, Hammoudeh M, Inman RD, Jongkees M, Khan MA, Kiltz U, Kvien T, Leirisalo-Repo M, Maksymowych WP, Olivieri I, Pavelka K, Sieper J, Stanislawska-Biernat E, Wendling D, Ozgocmen S, van Drogen C, van Royen B, van der Heijde D: **2010 update of the ASAS/EULAR recommendations for the management of ankylosing spondylitis.** *Ann Rheum Dis* 2011, **70**:896-904.
13. Braun J, Brandt J, Listing J, Zink A, Alten R, Golder W, Gromnica-Ihle E, Kellner H, Krause A, Schneider M, Sørensen H, Zeidler H, Thriene W, Sieper J: **Treatment of active ankylosing spondylitis with infliximab: a randomized controlled multicentre trial.** *Lancet* 2002, **359**:1187-93.
14. Braun J, Baraliakos X, Listing J, Fritz C, Alten R, Burmester G, Krause A, Schewe S, Schneider M, Sørensen H, Zeidler H, Sieper J: **Persistent clinical efficacy and safety of anti-tumour necrosis factor alpha therapy with infliximab in patients with ankylosing spondylitis over 5 years: evidence for different types of response.** *Ann Rheum Dis* 2008, **67**:340-5.
15. Davis JC Jr, Van Der Heijde D, Braun J, Dougados M, Cush J, Clegg DO, Kivitz A, Fleischmann R, Inman R, Tsuji W; Enbrel Ankylosing Spondylitis Study Group: **Recombinant human tumor necrosis factor receptor (etanercept) for treating ankylosing spondylitis: a randomized, controlled trial.** *Arthritis Rheum* 2003, **48**:3230-6.

16. van der Heijde D, Kivitz A, Schiff MH, Sieper J, Dijkmans BA, Braun J, Dougados M, Reveille JD, Wong RL, Kupper H, Davis JC Jr; ATLAS Study Group: **Efficacy and safety of adalimumab in patients with ankylosing spondylitis: results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial.** *Arthritis Rheum* 2006, **54**:2136-46.
17. Baraliakos X, Listing J, Rudwaleit M, Brandt J, Sieper J, Braun J: **Radiographic progression in patients with ankylosing spondylitis after 2 years of treatment with the tumour necrosis factor alpha antibody infliximab.** *Ann Rheum Dis* 2005, **64**:1462-6.
18. van der Heijde D, Landewé R, Einstein S, Ory P, Vosse D, Ni L, Lin SL, Tsuji W, Davis JC Jr: **Radiographic progression of ankylosing spondylitis after up to two years of treatment with etanercept.** *Arthritis Rheum* 2008, **58**:1324-31.
19. van der Heijde D, Landewé R, Baraliakos X, Houben H, van Tubergen A, Williamson P, Xu W, Baker D, Goldstein N, Braun J; Ankylosing Spondylitis Study for the Evaluation of Recombinant Infliximab Therapy Study Group: **Radiographic findings following two years of infliximab therapy in patients with ankylosing spondylitis.** *Arthritis Rheum* 2008, **58**:3063-70.

-
20. van der Heijde D, Salonen D, Weissman BN, Landewé R, Maksymowych WP, Kupper H, Ballal S, Gibson E, Wong R; Canadian (M03-606) study group; ATLAS study group: **Assessment of radiographic progression in the spines of patients with ankylosing spondylitis treated with adalimumab for up to 2 years.** *Arthritis Res Ther* 2009, **11**:R127.
 21. Braun J, Baraliakos X: **Imaging of axial spondyloarthritis including ankylosing spondylitis.** *Ann Rheum Dis* 2011, **70 Suppl 1**:i97-103.
 22. van der Linden S, Valkenburg HA, Cats A: **Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria.** *Arthritis Rheum* 1984, **27**:361-8.
 23. Sieper J, Rudwaleit M, Baraliakos X, Brandt J, Braun J, Burgos-Vargas R, Dougados M, Hermann KG, Landewé R, Maksymowych W, van der Heijde D: **The Assessment of SpondyloArthritis international Society (ASAS) handbook: a guide to assess spondyloarthritis.** *Ann Rheum Dis* 2009, **68 Suppl 2**:ii1-44.
 24. Mödder UI, Hoey KA, Amin S, McCready LK, Achenbach SJ, Riggs BL, Melton LJ 3rd, Khosla S: **Relation of age, gender, and bone mass to circulating sclerostin levels in women and men.** *J Bone Miner Res* 2011, **26**:373-9.
 25. Creemers MC, Franssen MJ, van't Hof MA, Gribnau FW, van de Putte LB, van Riel PL: **Assessment of outcome in ankylosing spondylitis: an extended radiographic scoring system.** *Ann Rheum Dis* 2005, **64**:127-9.

-
26. Lewiecki EM, Baim S, Binkley N, Bilezikian JP, Kendler DL, Hans DB, Silverman S; International Society for Clinical Densitometry: **Report of the International Society for Clinical Densitometry 2007 Adult Position Development Conference and Official Positions.** *South Med J* 2008, **10**:735-9.
 27. Lavi-Moshayoff V, Wasserman G, Meir T, Silver J, Naveh-Many T: **PTH increases FGF23 gene expression and mediates the high-FGF23 levels of experimental kidney failure: a bone parathyroid feedback loop.** *Am J Physiol Renal Physiol* 2010, **299**:F882-9.
 28. Polyzos SA, Anastasilakis AD, Bratengeier C, Woloszczuk W, Papatheodorou A, Terpos E: **Serum sclerostin levels positively correlate with lumbar spinal bone mineral density in postmenopausal women--the six-month effect of risedronate and teriparatide.** *Osteoporos Int* 2012, **23**:1171-6.
 29. Ardawi MS, Al-Kadi HA, Rouzi AA, Qari MH: **Determinants of serum sclerostin in healthy pre- and postmenopausal women.** *J Bone Miner Res* 2011, **26**:2812-22.
 30. Bonewald LF: **The amazing osteocyte.** *J Bone Miner Res* 2011, **26**:229-38.
 31. Paszty C, Turner CH, Robinson MK: **Sclerostin: a gem from the genome leads to bone-building antibodies.** *J Bone Miner Res* 2010, **25**:1897-904.

32. Li X, Zhang Y, Kang H, Liu W, Liu P, Zhang J, Harris SE, Wu D: **Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling.** *J Biol Chem* 2005, **280**:19883-7.
33. Heiland GR, Zwerina K, Baum W, Kireva T, Distler JH, Grisanti M, Asuncion F, Li X, Ominsky M, Richards W, Schett G, Zwerina J: **Neutralisation of Dkk-1 protects from systemic bone loss during inflammation and reduces sclerostin expression.** *Ann Rheum Dis* 2010, **69**:2152-9.
34. Schett G: **Structural bone changes in spondyloarthritis: mechanisms, clinical impact and therapeutic considerations.** *Am J Med Sci* 2011, **341**:269-71.
35. Appel H, Kuhne M, Spiekermann S, Ebhardt H, Grozdanovic Z, Köhler D, Dreimann M, Hempfing A, Rudwaleit M, Stein H, Metz-Stavenhagen P, Sieper J, Loddenkemper C: **Immunohistologic analysis of zygapophyseal joints in patients with ankylosing spondylitis.** *Arthritis Rheum* 2006, **54**:2845-51.

Figure legends

Figure 1: Spearman's correlation between modified Stoke ankylosing spondylitis spinal score (mSASSS) and lumbar spine bone mineral density(BMD)

Figure 2: Comparisons between sclerostin serum levels in ankylosis spondylitis (AS) patients at baseline, 6 months and 12 months after anti-TNF therapy and healthy controls

Figure 3: Comparisons between sclerostin serum levels in ankylosis spondylitis (AS) patients with C-reactive protein (CRP) < 5mg/dl and CRP ≥ 5mg/dl 12 months after anti-TNF therapy and healthy subjects

8 REFERÊNCIAS

1. Sieper J, Braun J, Rudwaleit M, Boonen A, Zink A. Ankylosing spondylitis: an overview. *Ann Rheum Dis*. 2002; 61 Suppl 3:iii8-18.
2. Maksymowych WP. Biomarkers in spondyloarthritis: from pathophysiology to disease assessment. *Joint Bone Spine*. 2012; 79:4-6.
3. Diarra D, Stolina M, Polzer K, Zwerina J, Ominsky MS, Dwyer D, Korb A, Smolen J, Hoffmann M, Scheinecker C, van der Heide D, Landewe R, Lacey D, Richards WG, Schett G. Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat Med*. 2007; 13:156-63.
4. Krishnan V, Bryant HU, Macdougald OA. Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J Clin Invest*. 2006; 116:1202-9.
5. Appel H, Ruiz-Heiland G, Listing J, Zwerina J, Herrmann M, Mueller R, Haibel H, Baraliakos X, Hempfing A, Rudwaleit M, Sieper J, Schett G. Altered skeletal expression of sclerostin and its link to radiographic progression in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum*. 2009; 60:3257-62.

6. Daoussis D, Liossis SN, Solomou EE, Tsanaktsi A, Bounia K, Karampetsou M, Yiannopoulos G, Andonopoulos AP. Evidence that Dkk-1 is dysfunctional in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 2010; 62:150-8.
7. Uderhardt S, Diarra D, Katzenbeisser J, David JP, Zwerina J, Richards W, Kronke G, Schett G. Blockade of Dickkopf (DKK)-1 induces fusion of sacroiliac joints. *Ann Rheum Dis.* 2010; 69:592-7.
8. Heiland GR, Appel H, Poddubnyy D, Zwerina J, Hueber A, Haibel H, Baraliakos X, Listing J, Rudwaleit M, Schett G, Sieper J. High level of functional dickkopf-1 predicts protection from syndesmophyte formation in patients with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis.* 2012; 71:572-4.
9. François RJ, Neure L, Sieper J, Braun J. Immunohistological examination of open sacroiliac biopsies of patients with ankylosing spondylitis: detection of tumour necrosis factor alpha in two patients with early disease and transforming growth factor beta in three more advanced cases. *Ann Rheum Dis.* 2006; 65:713-20.
10. Vincent C, Findlay DM, Welldon KJ, Wijenayaka AR, Zheng TS, Haynes DR, Fazzalari NL, Evdokiou A, Atkins GJ. Pro-inflammatory cytokines TNF-related weak inducer of apoptosis (TWEAK) and TNFalpha induce the mitogen-activated protein kinase (MAPK)-dependent expression of sclerostin in human osteoblasts. *J Bone Miner Res.* 2009; 24:1434-49.

11. Qadir AS, Lee HL, Baek KH, Park HJ, Woo KM, Ryoo HM, Baek JH. Msx2 is required for TNF- α -induced canonical Wnt signaling in 3T3-L1 preadipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011; 408:399-404.
12. Braun J, van den Berg R, Baraliakos X, Boehm H, Burgos-Vargas R, Collantes-Estevez E, Dagfinrud H, Dijkmans B, Dougados M, Emery P, Geher P, Hammoudeh M, Inman RD, Jongkees M, Khan MA, Kiltz U, Kvien T, Leirisalo-Repo M, Maksymowych WP, Olivieri I, Pavelka K, Sieper J, Stanislawska-Biernat E, Wendling D, Ozgocmen S, van Drogen C, van Royen B, van der Heijde D. 2010 update of the ASAS/EULAR recommendations for the management of ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis*. 2011; 70:896-904.
13. Braun J, Brandt J, Listing J, Zink A, Alten R, Golder W, Gromnica-Ihle E, Kellner H, Krause A, Schneider M, Sørensen H, Zeidler H, Thriene W, Sieper J. Treatment of active ankylosing spondylitis with infliximab: a randomized controlled multicentre trial. *Lancet*. 2002; 359:1187-93.
14. Braun J, Baraliakos X, Listing J, Fritz C, Alten R, Burmester G, Krause A, Schewe S, Schneider M, Sørensen H, Zeidler H, Sieper J. Persistent clinical efficacy and safety of anti-tumour necrosis factor alpha therapy with infliximab in patients with ankylosing spondylitis over 5 years: evidence for different types of response. *Ann Rheum Dis*. 2008; 67:340-5.

15. Davis JC Jr, Van Der Heijde D, Braun J, Dougados M, Cush J, Clegg DO, Kivitz A, Fleischmann R, Inman R, Tsuji W; Enbrel Ankylosing Spondylitis Study Group. Recombinant human tumor necrosis factor receptor (etanercept) for treating ankylosing spondylitis: a randomized, controlled trial. *Arthritis Rheum.* 2003; 48:3230-6.
16. van der Heijde D, Kivitz A, Schiff MH, Sieper J, Dijkmans BA, Braun J, Dougados M, Reveille JD, Wong RL, Kupper H, Davis JC Jr; ATLAS Study Group. Efficacy and safety of adalimumab in patients with ankylosing spondylitis: results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum.* 2006; 54:2136-46.
17. Baraliakos X, Listing J, Rudwaleit M, Brandt J, Sieper J, Braun J. Radiographic progression in patients with ankylosing spondylitis after 2 years of treatment with the tumour necrosis factor alpha antibody infliximab. *Ann Rheum Dis.* 2005; 64:1462-6.
18. van der Heijde D, Landewé R, Einstein S, Ory P, Vosse D, Ni L, Lin SL, Tsuji W, Davis JC Jr. Radiographic progression of ankylosing spondylitis after up to two years of treatment with etanercept. *Arthritis Rheum.* 2008; 58:1324-31.
19. van der Heijde D, Landewé R, Baraliakos X, Houben H, van Tubergen A, Williamson P, Xu W, Baker D, Goldstein N, Braun J; Ankylosing Spondylitis Study for the Evaluation of Recombinant Infliximab Therapy Study Group. Radiographic findings following two years of infliximab therapy in patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 2008; 58:3063-70.

20. van der Heijde D, Salonen D, Weissman BN, Landewé R, Maksymowych WP, Kupper H, Ballal S, Gibson E, Wong R; Canadian (M03-606) study group; ATLAS study group. Assessment of radiographic progression in the spines of patients with ankylosing spondylitis treated with adalimumab for up to 2 years. *Arthritis Res Ther*. 2009; 11:R127.
21. Braun J, Baraliakos X. Imaging of axial spondyloarthritis including ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis*. 2011; 70 Suppl 1:i97-103.
22. van der Linden S, Valkenburg HA, Cats A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria. *Arthritis Rheum*. 1984; 27:361-8.
23. Sieper J, Rudwaleit M, Baraliakos X, Brandt J, Braun J, Burgos-Vargas R, Dougados M, Hermann KG, Landewé R, Maksymowych W, van der Heijde D. The Assessment of SpondyloArthritis international Society (ASAS) handbook: a guide to assess spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2009; 68 Suppl 2:ii1-44.
24. Mödder UI, Hoey KA, Amin S, McCready LK, Achenbach SJ, Riggs BL, Melton LJ 3rd, Khosla S. Relation of age, gender, and bone mass to circulating sclerostin levels in women and men. *J Bone Miner Res*. 2011; 26:373-9.

25. Creemers MC, Franssen MJ, van't Hof MA, Gribnau FW, van de Putte LB, van Riel PL. Assessment of outcome in ankylosing spondylitis: an extended radiographic scoring system. *Ann Rheum Dis*. 2005; 64:127-9.
26. Lewiecki EM, Baim S, Binkley N, Bilezikian JP, Kendler DL, Hans DB, Silverman S; International Society for Clinical Densitometry. Report of the International Society for Clinical Densitometry 2007 Adult Position Development Conference and Official Positions. *South Med J*. 2008; 10:735-9.
27. Lavi-Moshayoff V, Wasserman G, Meir T, Silver J, Naveh-Many T. PTH increases FGF23 gene expression and mediates the high-FGF23 levels of experimental kidney failure: a bone parathyroid feedback loop. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010; 299:F882-9.
28. Polyzos SA, Anastasilakis AD, Bratengeier C, Woloszczuk W, Papatheodorou A, Terpos E. Serum sclerostin levels positively correlate with lumbar spinal bone mineral density in postmenopausal women--the six-month effect of risedronate and teriparatide. *Osteoporos Int*. 2012; 23:1171-6.
29. Ardawi MS, Al-Kadi HA, Rouzi AA, Qari MH. Determinants of serum sclerostin in healthy pre- and postmenopausal women. *J Bone Miner Res*. 2011; 26:2812-22.
30. Bonewald LF. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res*. 2011; 26:229-38.

31. Paszty C, Turner CH, Robinson MK. Sclerostin: a gem from the genome leads to bone-building antibodies. *J Bone Miner Res.* 2010; 25:1897-904.
32. Li X, Zhang Y, Kang H, Liu W, Liu P, Zhang J, Harris SE, Wu D: Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *J Biol Chem.* 2005; 280:19883-7.
33. Heiland GR, Zwerina K, Baum W, Kireva T, Distler JH, Grisanti M, Asuncion F, Li X, Ominsky M, Richards W, Schett G, Zwerina J. Neutralisation of Dkk-1 protects from systemic bone loss during inflammation and reduces sclerostin expression. *Ann Rheum Dis.* 2010; 69:2152-9.
34. Schett G. Structural bone changes in spondyloarthritis: mechanisms, clinical impact and therapeutic considerations. *Am J Med Sci.* 2011; 341:269-71.
35. Appel H, Kuhne M, Spiekermann S, Ebhardt H, Grozdanovic Z, Köhler D, Dreimann M, Hempfing A, Rudwaleit M, Stein H, Metz-Stavenhagen P, Sieper J, Loddenkemper C. Immunohistologic analysis of zygapophyseal joints in patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 2006; 54:2845-51.