LUCIANA PARENTE COSTA SEGURO

**Baixo valor sérico de P1NP: preditor de perda de
massa óssea em mulheres na pré-menopausa com
Lúpus Eritematoso Sistêmico**

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

Programa de: Ciências Médicas

Área de Concentração: Processos Imunes e Infeciosos

Orientadora: Prof. Dra. Rosa Maria Rodrigues Pereira

**SÃO PAULO
2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Seguro, Luciana Parente Costa

Baixo valor sérico de PINP : preditor de perda de massa óssea em mulheres na pré-menopausa com Lúpus Eritematoso Sistêmico / Luciana Parente Costa Seguro. -- São Paulo, 2013.

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

Orientadora: Rosa Maria Rodrigues Pereira.

Descritores: 1.Lúpus eritematoso sistêmico 2.Osteoporose 3.Densidade óssea 4.Pré-menopausa 5.Marcadores biológicos 6.Colágeno tipo I

USP/FM/DBD-285/13

Dedico esta tese ao meu esposo Luis, meu seguro porto, companheiro, amigo e incentivador.

Aos meus pais, Mônica e Manoel, meus primeiros mestres, pelos ensinamentos e exemplos de vida, e pelo apoio e amor incondicionais.

À minha avó Maria (*in memoriam*), pelo carinho e dedicação, exemplo de força e determinação.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Rosa Pereira, pela dedicação e presença constantes, como mestre, conselheira, cuidadora e amiga.

À Profa. Dra. Eloísa Bonfá, pelo apoio e confiança, exemplo de liderança e determinação.

Aos meus colegas da Reumatologia, pelas trocas de experiência e ensinamentos e pela amizade.

Aos colegas do Ambulatório de Lúpus e da Enfermaria de Reumatologia, pelo apoio e carinho e pela dedicação no cuidado dos pacientes.

Aos colegas do Laboratório de Metabolismo Ósseo, em especial Valéria, Liliam e Alessandra, que me ajudaram na realização desta tese.

Ao meu irmão Guilherme, pelo amor e amizade, e pela disponibilidade sempre imediata como consultor de informática.

Aos pacientes, que tornaram possível este estudo.

“O essencial é invisível aos olhos”

Antoine de Saint-Exupéry

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão 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 Documentação; 2011.

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

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de tabelas e figuras

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	01
2	OBJETIVOS	05
3	REVISÃO DA LITERATURA	07
4	MÉTODOS	11
5	RESULTADOS	16
6	DISCUSSÃO	27
7	CONCLUSÕES	33
8	ANEXO	35
9	REFERÊNCIAS	37

Apêndices

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
GC	Glicocorticoide
OPIG	Osteoporose induzida por glicocorticoide
ISCD	Sociedade Internacional de Densitometria Óssea
MVS	Mínima Variação Significativa
DMO	Densidade mineral óssea
P1NP	Propeptídeo N-terminal do pro-colágeno tipo 1
CTX	Telopectídeo C-terminal do colágeno tipo 1
OPG	Osteoprotegerina
RANKL	Ligante do receptor ativador do fator nuclear κ B
SLICC	Índice de dano <i>Systemic Lupus International Collaborating Clinics/ American College of Rheumatology Damage Index</i>
SLEDAI	Índice de atividade <i>Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index</i>
25OHD	25-hidroxivitamina D
CV	Coeficiente de variação
PTH	Paratormônio
DXA	Absortimetria por dupla fonte de raio-X
VFA	Avaliação de Fratura Vertebral
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1 -	Estudos transversais prévios avaliando massa óssea em pacientes com LES na pré-menopausa	08
Tabela 2 -	Estudos longitudinais prévios avaliando massa óssea em pacientes com LES na pré-menopausa	10
Tabela 3 -	Dados demográficos, clínicos, laboratoriais e de tratamento durante o estudo	20
Tabela 4 -	Índice de dano SLICC, dose de GC cumulativa prévia e fatores de risco para osteoporose	21
Tabela 5 -	Densidade mineral óssea e frequência de fraturas vertebrais no início do estudo	22
Tabela 6 -	Parâmetros laboratoriais do metabolismo ósseo no início do estudo	23
Tabela 7 -	Modelos de regressão logística de perda de massa óssea, P1NP e doses de glicocorticoide (cumulativa, média e máxima) durante o estudo	24
Figura 1 -	Diferenças entre os grupos com relação a dose de glicocorticoide durante o estudo e nível sérico de P1NP no início do estudo	25
Figura 2 -	Análise de curva ROC dos níveis séricos de P1NP no início do estudo e perda de massa óssea	26

RESUMO

Seguro LPC. *Baixo valor sérico de P1NP: preditor de perda de massa óssea em mulheres na pré-menopausa com Lúpus Eritematoso Sistêmico* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

Objetivos: Determinar a incidência de perda de massa óssea em um ano em pacientes com lúpus na pré-menopausa e o valor preditor dos marcadores do metabolismo ósseo para essa complicação. **Métodos:** Sessenta e três pacientes foram avaliadas à entrada no estudo e após um ano de seguimento. Variações na densidade mineral óssea (DXA) acima da mínima variação significativa (MVS) foram consideradas significativas, como recomendado pela Sociedade Internacional de Densitometria Clínica (*International Society for Clinical Densitometry*). Os níveis séricos dos marcadores do metabolismo ósseo foram determinados no início do estudo: propeptídeo N-terminal do procolágeno tipo 1 (P1NP) e telopeptídeo C-terminal do colágeno tipo 1 (CTX) por eletroquimioluminescência; osteoprotegerina (OPG) e ligante do receptor ativador do fator nuclear κ B (RANKL) por ELISA. **Resultados:** 36,5% dos pacientes apresentaram perda de massa óssea e 17,5% ganho de massa óssea na coluna lombar e/ou fêmur. Os pacientes foram divididos em três grupos: perda de massa óssea (P), massa óssea estável (E) e ganho de massa óssea (G). Pacientes com P e E tomaram doses cumulativa, média e máxima de glicocorticoide semelhantes durante o estudo, mas pacientes com G receberam doses menores (G vs. P e G vs. E, $p < 0,05$). Os níveis séricos basais de P1NP foram diferentes nos três grupos (P: $36,95 \pm 23,37$ vs. E: $54,63 \pm 30,82$ vs. G: $84,09 \pm 43,85$ ng/ml, $p = 0,001$). Análises de múltiplas comparações demonstraram diferenças significativas nos níveis de P1NP entre P vs. E, $p = 0,031$; P vs. G, $p < 0,001$ e E vs. G, $p = 0,039$. Não houve diferença entre os grupos com relação aos níveis de CTX, OPG/RANKL, fatores de risco para osteoporose ou parâmetros relacionados à doença. Após análise multivariada, apenas níveis baixos de P1NP permaneceram como fator de risco independente para perda de massa óssea ($p < 0,013$). **Conclusão:** Este estudo fornece evidência original que níveis mais baixos de P1NP, o marcador de formação óssea mais específico, são preditores de perda de massa óssea em um ano em mulheres com lúpus na pré-menopausa.

Descritores: Lúpus eritematoso sistêmico; Osteoporose; Densidade óssea; Pré-menopausa; Marcadores biológicos; Colágeno tipo I.

SUMMARY

Seguro LPC. *Lower P1NP serum levels: a predictive marker of bone loss in premenopausal SLE patients* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

Objective: To determine the one-year incidence of bone loss in premenopausal lupus patients and the value of bone markers as predictors of this complication.

Methods: Sixty-three premenopausal SLE patients were evaluated at baseline and after one-year of follow-up. Bone mineral density changes (DXA) above the least significant change (LSC) were considered significant, as recommended by International Society for Clinical Densitometry. Serum levels of bone markers were determined at baseline: N-terminal propeptide of type 1 collagen (P1NP) and C-terminal telopeptide of type 1 collagen (CTX) by electrochemiluminescence; osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL) by ELISA. **Results:** 36.5% of patients presented bone loss and 17.5% bone gain at lumbar spine and/or femur. Patients were divided in three groups: bone mass loss (BL), no bone mass change (NC) and bone mass gain (BG). Patients with BL e NC took similar cumulative, mean and maximum GC doses during the study, but patients with BG took lower doses (BG vs. BL and BG vs. NC, $p < 0.05$). Baseline P1NP levels were different in the three groups (BL: 36.95 ± 23.37 vs. NC: 54.63 ± 30.82 vs. BG: 84.09 ± 43.85 ng/ml, $p = 0.001$). Further multiple comparison analysis demonstrated significant differences in P1NP between BL vs. NC, $p = 0.031$; BL vs. BG, $p < 0.001$ and NC vs. BG, $p = 0.039$. No difference was observed concerning the levels of CTX, OPG/RANKL, risk factors for osteoporosis or disease related parameters. After multivariate analysis only lower P1NP levels remained as an independent risk factor for bone loss ($p < 0.013$). **Conclusion:** This study provides original evidence that lower levels of P1NP, the most specific bone formation marker, are predictive of bone loss in the next year in premenopausal SLE patients.

Descriptors: Systemic lupus erythematosus; Osteoporosis; Bone density; Premenopause; Biologic markers; Type I collagen.

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) está associado a um alto risco de baixa massa óssea e fraturas devido a diversos fatores incluindo atividade de doença, estado hormonal, deficiência de vitamina D, disfunção renal e terapia com glicocorticoides (GC) (1-2). Os GC estão associados a perda óssea proeminente e a prevenção de osteoporose induzida por glicocorticoide (OPIG) com drogas antirreabsortivas ou anabólicas está indicada em pacientes de alto risco, como mulheres na pós-menopausa (3-5).

No entanto, terapia preventiva em mulheres na pré-menopausa é controversa devido aos riscos de eventos adversos fetais em caso de gestação e incertezas quanto à magnitude dos benefícios (6,7). Alguns estudos transversais mostram associação entre baixa massa óssea, LES e uso prévio de GC (2,8-23). Por outro lado, a maioria dos estudos longitudinais conclui que a perda de massa óssea é mínima ou não significativa em pacientes com LES na pré-menopausa (10, 15, 24-30).

A Sociedade Internacional de Densitometria Óssea (ISCD, *International Society for Bone Densitometry*) recomenda o uso da Mínima Variação Significativa (MVS) para a avaliação da perda óssea em ensaios clínicos e na prática clínica. A MVS representa a menor diferença entre medidas sucessivas de densidade mineral óssea (DMO) que pode ser considerada uma verdadeira variação em vez de apenas uma flutuação aleatória relacionada à variabilidade do procedimento devido a múltiplas causas incluindo erros do instrumento, variabilidade relacionada aos técnicos operadores e movimentação do paciente (31).

Os estudos prévios avaliaram pacientes como um grupo e não utilizaram a MVS, o que prejudica a interpretação dos achados (10, 15, 24-30). Não há

estudos avaliando a frequência de perda de massa óssea em mulheres com LES na pré-menopausa.

Os marcadores do metabolismo ósseo são produtos bioquímicos que refletem a atividade metabólica do osso e fornecem informações complementares à DMO na predição do risco de fraturas. Em mulheres na pós-menopausa com DMO baixa, níveis elevados de marcadores do metabolismo ósseo estão associados a risco de fratura adicional (32). Por outro lado, em crianças e mulheres jovens, valores baixos dos marcadores séricos ou urinários estão associados a DMO baixa (33,34). Além disso, estes marcadores ósseos têm sido recomendados para monitorização do tratamento de osteoporose em mulheres na pós-menopausa (35). Poucos estudos avaliaram estes marcadores em mulheres com OPIG na pré-menopausa. A avaliação do propeptídeo N-terminal do pro-colágeno tipo 1 (P1NP, *N-terminal propeptide of type 1 collagen*), um marcador de formação óssea, e do telopeptídeo C-terminal do colágeno tipo 1 (CTX, *C-terminal telopeptide of type 1 collagen*), um marcador de reabsorção óssea, pode ser ferramenta adicional na identificação de pacientes de alto risco que poderiam beneficiar-se com terapia preventiva (35).

Estudos recentes identificaram moléculas produzidas e secretadas por células ósseas ativas que exercem efeitos diretos no metabolismo ósseo. O ligante do receptor ativador do fator nuclear κB (RANKL, *receptor activator of nuclear factor κB ligand*) interage com o receptor RANK e estimula a reabsorção óssea. Essa interação é inibida pela osteoprotegerina (OPG) (36). Desta forma, o balanço entre RANKL e OPG é essencial ao controle do

remodelamento ósseo. Os estudos prévios destes marcadores em pacientes com LES não avaliaram a DMO (37,38).

2 OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi determinar prospectivamente a incidência de perda de massa óssea em mulheres com LES na pré-menopausa, no período de um ano, bem como a associação com fatores relacionados à doença e o valor preditivo dos marcadores ósseos P1NP, CTX, OPG e RANKL.

A associação entre baixa massa óssea, LES e uso prévio de GC em mulheres na pré-menopausa tem sido descrita em diversos estudos transversais (Tabela 1). No entanto, como já mencionado, tratamento preventivo de osteoporose neste subgrupo é controverso, tanto pelos potenciais riscos fetais em caso de gestação, quanto pelas incertezas na magnitude dos benefícios. Neste sentido, dados de estudos longitudinais são conflitantes e a maioria conclui que a perda de massa óssea é mínima ou não significativa em pacientes com LES na pré-menopausa (Tabela 2).

Tabela 1: Estudos transversais prévios avaliando massa óssea em pacientes com LES na pré-menopausa

Ref	N	Conclusões
8	36	Sem correlação entre DMO e as variáveis estudadas, incluindo tempo de uso e dose de GC, duração e atividade de doença.
9	46	Sem diferença entre pacientes com LES em uso de GC vs. não tratados. Osteopenia em 25% dos pacientes. Conclui que LES causa perda óssea, não relacionada à terapia com GC.
10	43 (15 de início recente)	Menor DMO nos pacientes em uso de prednisolona $\geq 7,5$ mg/dia quando comparados aos pacientes com início recente de doença e controles. 18% dos pacientes em uso de GC apresentavam OP. DMO inversamente associada com tempo de tratamento e dose cumulativa de GC.
11	47	Pacientes com LES apresentaram DMO menor que controles. Pacientes tratados com GC tinham menor DMO que pacientes nunca tratados com GC.
12	74	Pacientes com LES apresentaram DMO menor que controles. Sem correlação entre DMO e GC.
13	56	DMO inversamente associada a atividade de doença
14	55 prem (97 total)	Uso de GC mostrou forte associação inversa com DMO da coluna, e associação menor com DMO do colo de fêmur.
15	20 prem (36 total)	DMO diminuída na coluna e colo de fêmur. Associação fraca entre DMO de colo de fêmur e consumo de GC.

Ref: referência; DMO: densidade mineral óssea; GC: glicocorticoide; LES: lúpus eritematoso sistêmico; OP: osteoporose; Prem: pré-menopausa

Tabela 1 (continuação): Estudos transversais prévios avaliando massa óssea em pacientes com LES na pré-menopausa

Ref	N	Conclusões
16	52	Pacientes com LES apresentaram DMO menor que controles. Sem correlação entre DMO e duração/ atividade de doença ou terapia com prednisona (dose média, cumulativa ou duração do tratamento). DMO menor em pacientes sem uso de cálcio comparado a controles e a pacientes em uso de cálcio.
17	84	Pacientes com LES apresentaram DMO menor que controles. Baixa DMO associada a maior duração de doença, maior dose cumulativa de GC e maior índice de dano SLICC.
18	30	Alta incidência de osteopenia e OP em pacientes com LES na pré-menopausa. Níveis de osteocalcina mais baixos em pacientes com LES. Níveis de cálcio (corrigido para albumina) maiores e de fósforo menores nos pacientes com LES. Menor concentração de testosterona e maior de FSH nos pacientes com LES.
19	118	DMO menor em pacientes com LES na pré-menopausa em tratamento com GC comparado aos pacientes sem uso de GC.
20	60	28 (46,7%) pacientes apresentaram DMO normal, 28 (46,7%) osteopenia e 4 (6,6%) OP. Sem correlação entre DMO e ingestão de cálcio, duração do LES, GC cumulativo, duração do uso de GC, tabagismo, etilismo ou índice de atividade do LES.
21	31	DMO coluna lombar e fêmur total menor em pacientes com LES juvenil comparado a controles. Alta frequência de fraturas vertebrais (22,6%) em pacientes com LES. Associação entre DMO (coluna lombar e fêmur total) e massa magra. Sem associação com idade da menarca, índice de atividade, índice de dano ou GC.
22	98	Apenas 52% dos pacientes apresentaram DMO normal. Associação entre T-score na coluna lombar e dose cumulativa de GC. Associação entre T-score do fêmur e duração do uso de GC. Sem correlação entre DMO e atividade de doença, ingestão de cálcio ou atividade física.
23	84 prem (159 total)	28% dos pacientes apresentaram OP, 54% osteopenia e 29,6% baixa DMO para idade. Menor Z-score associado com índice de dano e GC cumulativo.
2	46 fem (57 total)	Deficiência de vitamina D associada a maior índice de atividade, menores níveis de C4 e menor DMO (coluna lombar e corpo total).

Ref: referência; DMO: densidade mineral óssea; GC: glicocorticoide; LES: lúpus eritematoso sistêmico; OP: osteoporose; SLICC: índice de dano *Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index*; FSH: hormônio folículo estimulante; Prem: pré-menopausa; Fem: sexo feminino

Tabela 2: Estudos longitudinais prévios avaliando massa óssea em pacientes com LES na pré-menopausa

Ref	N	Seguimento (meses)	Marcadores Bioquímicos Ósseos	Conclusões
10	21 long (43 total)	36,6 ± 12,7		Sem alteração significativa na DMO
24	56	18		Sem alteração significativa na DMO
25	25 long (74 total)	18		Sem diminuição significativa na DMO. Sem fraturas. Sem correlação com dose de GC, duração ou atividade de doença.
15	20 prem (36 total)	Até 24	CTX aumentado em quase todos os pacientes	Sem alteração significativa na DMO. Sem correlação com uso de GC.
26	32	38,4 (34,8-40,8)	CTX basal não preditor de perda óssea	Sem alteração significativa na DMO para o grupo como um todo. GC ≥7,5 mg/dia associado a perda de DMO na coluna lombar.
27	35	21 ± 11		Perda óssea na coluna lombar (-1,22%/ano). Perda óssea apenas em pacientes com dose de prednisolona média >7,5 mg/dia durante o estudo. Perda óssea mais importante se dose cumulativa prévia de GC ≤5g.
28	37 prem (48 total)	24		Perda óssea associada ao uso de GC.
29	106	48		Sem alteração significativa na DMO. Sem alteração significativa na DMO entre subgrupos tratados com dose diária de prednisolona ≤7,5 mg ou >7,5 mg.
30	92 prem (total 126)	80		Sem alteração significativa na DMO média, perda óssea marcadamente baixa. Associação entre GC ≥7,5 mg/dia e perda de massa óssea na coluna lombar. Associação entre uso de antimaláricos à entrada do estudo e perda óssea no fêmur. Associação entre menor nível de vitamina D basal e perda óssea.

Ref: referência; Long: seguimento longitudinal; DMO: densidade mineral óssea; GC: glicocorticoide; Prem: pré-menopausa; CTX: telopeptídeo C-terminal do colágeno tipo 1 (C-terminal telopeptide of type 1 collagen)

Sessenta e três pacientes do sexo feminino, na pré-menopausa, com diagnóstico de LES de acordo com os critérios do Colégio Americano de Reumatologia (39), foram selecionadas no Ambulatório de LES, do serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os critérios de exclusão foram depuração de creatinina <60mL/min, uso atual ou prévio de medicações com ação óssea e gestação no momento das avaliações. A pré-menopausa foi confirmada pela presença de ciclos menstruais regulares ou pelos níveis de gonadotrofinas. Características demográficas, fatores de risco para osteoporose e uso de medicações foram obtidos através de entrevista. A avaliação dos fatores de risco para osteoporose incluíram informações sobre: história pessoal e familiar de fraturas, tabagismo, etilismo (considerado significativo se ≥ 3 U/dia), ingestão de cálcio na dieta e atividade física regular (pelo menos 30 minutos, três vezes por semana). Dados adicionais, incluindo dose de GC, foram obtidos através de revisão de prontuário eletrônico que consistia em avaliação clínica e laboratorial extensa de todos os pacientes a cada 1 a 6 meses. Atividade de doença e dano foram avaliados através dos índices: *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index* (SLEDAI) (40) e *Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index* (SLICC/ACR) (41), respectivamente.

Avaliação Laboratorial

Níveis séricos de cálcio, fósforo, fosfatase alcalina e creatinina e calciúria de 24 horas foram determinados pelos métodos padrão. 25-

hidroxivitamina D (25OHD) foi determinada por radioimunoensaio (DiaSorin, Stillwater, MN, EUA) com limite inferior de detecção de 5 ng/mL. Os coeficientes de variação intra e interensaio (CV) em nosso laboratório foram 10,5% e 17,8%, respectivamente (2). As concentrações séricas de paratormônio intacto (PTH) foram medidas por ensaio imunoradiométrico (ELSA-PTH, CIS bio international, França), com valores de referência entre 11–65 pg/mL (2,42).

As amostras de soro para determinação de P1NP, CTX, OPG e RANKL solúvel foram coletadas no início do estudo sob condições de jejum e armazenadas a -80°C para medida posterior. P1NP e CTX foram analisados por um sistema automatizado de eletroquimioluminescência (E411, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha). Os CV para P1NP e CTX foram 2,2% e 2,5%, respectivamente. OPG e RANKL foram medidos por imunoensaio enzimático (ELISA; Biomedica, Vienna, Austria), de acordo com as instruções do fabricante (CV intraensaio 11,8% e 5,2%, CV interensaio 19,4% e 15,5%, respectivamente).

Anticorpos antinucleares foram detectados por imunofluorescência indireta (IFI) usando células HEp-2 como substrato. Anti-DNA dupla fita (anti-dsDNA) foi detectado por IFI usando *Crithidia luciliae* como substrato. Outros autoanticorpos relacionados ao lúpus foram determinados pelas técnicas padrão. As medidas séricas de complemento (C3 e C4) foram realizadas por nefelometria.

Densidade Mineral Óssea (DMO)

DMO foi medida no início do estudo e após um ano de seguimento por absorptiometria por dupla fonte de raio-X (DXA) usando equipamento de densitometria Hologic (Hologic Inc. Bedford, MA, EUA, modelo Discovery) na coluna lombar, fêmur total e colo de fêmur. Todas as medidas de DMO foram realizadas por um único técnico experiente. Vértex anatomicamente anormais foram excluídas da análise conforme as recomendações da ISCD. Os erros de precisão para medidas de DMO foram determinados baseados nos protocolos da ISCD (43). A MVS foi calculada com 95% de confiança: 0,030 g/cm² para coluna lombar, 0,038 g/cm² para fêmur total e 0,047 g/cm² para colo de fêmur. Variações na DMO acima da MVS foram consideradas perda de massa óssea (variação negativa) ou ganho de massa óssea (variação positiva). Baixa massa óssea para idade cronológica foi definida como Z-score $\leq$ - 2,0 (43).

Avaliação de Fratura Vertebral (VFA, *vertebral fracture assessment*) pela DXA

Imagens da coluna torácica e lombar foram obtidas pela DXA, usando o mesmo equipamento de densitometria Hologic, por um operador experiente. A identificação de fraturas vertebrais foi realizada por dois reumatologistas (LPCS, RMRP) com experiência nesta área e que treinaram de acordo com os protocolos de avaliação de fraturas vertebrais da ISCD (44). VFA foi classificada usando o método visual semiquantitativo (SQ) de Genant, no qual fratura leve (grau 1) é uma redução de 20–25% na altura vertebral (anterior, média e/ou posterior), moderada (grau 2) uma redução de 26–40% e grave (grau 3) uma redução de mais de 40% (44).

Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão ou porcentagem. Os dados do grupo no início do estudo e após um ano de seguimento foram comparados utilizando-se os testes t de Student e qui-quadrado.

Os pacientes foram divididos em três grupos (perda de massa óssea, massa óssea estável e ganho de massa óssea) e comparados usando-se os testes: análise de variância simples (one-way ANOVA) e Kruskal-Wallis para variáveis quantitativas e qui-quadrado para variáveis qualitativas. Diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste de múltiplas comparações de Dumm. Variáveis associadas com perda de massa óssea foram avaliadas com curva ROC. Modelos de regressão logística foram usados para analisar quais fatores estavam independentemente associados com perda de massa óssea. O teste de Hosmer e Lemeshow foi usado para avaliar a qualidade do ajuste no modelo de regressão logística. O programa usado foi SPSS para Windows, versão 20.0 (SPSS, Chicago, IL, EUA). Significância estatística foi definida como $p < 0,05$.

Aprovação pela Comissão de Ética

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq do Hospital das Clínicas (protocolo de pesquisa 0221/10) e todos os participantes leram, concordaram e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Dados do Grupo

Dados relacionados a características demográficas, parâmetros de atividade de doença, dose de GC e uso de imunossupressores durante o estudo estão apresentados na tabela 3. Índice de dano SLICC, dose cumulativa de GC prévia (total e no ano anterior ao estudo), DMO basal e fatores de risco para osteoporose estão apresentados na tabela 4. Os parâmetros laboratoriais do metabolismo ósseo estão apresentados na tabela 5.

Parâmetros de densidade mineral óssea e composição corporal para o grupo foram similares no início do estudo e após um ano de seguimento, sendo eles: DMO da coluna lombar ($0,965 \pm 0,11$ vs. $0,958 \pm 0,12$ g/cm², p=0,751), DMO do colo de fêmur ($0,805 \pm 0,12$ vs. $0,794 \pm 0,12$ g/cm², p=0,596), DMO do fêmur total ($0,918 \pm 0,11$ vs. $0,909 \pm 0,12$ g/cm², p=0,663), DMO do corpo total ($1,078 \pm 0,08$ vs. $1,076 \pm 0,09$ g/cm², p=0,925), conteúdo mineral ósseo ($2,09 \pm 0,28$ vs. $2,09 \pm 0,28$ kg, p=0,982), massa gorda ($23,31 \pm 8,79$ vs. $24,26 \pm 9,23$ kg, p=0,562), massa magra ($41,66 \pm 6,06$ vs. $42,51 \pm 6,37$ kg, p=0,452) e porcentagem de gordura corporal ($33,84 \pm 6,45$ vs. $34,36 \pm 6,54\%$, p=0,658). Não houve novas fraturas vertebrais durante o estudo.

Varição na Massa Óssea

Considerando a MVS, após um ano 36,5% dos pacientes apresentaram perda de massa óssea significativa e 17,5% apresentaram ganho de massa óssea significativo na coluna lombar e/ou fêmur. Na coluna lombar, a frequência de perda de massa óssea foi 20,6% e de ganho de massa óssea foi 14,3%. No fêmur total e/ou colo de fêmur, a frequência de perda de massa óssea foi 23,8% e de ganho de massa óssea foi 6,3%.

Comparações entre os grupos

Os pacientes foram divididos em três grupos: perda de massa óssea, massa óssea estável e ganho de massa óssea na coluna lombar e/ou fêmur. Os três grupos apresentaram idade, duração de doença, peso, altura e índice de massa corpórea (IMC) similares. Índice SLEDAI máximo, frequência de pacientes com doença ativa por órgão e complemento baixo durante o estudo estão apresentados na tabela 3. As doses de GC (cumulativa, média e máxima) durante o estudo foram diferentes entre os grupos (Tabela 3). Análises de múltiplas comparações mostraram que as doses de GC (cumulativa, média e máxima) foram semelhantes em pacientes com perda de massa óssea e com massa óssea estável, porém menores em pacientes com ganho de massa óssea (Figura 1a, 1b, 1c).

Índice de dano SLICC/ACR, dose de GC cumulativa prévia (total e no ano anterior ao estudo), fatores de risco para osteoporose e ingestão/suplementação de cálcio e vitamina D foram similares entre os grupos (Tabela 4). DMO basal, parâmetros da composição corporal e frequência de fraturas vertebrais prevalentes também foram comparáveis entre os grupos (Tabela 5).

Os parâmetros laboratoriais do metabolismo ósseo tradicionais foram similares entre os grupos. Os níveis séricos de P1NP no início do estudo foram diferentes entre os grupos, mas não houve diferença com relação aos níveis séricos basais de CTX, OPG ou RANKL (Tabela 6). Análises de múltiplas comparações mostraram que os níveis séricos de P1NP basal foram diferentes nos três grupos, com níveis mais baixos em pacientes que apresentaram perda de massa óssea e níveis mais elevados em pacientes com ganho de massa óssea (Figura 1d).

Após análise de regressão logística apenas o P1NP sérico permaneceu como fator de risco independente para perda de massa óssea em coluna lombar e/ou fêmur em mulheres com lúpus na pré-menopausa (Tabela 7). Análise de curva ROC mostrou que $P1NP \leq 38\text{ng/ml}$ é um preditor de perda de massa óssea com sensibilidade de 70,0% e especificidade de 60,9% (Figura 2). Oitenta e sete por cento dos pacientes com perda de massa óssea apresentaram P1NP basal abaixo da média do grupo (53,32ng/mL).

Tabela 3: Dados demográficos, clínicos, laboratoriais e de tratamento durante o estudo em pacientes com LES na pré-menopausa com perda de massa óssea vs. massa óssea estável vs. ganho de massa óssea na coluna lombar e/ou fêmur

	TOTAL (n=63)	Perda Massa Óssea (n=23)	Massa Óssea Estável (n=29)	Ganho Massa Óssea (n=11)	P
Idade, anos	31,10 ± 6,84	29,78 ± 6,27	32,21 ± 7,40	30,91 ± 6,53	0,452
Dur doença, anos	5,25 ± 3,75	4,78 ± 4,00	5,93 ± 3,83	4,45 ± 2,88	0,411
Peso, kg	66,87 ± 13,60	67,19 ± 16,11	66,47 ± 9,17	67,28 ± 18,40	0,977
Altura, m	1,60 ± 0,06	1,60 ± 0,07	1,60 ± 0,06	1,60 ± 0,07	0,993
IMC, kg/m ²	26,07 ± 5,05	26,09 ± 5,67	26,00 ± 3,69	26,20 ± 7,03	0,994
SLEDAI máximo	4,35 ± 5,13	4,22 ± 4,39	5,48 ± 6,08	1,64 ± 2,29	0,097
Ativ cutânea	16 (25,4)	6 (26,1)	9 (31,0)	1 (9,1)	0,306
Ativ renal	9 (14,3)	5 (21,7)	3 (10,3)	1 (9,1)	0,450
Ativ SNC	5 (7,9)	2 (8,7)	3 (10,3)	0	0,359
Serosite	1 (1,6)	0	0	1 (9,1)	0,168
Artrite	13 (20,6)	2 (8,7)	10 (34,5)	1 (9,1)	0,039*
Ativ hematológica	20 (31,7)	7 (30,4)	11 (37,9)	2 (18,2)	0,461
Anti-dsDNA positivo	10 (15,9)	5 (21,7)	5 (17,2)	0	0,112
Complemento baixo	22 (34,9)	11 (47,8)	9 (31,0)	2 (18,2)	0,190
Dose cum GC, g	5,27 ± 5,57	6,39 ± 5,16	5,96 ± 6,22	1,14 ± 1,66	0,003*
Dose med GC, mg	12,06 ± 12,86	14,61 ± 11,22	13,59 ± 14,82	2,67 ± 3,86	0,003*
Dose max GC, mg	22,82 ± 20,49	30,43 ± 21,72	21,81 ± 19,2	9,55 ± 14,22	0,015*
Uso de IS	52 (82,5)	19 (82,6)	24 (82,8)	9 (81,8)	0,998
Uso de HXCQ	49 (77,8)	19 (82,6)	23 (79,3)	7 (63,6)	0,727

Dados expressos como média ± desvio padrão ou número (porcentagem)

Dur: duração; IMC: índice de massa corpórea; SLEDAI: índice de atividade *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*; Ativ: atividade; SNC: sistema nervoso central; Cum: cumulativa; GC: glicocorticoide; Med: média; Max: máxima, IS: imunossupressor; HXCQ: hidroxicloroquina; *:significativo.

Tabela 4: Índice de dano SLICC/ACR, dose de GC cumulativa prévia e fatores de risco para osteoporose em pacientes com LES na pré-menopausa com perda de massa óssea vs. massa óssea estável vs. ganho de massa óssea na coluna lombar e/ou fêmur

	TOTAL (n=63)	Perda Massa Óssea (n=23)	Massa Óssea Estável (n=29)	Ganho Massa Óssea (n=11)	P
SLICC/ACR	0,70 ± 0,80	0,57 ± 0,84	0,76 ± 0,74	0,82 ± 0,87	0,441
GC cum P, g	22,34 ± 12,94	20,20 ± 12,06	24,34 ± 14,39	21,58 ± 10,76	0,631
GC cum aa, g	5,18 ± 5,01	5,49 ± 5,33	5,75 ± 5,27	3,06 ± 3,06	0,272
IMC ≤ 20 kg/m ²	4 (6,3)	1 (4,3)	2 (6,9)	1 (9,1)	0,856
Menarca, anos	12,95 ± 1,40	12,70 ± 1,61	13,28 ± 1,10	12,60 ± 1,58	0,229
HP fratura	8 (12,7)	2 (8,7)	4 (13,8)	2 (18,2)	0,665
HF fratura	5 (7,9)	3 (13,0)	2 (6,9)	0	0,302
Tabagismo	6 (9,5)	3 (13,0)	1 (3,4)	2 (18,2)	0,234
Atividade física	19 (30,2)	8 (34,8)	9 (31,0)	2 (18,2)	0,684
Ca D, mg/dia	428,50 ± 296,67	447,98 ± 291,02	412,24 ± 264,42	430,84 ± 412,51	0,913
Sup Ca, mg/dia	511,90 ± 467,55	554,35 ± 464,39	534,48 ± 461,58	363,64 ± 504,52	0,513
Sup VitD, UI/dia	531,75 ± 449,31	504,35 ± 399,41	589,66 ± 472,34	436,36 ± 504,52	0,595

Dados expressos como média ± desvio padrão ou número (porcentagem)

SLICC/ACR: índice de dano *Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index*; GC: glicocorticoide; Cum: cumulativo; P: prévio; aa: ano anterior; IMC: índice de massa corpórea; HP: história pessoal; HF: história familiar; Ca: cálcio; D: dieta; Sup: suplementação; VitD: vitamina D

Tabela 5: Densidade mineral óssea e frequência de fraturas vertebrais no início do estudo em pacientes com LES na pré-menopausa com perda de massa óssea vs. massa óssea estável vs. ganho de massa óssea na coluna lombar e/ou fêmur

	TOTAL (n=63)	Perda Massa Óssea (n=23)	Massa Óssea Estável (n=29)	Ganho Massa Óssea (n=11)	P
DMO col lombar, g/cm ²	0,965 ± 0,11	0,954 ± 0,11	0,977 ± 0,11	0,956 ± 0,14	0,754
DMO colo fêmur, g/cm ²	0,805 ± 0,12	0,796 ± 0,09	0,826 ± 0,13	0,766 ± 0,13	0,321
DMO fêmur total, g/cm ²	0,918 ± 0,11	0,909 ± 0,09	0,941 ± 0,12	0,875 ± 0,12	0,228
Baixa DMO col lombar	9 (14,3)	3 (13,0)	3 (10,3)	3 (27,3)	0,431
Baixa DMO fêmur	6 (9,5)	1 (4,4)	3 (10,3)	2 (18,2)	0,432
Baixa DMO algum sítio	15 (23,8)	4 (17,4)	6 (20,7)	5 (45,5)	0,204
Fraturas vertebrais	12 (19,0)	3 (13,0)	8 (27,6)	1 (9,1)	0,262

Dados expressos como média ± desvio padrão ou número (porcentagem)

DMO: densidade mineral óssea; Col: coluna

Tabela 6: Parâmetros laboratoriais do metabolismo ósseo no início do estudo em pacientes com LES na pré-menopausa com perda de massa óssea vs. massa óssea estável vs. ganho de massa óssea na coluna lombar e/ou fêmur

	TOTAL (n=63)	Perda Massa Óssea (n=23)	Massa Óssea Estável (n=29)	Ganho Massa Óssea (n=11)	P
Ca iônico, mg/dL	5,15 ± 0,20	5,15 ± 0,25	5,17 ± 0,14	5,10 ± 0,24	0,621
Ca U, mg/24h	91,68 ± 63,68	93,37 ± 69,08	82,42 ± 58,37	117,53 ± 67,16	0,447
Fósforo, mg/dl	3,80 ± 0,60	3,86 ± 0,60	3,75 ± 0,60	3,81 ± 0,62	0,120
Creatinina, mg/dl	0,74 ± 0,13	0,77 ± 0,13	0,73 ± 0,14	0,72 ± 0,10	0,421
Fosf Alc, UI/L	67,48 ± 24,71	59,35 ± 18,24	70,79 ± 27,49	75,73 ± 26,07	0,120
25OHD, ng/mL	28,74 ± 12,89	31,37 ± 14,76	26,53 ± 11,06	29,09 ± 13,37	0,410
PTH, pg/mL	40,14 ± 18,39	35,57 ± 18,22	42,14 ± 16,71	44,45 ± 22,49	0,210
P1NP, ng/mL	53,32 ± 34,66	36,95 ± 23,37	54,63 ± 30,82	84,09 ± 43,85	0,001*
CTX, ng/mL	0,39 ± 0,21	0,36 ± 0,16	0,36 ± 0,22	0,52 ± 0,22	0,069
OPG, pmol/L	5,16 ± 2,01	5,50 ± 2,56	4,81 ± 1,70	5,42 ± 1,42	0,454
RANKL, pmol/L	0,46 ± 0,57	0,48 ± 0,48	0,49 ± 0,71	0,32 ± 0,28	0,584

Dados expressos como média ± desvio padrão ou número (porcentagem)

Ca: cálcio; U: urinário; Fosf Alc: Fosfatase Alcalina; 25OHD: 25-hidroxivitamina D; PTH: paratormônio; P1NP: propeptídeo N-terminal do pro-colágeno tipo 1 (*N-terminal propeptide of type 1 collagen*); CTX: telopeptídeo C-terminal do colágeno tipo 1 (*C-terminal telopeptide of type 1 collagen*); OPG: osteoprotegerina; RANKL: ligante do receptor ativador do fator nuclear κ B (*receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand*); *:significativo.

Tabela 7: Modelos de regressão logística de perda de massa óssea, P1NP e doses de glicocorticoide (cumulativa, média e máxima) durante o estudo.

Variáveis	Modelo 1	Modelo 2	Modelo 3
P1NP			
OR (IC 95%)	1,03 (1,01-1,05)	1,03 (1,01-1,05)	1,03 (1,01-1,05)
Valor de <i>p</i>	0,012*	0,013*	0,025*
GC cumulativo			
OR (IC 95%)	1,00 (1,00-1,00)		
Valor de <i>p</i>	0,799		
GC médio			
OR (IC 95%)		1,0 (0,95-1,04)	
Valor de <i>p</i>		0,908	
GC máximo			
OR (IC 95%)			0,98 (0,95-1,01)
Valor de <i>p</i>			0,224

P1NP: propeptídeo N-terminal do pro-colágeno tipo 1 (*N-terminal propeptide of type 1 collagen*); GC: glicocorticoide; *:significativo

Figura 1. Diferenças entre os grupos com relação à dose de glicocorticoide durante o estudo e nível sérico de P1NP no início do estudo

Análises de múltiplas comparações mostraram que as doses de GC (cumulativa, média e máxima) foram semelhantes em pacientes com perda de massa óssea e com massa óssea estável, porém menores em pacientes com ganho de massa óssea (Figura 1a, 1b, 1c). Os níveis séricos de P1NP no início do estudo foram diferentes nos três grupos, com níveis mais baixos em pacientes que apresentaram perda de massa óssea e níveis mais elevados em pacientes com ganho de massa óssea (Figura 1d).

GC: glicocorticoide; Cum: dose cumulativa; Med: dose média; Max: dose máxima; P1NP: propeptídeo N-terminal do pro-colágeno tipo 1 (*N-terminal propeptide of type 1 collagen*); *:significativo

Figura 2. Análise de curva ROC dos níveis séricos de P1NP no início do estudo e perda de massa óssea

Níveis séricos de P1NP ≤ 38 ng/ml no início do estudo foram preditores de perda de massa óssea com sensibilidade de 70,0% e especificidade de 60,9%.

P1NP: propeptídeo N-terminal do pro-colágeno tipo 1 (*N-terminal propeptide of type 1 collagen*); AUC: área sob a curva

Este estudo fornece evidência original que nível sérico baixo de P1NP, um marcador de formação óssea, é preditor de perda de massa óssea em pacientes com LES na pré-menopausa. Também reforça que a frequência de perda de massa óssea é alta neste grupo de pacientes.

De forma interessante, nível mais baixo de P1NP na avaliação inicial foi um fator de risco independente e preditor de perda de massa óssea após um ano de seguimento. Além disso, uma tendência a níveis séricos mais baixos de CTX neste grupo de pacientes sugere que os pacientes que perderam massa óssea apresentavam metabolismo ósseo suprimido. O CTX foi estudado previamente em pacientes com LES, mas não foi preditor de perda de massa óssea nestes estudos (15,26). Não há estudos prévios avaliando P1NP em pacientes com LES.

Supressão de formação óssea pode ser resultado do uso de GC. GC reduz a osteoblastogênese por inibição da via de sinalização Wnt e aumento da expressão do receptor PPAR γ 2 (*peroxisome proliferator activated receptor γ 2*), e estimula a apoptose de osteoblastos e osteócitos por meio da ativação da caspase 3 (45). De fato, maior índice de dano, dose cumulativa de GC e duração de doença têm sido associados a baixa massa óssea em pacientes com LES (10, 17, 22, 23). No entanto, em nosso estudo essa supressão de metabolismo ósseo não parece ser explicada pelo uso prévio de GC ou por fatores relacionados à doença, uma vez que pacientes que perderam massa óssea apresentaram duração de doença, índice de dano e dose cumulativa de GC prévia ao estudo semelhantes aos pacientes que ganharam massa óssea.

A associação entre P1NP baixo e perda de massa óssea também foi recentemente descrita em pacientes infectados com HIV tratados com drogas

antirretrovirais. Neste estudo, níveis mais baixos de P1NP foram preditores de maior perda de massa óssea no quadril e coluna lombar (46). Uma possível explicação é que os níveis de P1NP podem refletir o número ou estado das unidades multicelulares básicas do osso e pacientes com níveis mais baixos de marcadores do metabolismo ósseo teriam menor número de unidades remodeladoras (47). Apoiando essa ideia, pacientes com níveis mais elevados de P1NP basal apresentaram maior variação na DMO da coluna lombar após tratamento com teriparatida (48).

P1NP é um dos marcadores ósseos com melhor desempenho na avaliação do metabolismo ósseo e o seu uso como marcador de formação óssea é recomendado pela Fundação Internacional de Osteoporose (IOF, *International Osteoporosis Foundation*) (32). O P1NP tem múltiplas vantagens práticas, incluindo baixa variabilidade diurna, baixa variabilidade intraindividual, boa precisão e estabilidade em temperatura ambiente. Seus níveis circulantes não são significativamente influenciados pela dieta e sua depuração não é afetada por disfunção renal. É de grande valor na monitorização da osteoporose pós-menopausa pela sua habilidade em acessar tanto terapias anabólicas quanto antirreabsortivas com >80% dos pacientes apresentando uma variação significativa em relação aos níveis basais (35). Além disso, os níveis séricos dos marcadores de formação correlacionam-se com índices histomorfométricos de formação óssea, calculados a partir de biopsias ósseas de crista ilíaca (49).

Além disso, diferenças em polimorfismos de genes envolvidos no metabolismo ósseo podem ter uma ação no remodelamento ósseo e influenciar os níveis séricos dos marcadores (50). Casos familiares de osteoporose e

doenças ósseas, incluindo mulheres na pré-menopausa, fornecem suporte para as teorias correntes de predisposição genética para transtornos ósseos (51).

Uma vantagem do presente estudo foi a avaliação da frequência de perda de massa óssea significativa em mulheres com LES na pré-menopausa usando a mínima variação significativa (MVS), de acordo com as recomendações da ISCD (43). A maioria dos estudos longitudinais prévios concluiu que a perda óssea é mínima ou não significativa neste subgrupo de pacientes (10, 15, 24-30; Tabela 2). Uma possível explicação para esse achado é a metodologia de avaliação da perda de massa óssea. Os estudos prévios usaram a DMO média do grupo na avaliação basal e após o período de seguimento. Da mesma forma, este estudo apresentou resultados semelhantes na DMO média de coluna lombar e fêmur na avaliação basal e após um ano de seguimento. No entanto, quando foi feita a avaliação individual prospectiva utilizando a MVS, mais de um terço dos pacientes apresentaram perda óssea significativa após um ano de seguimento.

No presente estudo, perda de massa óssea na coluna lombar e/ou fêmur esteve associada à dose de GC durante o estudo, seja cumulativa, média ou máxima. Este achado reforça o efeito deletério do GC mesmo em mulheres na pré-menopausa, como demonstrado em uma minoria dos estudos longitudinais, que associaram perda óssea na coluna lombar ao uso de prednisolona em dose média diária > 7,5 mg (26-28, 30; Tabela 2).

Desta forma, o achado de P1NP baixo em um paciente que vai precisar de dose alta de GC nos próximos meses pode ser uma indicação de tratamento preventivo com medicações com ação óssea em pacientes na pré-menopausa. Propomos o uso deste marcador de formação óssea como um instrumento

para identificar pacientes de alto risco para perda óssea, complementando as recomendações das diretrizes atuais (3-5).

O achado de níveis baixos de marcadores ósseos na avaliação inicial de mulheres na pré-menopausa que evoluíram para perda de massa óssea também estimula a discussão sobre o tratamento mais adequado no que se refere ao mecanismo de ação das drogas. Estudos prévios de tratamento de OPIG em pacientes com LES na pré-menopausa mostraram que os bisfosfonatos (etidronato, pamidronato e alendronato) previnem perda de massa óssea ou aumentam DMO (52-55). Resultados semelhantes são encontrados em mulheres na pré-menopausa submetidas a quimioterapia por câncer (56). O ácido zoledrônico aumentou DMO do fêmur total em mulheres na pré-menopausa quando comparado ao risedronato após 12 meses de tratamento (57). Teriparatida aumentou DMO de coluna e quadril e melhorou a microarquitetura trabecular e rigidez na crista ilíaca de mulheres na pré-menopausa com osteoporose idiopática (58) e aumentou significativamente a DMO de coluna lombar quando comparada a alendronato após 18 meses de tratamento (59).

Uma reflexão sobre os achados do presente estudo leva-nos a supor que o uso de tratamentos anabólicos seja mais interessante. No entanto, a teriparatida, o único agente anabólico disponível para uso em mulheres na pré-menopausa, não pode ser usada por mais de 24 meses. Além disso, não há estudos do seu uso em pacientes com LES na pré-menopausa. Estudos com novas medicações anabólicas apontam para um futuro promissor no tratamento da OPIG (60).

Mais estudos são necessários para definir o valor dos marcadores ósseos e outros fatores na predição de fraturas e avaliar a eficácia e a segurança de drogas com ação óssea em mulheres na pré-menopausa.

7 CONCLUSÕES

Nosso estudo demonstrou de forma inédita que o marcador de formação P1NP é um preditor independente de perda de massa óssea em mulheres com LES na pré-menopausa. Este achado contribui para o manejo clínico deste grupo de pacientes no que se refere a prevenção e tratamento de osteoporose.

Além disso, confirmamos que o GC tem efeito deletério mesmo em mulheres na pré-menopausa e que a frequência de perda de massa óssea é alta neste grupo de pacientes.

Anexo A - Aprovação da CAPPesq

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 28/04/2010, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0221/10**, intitulado: **"AVALIAÇÃO DOS FATORES DE RISCO DE PERDA DE MASSA ÓSSEA EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO"** apresentado pelo Departamento de **CLÍNICA MÉDICA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Profa. Dra. Rosa Maria Rodrigues Pereira**

Pesquisador (a) Executante: **Luciana Parente Costa**

CAPPesq, 29 de Abril de 2010

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão
de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa

1. Pereira RM, Carvalho JF, Canalis E. *Glucocorticoid-induced osteoporosis in rheumatic diseases*. Clinics (Sao Paulo) 2010; 65: 1197-205.
2. Casella CB, Seguro LP, Takayama L, Medeiros D, Bonfa E, Pereira RM. *Juvenile onset systemic lupus erythematosus: a possible role for vitamin D in disease status and bone health*. Lupus 2012; 21: 1335-42.
3. Pereira RM, Carvalho JF, Paula AP, Zerbini C, Domiciano DS, Gonçalves H, Danowski JS, Marques Neto JF, Mendonça LM, Bezerra MC, Terreri MT, Imamura M, Weingrill P, Plapler PG, Radominski S, Tourinho T, Szejnfeld VL, Andrada NC; Committee for Osteoporosis and Bone Metabolic Disorders of the Brazilian Society of Rheumatology; Brazilian Medical Association; Brazilian Association of Physical Medicine and Rehabilitation. *Guidelines for the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis*. Rev Bras Reumatol 2012; 52: 580-93.
4. Grossman JM, Gordon R, Ranganath VK, Deal C, Caplan L, Chen W, Curtis JR, Furst DE, McMahon M, Patkar NM, Volkmann E, Saag KG. *American College of Rheumatology 2010 recommendations for the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis*. Arthritis Care Res (Hoboken) 2010; 62: 1515-26.
5. Lekamwasam S, Adachi JD, Agnusdei D, Bilezikian J, Boonen S, Borgström F, Cooper C, Diez Perez A, Eastell R, Hofbauer LC, Kanis JA, Langdahl BL, Lesnyak O, Lorenc R, McCloskey E, Messina OD, Napoli N, Obermayer-Pietsch B, Ralston SH, Sambrook PN, Silverman S, Sosa M, Stepan J, Suppan G, Wahl DA, Compston JE; Joint IOF-ECTS GIO

- Guidelines Working Group. *A framework for the development of guidelines for the management of glucocorticoid-induced osteoporosis*. *Osteoporos Int* 2012; 23: 2257-76.
6. Franchimont N, Canalis E. *Management of glucocorticoid induced osteoporosis in premenopausal women with autoimmune disease*. *Autoimmun Rev* 2003; 2: 224-8.
 7. Levy S, Favez I, Taguchi N, Han JY, Aiello J, Matsui D, Moretti M, Koren G, Ito S. *Pregnancy outcome following in utero exposure to bisphosphonates*. *Bone* 2009; 44: 428-30.
 8. Dhillon VB, Davies MC, Hall ML, Round JM, Ell PJ, Jacobs HS, Snaith ML, Isenberg DA. *Assessment of the effect of oral corticosteroids on bone mineral density in systemic lupus erythematosus: a preliminary study with dual energy x ray absorptiometry*. *Ann Rheum Dis* 1990; 49: 624-6.
 9. Kalla AA, Fataar AB, Jessop SJ, Bewerunge L. *Loss of trabecular bone mineral density in systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Rheum* 1993; 36: 1726-34.
 10. Pons F, Peris P, Guañabens N, Font J, Huguet M, Espinosa G, Ingelmo M, Muñoz-Gomez J, Setoain J. *The effect of systemic lupus erythematosus and long-term steroid therapy on bone mass in premenopausal women*. *Br J Rheumatol* 1995; 34: 742-6.
 11. Houssiau FA, Lefebvre C, Depresseux G, Lambert M, Devogelaer JP, Nagant de Deuxchaisnes C. *Trabecular and cortical bone loss in systemic lupus erythematosus*. *Br J Rheumatol* 1996; 35: 244-7.

12. Formiga F, Moga I, Nolla JM, Pac M, Mitjavila F, Roig-Escofet D. *Loss of bone mineral density in premenopausal women with systemic lupus erythematosus*. Ann Rheum Dis 1995; 54: 274-6.
13. Chen CJ, Yen JH, Tsai WC, Lin MB, Hsu SC, Tsai JJ, Lin HC, Lu SN, Liu GC, Lin SF, Liu HW. *Decreased bone mineral density in premenopausal patients with systemic lupus erythematosus*. Kaohsiung J Med Sci 1996; 12: 567-72.
14. Kipen Y, Buchbinder R, Forbes A, Strauss B, Littlejohn G, Morand E. *Prevalence of reduced bone mineral density in systemic lupus erythematosus and the role of steroids*. J Rheumatol 1997; 24: 1922-9.
15. Hansen M, Halberg P, Kollerup G, Pedersen-Zbinden B, Hørslev-Petersen K, Hyldstrup L, Lorenzen I. *Bone metabolism in patients with systemic lupus erythematosus. Effect of disease activity and glucocorticoid treatment*. Scand J Rheumatol 1998; 27: 197-206.
16. Li EK, Tam LS, Young RP, Ko GT, Li M, Lau EM. *Loss of bone mineral density in Chinese pre-menopausal women with systemic lupus erythematosus treated with corticosteroids*. Br J Rheumatol 1998; 37: 405-10.
17. Sinigaglia L, Varenna M, Binelli L, Zucchi F, Ghiringhella D, Gallazzi M, Limonta M, Zeni S, Fantini F. *Determinants of bone mass in systemic lupus erythematosus: a cross sectional study on premenopausal women*. J Rheumatol 1999; 26: 1280-4.
18. Redlich K, Ziegler S, Kiener HP, Spitzauer S, Stohlawetz P, Bernecker P, Kainberger F, Grampp S, Kudlacek S, Woloszczuk W, Smolen JS, Pietschmann P. *Bone mineral density and biochemical parameters of*

- bone metabolism in female patients with systemic lupus erythematosus.* Ann Rheum Dis 2000; 59: 308-10.
19. Uaratanawong S, Deesomchoke U, Lertmaharit S, Uaratanawong S. *Bone mineral density in premenopausal women with systemic lupus erythematosus.* J Rheumatol 2003; 30: 2365-8.
20. Chong HC, Chee SS, Goh EM, Chow SK, Yeap SS. *Dietary calcium and bone mineral density in premenopausal women with systemic lupus erythematosus.* Clin Rheumatol 2007; 26: 182-5.
21. Regio P, Bonfá E, Takayama L, Pereira R. *The influence of lean mass in trabecular and cortical bone in juvenile onset systemic lupus erythematosus.* Lupus 2008; 17: 787-92.
22. Yeap SS, Fauzi AR, Kong NC, Halim AG, Soehardy Z, Rahimah S, Chow SK, Goh EM. *Influences on bone mineral density in Malaysian premenopausal systemic lupus erythematosus patients on corticosteroids.* Lupus 2009; 18: 178-81.
23. Souto MI, Coelho A, Guo C, Mendonça LM, Pinheiro MF, Papi JA, Farias ML. *The prevalence of low bone mineral density in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus and its relationship with the disease damage index and other associated factors.* J Clin Densitom 2012; 15: 320-7.
24. Kalla A, Bewerunge L, Swanelvelder S, Meyers OL, Fataar AB. *Lack of corticosteroid effect on trabecular bone density over 18 months in systemic lupus erythematosus.* Arthritis Rheum 1995; 38: S359.

25. Formiga F, Nolla J, Moga I, Roig-Escofet D. *Sequential study of bone mineral density in patients with systemic lupus erythematosus*. Ann Rheum Dis 1996; 55: 857.
26. Kipen Y, Briganti E, Strauss B, Will R, Littlejohn G, Morand E. *Three year follow up of bone mineral density change in premenopausal women with systemic lupus erythematosus*. J Rheumatol 1999; 26: 310-7.
27. Jardinet D, Lefebvre C, Depresseux G, Lambert M, Devogelaer JP, Houssiau FA. *Longitudinal analysis of bone mineral density in premenopausal female systemic lupus erythematosus patients: deleterious role of glucocorticoid therapy at the lumbar spine*. Rheumatology (Oxford) 2000; 39: 389-92.
28. Boyanov M, Robeva R, Popivanov P. *Bone mineral density changes in women with systemic lupus erythematosus*. Clin Rheumatol 2003; 22: 318-23.
29. Uaratanawong S, Deesomchok U, Hiransuttikul N, Uaratanawong S. *Four years follow-up of bone mineral density change in premenopausal women with systemic lupus erythematosus*. J Med Assoc Thai 2004; 87: 1374-9.
30. Jacobs J, Korswagen LA, Schilder AM, van Tuyl LH, Dijkmans BA, Lems WF, Voskuyl AE, Bultink IE. *Six-year follow-up study of bone mineral density in patients with systemic lupus erythematosus*. Osteoporos Int 2013; 24: 1827-33.
31. El Maghraoui A, Achemlal L, Bezza A. *Monitoring of dual-energy X-ray absorptiometry measurement in clinical practice*. J Clin Densitom 2006; 9: 281-6.

32. Vasikaran S, Eastell R, Bruyère O, Foldes AJ, Garnero P, Griesmacher A, McClung M, Morris HA, Silverman S, Trenti T, Wahl DA, Cooper C, Kanis JA; IOF-IFCC Bone Marker Standards Working Group. *Markers of bone turnover for the prediction of fracture risk and monitoring of osteoporosis treatment: a need for international reference standards.* Osteoporos Int 2011; 22: 391-420.
33. Pereira RM, Falco V, Corrente JE, Chahade WH, Yoshinari NH. *Abnormalities in the biochemical markers of bone turnover in children with juvenile chronic arthritis.* Clin Exp Rheumatol 1999; 17: 251-5.
34. Falcini F, Ermini M, Bagnoli F. *Bone turnover is reduced in children with juvenile rheumatoid arthritis.* J Endocrinol Invest 1998; 21: 31-6.
35. Brown JP, Albert C, Nassar BA, Adachi JD, Cole D, Davison KS, Dooley KC, Don-Wauchope A, Douville P, Hanley DA, Jamal SA, Josse R, Kaiser S, Krahn J, Krause R, Kremer R, Lepage R, Letendre E, Morin S, Ooi DS, Papaioannou A, Ste-Marie LG. *Bone turnover markers in the management of postmenopausal osteoporosis.* Clin Biochem 2009; 42: 929-42.
36. Bezerra MC, Carvalho JF, Prokopowitsch AS, Pereira RM. *RANK, RANKL and osteoprotegerin in arthritic bone loss.* Braz J Med Biol Res 2005; 38: 161-70.
37. Carmona-Fernandes D, Santos MJ, Perpétuo IP, Fonseca JE, Canhão H. *Soluble receptor activator of nuclear factor κ B ligand/osteoprotegerin ratio is increased in systemic lupus erythematosus patients.* Arthritis Res Ther 2011; 13: R175.

-
38. Long L, Liu Y, Wang S, Zhao Y, Guo J, Yu P, Li Z. *Dickkopf-1 as potential biomarker to evaluate bone erosion in systemic lupus erythematosus*. J Clin Immunol 2010; 30: 669-75.
 39. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N, Winchester RJ. *The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum 1982; 25: 1271-7.
 40. Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH. *Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE*. Arthritis Rheum 1992; 35: 630-40.
 41. Gladman D, Ginzler E, Goldsmith C, Fortin P, Liang M, Urowitz M, Bacon P, Bombardieri S, Hanly J, Hay E, Isenberg D, Jones J, Kalunian K, Maddison P, Nived O, Petri M, Richter M, Sanchez-Guerrero J, Snaith M, Sturfelt G, Symmons D, Zoma A. *The development and initial validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology damage index for systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum 1996; 39: 363-9.
 42. Lopes JB, Danilevicius CF, Takayama L, Caparbo VF, Menezes PR, Scazufca M, Kuroishi ME, Pereira RM. *Prevalence and risk factors of radiographic vertebral fracture in Brazilian community-dwelling elderly*. Osteoporos Int 2011; 22: 711-9.
 43. Lewiecki EM, Gordon CM, Baim S, Leonard MB, Bishop NJ, Bianchi ML, Kalkwarf HJ, Langman CB, Plotkin H, Rauch F, Zemel BS, Binkley N, Bilezikian JP, Kendler DL, Hans DB, Silverman S. *International Society*

- for Clinical Densitometry 2007 Adult and Pediatric Official Positions.* Bone 2008; 43: 1115-21.
44. Domiciano DS, Figueiredo CP, Lopes JB, Kuroishi ME, Takayama L, Caparbo VF, Fuller P, Menezes PF, Scazufca M, Bonfa E, Pereira RM. *Vertebral fracture assessment by dual X-ray absorptiometry: a valid tool to detect vertebral fractures in community-dwelling older adults in a population-based survey.* Arthritis Care Res (Hoboken). 2013; 65: 809-15.
45. Compston J. *Management of glucocorticoid-induced osteoporosis.* Nat Rev Rheumatol 2010; 6: 82-8.
46. Haskelberg H, Hoy JF, Amin J, Ebeling PR, Emery S, Carr A, STEAL Study Group. *Changes in bone turnover and bone loss in HIV-infected patients changing treatment to tenofovir-emtricitabine or abacavir-lamivudine.* PLoS One 2012; 7: e38377.
47. Parfitt AM. *Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone.* J Cell Biochem 1994; 55: 273–286.
48. Yamamoto T, Tsujimoto M, Hamaya E, Sowa H. *Assessing the effect of baseline status of serum bone turnover markers and vitamin D levels on efficacy of teriparatide 20 µg/day administered subcutaneously in Japanese patients with osteoporosis.* J Bone Miner Metab 2013; 31: 199–205.
49. Eriksen EF, Charles P, Melsen F, Mosekilde L, Risteli L, Risteli J. *Serum markers of type I collagen formation and degradation in metabolic bone*

- disease: correlation with bone histomorphometry. *J Bone Miner Res* 1993; 8: 127-32.
50. Kim JG, Kim JH, Kim JY, Ku SY, Jee BC, Suh CS, Kim SH, Choi YM. *Association between osteoprotegerin (OPG), receptor activator of nuclear factor-kappaB (RANK), and RANK ligand (RANKL) gene polymorphisms and circulating OPG, soluble RANKL levels, and bone mineral density in Korean postmenopausal women.* *Menopause* 2007; 14: 913-8.
51. Moreira Kulak CA, Schussheim DH, McMahon DJ, Kurland E, Silverberg SJ, Siris ES, Bilezikian JP, Shane E. *Osteoporosis and low bone mass in premenopausal and perimenopausal women.* *Endocr Pract* 2000; 6: 296-304.
52. Nakayamada S, Okada Y, Saito K, Tanaka Y. *Etidronate prevents high dose glucocorticoid induced bone loss in premenopausal individuals with systemic autoimmune diseases.* *J Rheumatol* 2004; 31: 163-6.
53. Nzeusseu Toukap A, Depresseux G, Devogelaer JP, Houssiau FA. *Oral pamidronate prevents high-dose glucocorticoid-induced lumbar spine bone loss in premenopausal connective tissue disease (mainly lupus) patients.* *Lupus* 2005; 14: 517-20.
54. Khan A. *Management of low bone mineral density in premenopausal women.* *J Obstet Gynaecol Can* 2005; 27: 345-9.
55. Okada Y, Nawata M, Nakayamada S, Saito K, Tanaka Y. *Alendronate protects premenopausal women from bone loss and fracture associated with high-dose glucocorticoid therapy.* *J Rheumatol* 2008; 35: 2249-54.

-
56. Hershman DL, McMahon DJ, Crew KD, Shao T, Cremers S, Brafman L, Awad D, Shane E. *Prevention of bone loss by zoledronic acid in premenopausal women undergoing adjuvant chemotherapy persist up to one year following discontinuing treatment.* J Clin Endocrinol Metab 2010; 95: 559-66.
 57. Roux C, Reid DM, Devogelaer JP, Saag K, Lau CS, Reginster JY, Papanastasiou P, Bucci-Rechtweg C, Su G, Sambrook PN. *Post hoc analysis of a single IV infusion of zoledronic acid versus daily oral risedronate on lumbar spine bone mineral density in different subgroups with glucocorticoid-induced osteoporosis.* Osteoporos Int 2012; 23: 1083-90.
 58. Cohen A, Stein EM, Recker RR, Lappe JM, Dempster DW, Zhou H, Cremers S, McMahon DJ, Nickolas TL, Müller R, Zwahlen A, Young P, Stubby J, Shane E. *Teriparatide for idiopathic osteoporosis in premenopausal women: a pilot study.* J Clin Endocrinol Metab 2013; 98: 1971-81.
 59. Langdahl BL, Marin F, Shane E, Dobnig H, Zanchetta JR, Maricic M, Krohn K, See K, Warner MR. *Teriparatide versus alendronate for treating glucocorticoid-induced osteoporosis: an analysis by gender and menopausal status.* Osteoporos Int 2009; 20: 2095-104.
 60. Baron R, Hesse E. *Update on bone anabolics in osteoporosis treatment: rationale, current status, and perspectives.* J Clin Endocrinol Metab 2012; 97: 311-25.

O presente estudo foi apresentado no 10º CONGRESSO INTERNACIONAL SOBRE LES – LUPUS 2013 (Buenos Aires, Argentina) e recebeu o prêmio de reconhecimento da *Liga Panamericana de Asociaciones de Reumatologia* (PANLAR):

Running Head: **Lower P1NP and Bone Loss in Premenopausal SLE**

Title: **Lower P1NP serum levels: a predictive marker of bone loss after one-year follow-up in premenopausal SLE patients**

Authors:

Luciana P C Seguro, MD¹

Caio B Casella, MD¹

Valeria F Caparbo, Biologist¹

Ricardo M Oliveira, MD²

Alessandra Bonfa, Biologist¹

Eloisa Bonfa, MD, PhD¹

Rosa MR Pereira, MD, PhD¹

¹Rheumatology Division, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Brazil

²RDO Diagnósticos Médicos, Av Brasil 1150, São Paulo, Brazil

Grants/ Financial Support:

Eloisa Bonfa: CNPq (grant 301411/2009-3) and Federico Foundation.

Rosa MR Pereira: CNPq (grant 300559/2009-7) and Federico Foundation.

Address for Correspondence:

Faculdade de Medicina USP – Reumatologia

Av. Dr. Arnaldo, 455 3º andar - sala 3131

São Paulo - SP – Brazil CEP: 01246-903

Telephone /Fax: 55 11 3061-7490

Email: rosamariarp@yahoo.com

Word count for the manuscript: 2.783

Abstract

Objective: To determine the one-year incidence of bone loss in premenopausal lupus patients and the value of bone markers as predictors of this complication.

Methods: Sixty-three premenopausal SLE patients were evaluated at baseline and after one-year of follow-up. Bone mineral density changes (DXA) above the least significant change (LSC) were considered significant, as recommended by International Society for Clinical Densitometry. Serum levels of bone markers were determined at baseline (P1NP and CTX by electrochemiluminescence; OPG and RANKL by ELISA).

Results: 36.5% of patients presented bone loss and 17.5% bone gain at lumbar spine and/or femur. Patients were divided in three groups: bone mass loss (BL), no bone mass change (NC) and bone mass gain (BG). Patients with BL e NC took similar cumulative, mean and maximum GC dose during the study, but patients with BG took lower doses ($p < 0.05$ vs. BL and vs. NC). Baseline P1NP levels were different in the three groups (BL: 36.95 ± 23.37 vs. NC: 54.63 ± 30.82 vs. BG: 84.09 ± 43.85 ng/ml, $p = 0.001$). Further multiple comparison analysis demonstrated significant differences in P1NP between BL vs. NC, $p = 0.031$; BL vs. BG, $p < 0.001$ and NC vs. BG, $p = 0.039$). No difference was observed concerning the levels of CTX, OPG/RANKL, risk factors for osteoporosis or disease related parameters. After multivariate analysis only lower P1NP levels remained as an independent risk factor for bone loss ($p < 0.013$).

Conclusion: This study provides original evidence that lower levels of P1NP, the most specific bone formation marker, are predictive of bone loss in the next year in premenopausal SLE patients.

Significance and Innovations

- This study provides original evidence that N-terminal propeptide of type 1 collagen (P1NP), the most specific bone formation marker, is a predictor parameter of bone loss in premenopausal SLE patients.
- This was the first study that assessed bone loss in SLE as recommended by International Society for Clinical Densitometry (ISCD), using the definition of the Least Significant Change (LSC) and the authors discuss the importance of using this parameter in individual evaluation of patients with bone loss risk.
- We demonstrated a high frequency of bone mineral loss in premenopausal SLE patients after one-year follow-up.

Introduction

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is associated with high risk of low bone mass and fractures due to several factors including disease activity, hormonal status, vitamin D deficiency, renal impairment and, of note, therapy with glucocorticoids (GC) (1,2). GC are associated with prominent bone loss and the prevention of glucocorticoid-induced osteoporosis (GIO) with anti-resorptive or anabolic drugs is indicated in high-risk patients like postmenopausal women (3-5).

However, preventive therapy in premenopausal women is controversial due to concerns about the risk of fetal adverse events in case of pregnancy and doubts on the magnitude of benefits (6,7). Cross-sectional studies in premenopausal women show an association among lower bone mass, SLE disease and previous GC use (2,8-14). Conversely, the majority of longitudinal studies conclude that bone loss is minimal or no significant in premenopausal SLE patients (13-20).

International Society for Bone Densitometry (ISCD) recommends the use of the Least Significant Change (LSC) for the evaluation of bone loss in clinical trials and in clinical practice. The LSC represents the smallest difference between successive measurements of bone mineral density (BMD) that can be considered a true change rather than a random fluctuation related to procedure variability due to multiple causes including device errors, technician variability and patients movements (21).

The previous studies evaluated patients as a group and did not take into account the LSC, which may hamper the interpretation of the findings (13-20).

There are no studies assessing the frequency of bone loss in premenopausal SLE patients.

Bone turnover markers are biochemical products that reflect the metabolic activity of bone and provide information that is complementary to BMD in predicting fracture risk. In postmenopausal women with low BMD, increased bone turnover markers are associated with additional fracture risk (22). On the other hand, in children and young women, low BMD is associated with low bone markers (23,24). Also these markers have been recommended for monitoring OP treatment in postmenopausal women (25). Few studies have assessed these markers in premenopausal women with GIO. The evaluation of N-terminal propeptide of type 1 collagen (P1NP), a formation marker, and C-terminal telopeptide of type 1 collagen (CTX), a resorption marker, could be an additional tool in the identification of high risk individuals who would best benefit from therapy (25).

Also, recent studies identified molecules produced and secreted by bone active cells that exert direct effects on bone metabolism. Receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL) interacts with RANK and stimulates bone resorption. This interaction is inhibited by osteoprotegerin (OPG) (26). Therefore, the balance between RANKL and OPG is critical for bone remodeling control. The previous studies of these markers in SLE patients did not evaluate bone mineral density (27,28).

The aim of this study was, therefore, to determine prospectively the one-year incidence of bone loss in premenopausal lupus patients, the association with disease related factors and the prediction value of bone markers P1NP, CTX, OPG and RANKL.

Patients and methods

Sixty-three premenopausal female patients who fulfilled American College of Rheumatology (ACR) criteria for diagnosis of SLE (29) were enrolled at Lupus Outpatient Clinic, University of São Paulo, Brazil. Exclusion criteria were creatinine clearance <60mL/min, current or ever use of bone active drugs and pregnancy at the moment of the evaluation. Premenopausal status was confirmed by the presence of menstrual cycles or premenopausal levels of gonadotropins. Demographic characteristics, risk factors for osteoporosis and medication use were assessed by patient interview. Risk factor for osteoporosis included: personal and parental history of fracture, current tobacco use, alcohol consumption (considered significant if ≥ 3 U/day), dietary calcium intake and regular physical activity (at least three times a week for 30 min). Additional data, including glucocorticoid dose, were obtained from review of an ongoing electronic database protocol that was carried out for all patients at 1- to 6-month intervals and consisted of an extensive clinical and laboratory evaluation. Disease activity and damage were assessed by Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI) (30) and Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index (SLICC) (31), respectively.

Laboratory evaluation

Serum levels of calcium, phosphorus, alkaline phosphatase and creatinine and 24-hour urinary level of calcium were determined by standard methods. 25-

hydroxyvitamin D (25OHD) was determined by a radioimmunoassay technique (DiaSorin, Stillwater, MN, USA) with a lower detection limit of 5 ng/mL. The intra- and inter-assay coefficients of variation (CV) in our laboratory were 10.5% and 17.8%, respectively (2). Intact parathyroid hormone (iPTH) serum concentrations were measured by immunoradiometric assay (ELSA-PTH, CIS bio international, France), with reference variations of 11–65 pg/mL (2,32).

Serum samples for determination of P1NP, CTX, OPG and soluble RANKL were collected at baseline under fasting conditions and stored at -80°C for later measurement. P1NP and CTX were analyzed by an automated Roche electrochemiluminescence system (E411, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). The CV for P1NP and CTX were 2.2% e 2.5%, respectively. OPG and RANKL were measured by enzyme immunoassay (ELISA; Biomedica, Vienna, Austria) according to the manufacturer's instructions (intra-assay CV 11.8% and 5.2%, inter-assay CV 19.4% and 15.5%, respectively).

Antinuclear antibodies were detected by indirect immunofluorescence (IIF) using HEp-2 cells as the substrate. Anti-double-stranded DNA (anti-dsDNA) was detected by IIF using *Crithidia luciliae*. Other lupus related autoantibodies were determined by standard techniques. Measurement of serum complement was performed (C3 and C4) by nephelometry.

Bone mineral density (BMD)

BMD was measured at baseline and after one year by dual X-ray absorptiometry (DXA) using Hologic densitometry equipment (Hologic Inc. Bedford, MA, USA, Discovery model) at lumbar spine, total femur and femoral neck. All BMD measurements were performed by the same experienced

technologist. Anatomically abnormal vertebrae were excluded from analysis according to International Society for Clinical Densitometry (ISCD) recommendations. Precision error for BMD measurements was determined based on standard ISCD protocols (33). We calculated the least significant change with 95% confidence to be 0.030 g/cm² for AP spine, 0.038 g/cm² for total femur and 0.047 g/cm² for femoral neck. BMD changes above the least significant change were considered bone mass loss (negative variation) and bone mass gain (positive variation). Low BMD for chronological age was defined as a Z-score $\leq$ - 2.0 (33).

Vertebral fracture assessment (VFA) by DXA

Images of the thoracic and lumbar spine were obtained by DXA using the same Hologic densitometry equipment and were performed by a trained operator. The identification of vertebral fractures was performed by two rheumatologists (LPCS, RMRP), who had experience in this area and trained according to ISCD vertebral fracture assessment protocols (34). VFA was classified using the Genant semiquantitative (SQ) approach where mild (grade 1) is a reduction of 20–25% of anterior, middle, and/or posterior height, moderate (grade 2) a reduction of 26–40% in any height and severe (grade 3) a reduction of over 40% in any height (34).

Statistical analysis

Results were expressed as the mean $\pm$ standard deviation or percentages. Group data at baseline and after one-year follow-up were compared using Student's t-test and chi-square test.

Patients were divided in three groups (bone mass loss vs. no bone mass change vs. bone mass gain) and compared using one-way ANOVA and Kruskal-Wallis for quantitative variables, and chi-square test for qualitative variables. Differences among groups were analyzed by Dunn multiple comparisons test. Variables associated with bone loss were evaluated with ROC curve. Logistic regression models were used to analyse which factors were independently associated with bone loss. Hosmer and Lemeshow test was used to verify goodness of fit of logistic regression model. The software used was SPSS for Windows, version 20.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). Statistical significance was defined as $p < 0.05$.

Ethics Committee Approval

The study was approved by the Research and Ethics Committee of Clinics Hospital and all participants read and signed the informed consent.

Results

Group Data

Data on demographic characteristics, disease activity parameters, GC dose and immunosuppressant use during the study are shown in table 1. SLICC damage index, previous cumulative GC dose (total and in the year previous to the study), baseline BMD and risk factors for osteoporosis shown are shown in table 2. Baseline laboratorial bone metabolism parameters are shown in table 3.

Bone mineral density and body composition parameters were similar at baseline and after one-year follow-up for the group, namely: lumbar spine BMD (0.965 ± 0.11 vs. 0.958 ± 0.12 g/cm², $p=0.751$), femoral neck BMD (0.805 ± 0.12 vs. 0.794 ± 0.12 g/cm², $p=0.596$), total femur BMD (0.918 ± 0.11 vs. 0.909 ± 0.12 g/cm², $p=0.663$), whole body BMD (1.078 ± 0.08 vs. 1.076 ± 0.09 g/cm², $p=0.925$), bone mineral content (2.09 ± 0.28 vs. 2.09 ± 0.28 kg, $p=0.982$), body fat mass (23.31 ± 8.79 vs. 24.26 ± 9.23 kg, $p=0.562$), lean mass (41.66 ± 6.06 vs. 42.51 ± 6.37 kg, $p=0.452$) and body fat percentage (33.84 ± 6.45 vs. $34.36 \pm 6.54\%$, $p=0.658$). There were no incident vertebral fractures during the study.

Bone Mass Change

Considering the LSC, after one year 36.5% of patients presented significant bone loss and 17.5% presented significant bone gain at lumbar spine and/or femur. At lumbar spine, the frequency of bone loss was 20.6% and of bone gain was 14.3%. At total femur and/or femoral neck, the frequency of bone loss was 23.8% and of bone gain was 6.3%.

Comparisons among groups

Patients were divided in three groups: bone mass loss, no bone mass change and bone mass gain at lumbar spine and/or femur. The three groups had similar age, disease duration, weight, height and BMI. Maximum SLEDAI score, frequency of patients with active disease by organ and low complement during the study are shown in table 1. Cumulative, mean and maximum GC dose during the study were different among groups (Table 1). Multiple comparisons analysis showed that cumulative, mean and maximum GC dose were comparable in patients with bone loss and no bone mass change, but lower in patients with bone gain (Figure 1a, 1b, 1c).

SLICC damage index, previous cumulative GC dose (total and in the year previous to the study), baseline bone mineral density, body composition parameters, frequency of prevalent vertebral fractures, risk factors for osteoporosis, calcium and vitamin D intake were similar among groups (Table 2).

Traditional laboratory bone metabolism parameters were comparable among groups. Baseline serum levels of P1NP were different among groups, while there was no difference regarding baseline serum levels of CTX, OPG or RANKL (Table 3). Multiple comparisons analysis showed that P1NP levels were different in the three groups, with lowest levels in patients with bone loss and highest levels in patients with bone gain (Figure 1d).

Logistic regression analysis showed that P1NP level was an independent risk factor for bone loss at lumbar spine and/or femur (Table 4). ROC curve analysis showed that P1NP level $\leq 38\text{ng/ml}$ is predictor of bone loss with 70.0%

sensitivity and 60.9% specificity (Figure 2). Eighty-seven percent of patients with bone loss had baseline P1NP below the group mean P1NP (53.32ng/mL).

Discussion

This study provides original evidence that low levels of P1NP, a bone formation marker, are predictive of bone loss in the next year in premenopausal SLE patients. Also we highlight the high frequency of bone loss in this group of patients.

Interestingly, lower P1NP level at baseline was an independent risk factor and predictor of bone loss after one year follow-up. Also, a tendency to lower CTX levels in this group of patients suggests that patients with bone loss had suppressed bone turnover. CTX was formerly studied and it was not predictive of bone mass change in previous studies in lupus patients (14, 16). There are no previous studies on P1NP in lupus patients.

Bone formation suppression can result from GC use. GC reduces osteoblastogenesis due to inhibition of the Wnt signaling pathway and up-regulation of peroxisome proliferator activated receptor γ 2 (PPAR γ 2), and increases osteoblast and osteocyte apoptosis due to activation of caspase 3 (35). In fact, greater disease damage index, cumulative amount of GC and longer disease duration have been associated with low bone mass in SLE patients (10-13). However, in our study, this bone turnover suppression does not seem to be explained by previous GC use or disease related factors, as patients with bone loss had similar disease duration, damage index and previous cumulative GC dose when compared to patients with bone gain.

The association of lower P1NP and bone loss was also recently described in HIV-infected patients treated with antiretroviral drugs. In this study, lower P1NP was a predictor of greater hip and spine bone loss (36). A possible explanation is that P1NP levels might reflect the number or status of bone basic

multicellular units (BMUs) and patients with lower levels of bone turnover markers are thought to have fewer numbers of remodeling units (37). Supporting this idea, patients with a higher baseline P1NP levels had greater percent change in lumbar spine BMD after teriparatide treatment (38).

P1NP is one of the bone markers with superior performance in evaluating bone metabolism and its use as a bone formation marker is recommended by International Osteoporosis Foundation (IOF) (22). It has several practical advantages including its low diurnal variability, low intra-individual variability, good precision and stability at room temperature. Its circulating levels are not significantly influenced by food intake and its clearance is unaffected by renal dysfunction. It is of great value in monitoring postmenopausal osteoporosis by its ability to assess both anabolic and anti-resorptive therapies with >80% of patients having a significant change from baseline levels (25). Also, serum levels of bone formation markers correlates with histomorphometric indices of bone formation calculated from iliac crest bone biopsies (39).

Additionally, differences in polymorphisms of genes involved in bone metabolism might have a role in bone turnover and influence bone markers serum levels (40). Families with strong history of osteoporosis, including in premenopausal women, provides support for current theories of a genetic predisposition to bone disorders (41).

An advantage of the present study was the evaluation of the frequency of significant bone loss in premenopausal SLE patients using the least significant change (LSC), according to ISCD recommendations (33). The majority of previous longitudinal studies concluded that bone loss was minimal or no significant in this subgroup of patients (13-20). A possible explanation for this

finding is due to their bone loss evaluation methodology. These previous studies used group mean BMD change between baseline and after follow-up period. In the same way, our study found comparable results between the mean BMD at lumbar spine and femur at baseline and after one-year follow up. However, when we performed patient prospective individual evaluation using the LSC, more than one third of patients presented significant bone loss in one year of follow-up.

In our study, bone loss at lumbar spine and femur was associated with higher cumulative, mean and maximum daily GC doses during the study. This finding reinforces the deleterious effect of GC even in premenopausal SLE women as demonstrated in the minority of the longitudinal studies, which have associated bone loss at lumbar spine with prednisolone use at mean daily doses > 7.5 mg (16-18,20).

In this way, the finding of low level of bone formation marker P1NP in a patient who will need high GC dose in the next months might be an indication of bone active drug treatment in premenopausal SLE patients. We propose the use of this bone formation marker as a tool to identify premenopausal patients at high risk for bone loss, in addition to current guidelines recommendations (3-5).

Lower baseline bone markers in patients that evolved to bone loss also arises the discussion about appropriate treatment in premenopausal women, regarding drug mechanism of action. Previous studies on GIO treatment in SLE premenopausal patients found that bisphosphonates (etidronate, pamidronate and alendronate) prevented bone loss or increased BMD (42-45). Similar results were found in premenopausal cancer patients undergoing chemotherapy

(46). Zoledronic acid significantly increased premenopausal women total hip BMD versus risedronate at month 12 (47). Teriparatide increased spine and hip BMD and improved trabecular microarchitecture and stiffness at the iliac crest in premenopausal women with idiopathic osteoporosis (48) and significantly increased lumbar spine BMD versus alendronate at month 18 (49). Our findings suggest a rationale for the use of anabolic treatments, but teriparatide, the only anabolic agent available for use in premenopausal women, cannot be used for more than 24 months and there are no studies of its use in premenopausal SLE. Studies on new anabolic drugs point to a promising future for GIO treatment (50).

In conclusion, our study demonstrated for the first time that bone formation marker P1NP is an independent predictor of bone loss in premenopausal SLE. This finding contributes to clinical management of this group of patients regarding osteoporosis prevention and treatment. More studies are necessary to define the prediction value of bone markers and other factors concerning fractures and the efficacy and safety of bone active drugs in premenopausal women.

References

1. Pereira RM, Carvalho JF, Canalis E. Glucocorticoid-induced osteoporosis in rheumatic diseases. *Clinics (Sao Paulo)* 2010;65:1197-205.
2. Casella CB, Seguro LP, Takayama L, Medeiros D, Bonfa E, Pereira RM. Juvenile onset systemic lupus erythematosus: a possible role for vitamin D in disease status and bone health. *Lupus* 2012;21:1335-42.
3. Pereira RM, Carvalho JF, Paula AP, Zerbini C, Domiciano DS, Gonçalves H, et al; Committee for Osteoporosis and Bone Metabolic Disorders of the Brazilian Society of Rheumatology; Brazilian Medical Association; Brazilian Association of Physical Medicine and Rehabilitation. Guidelines for the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Rev Bras Reumatol* 2012;52:580-93.
4. Grossman JM, Gordon R, Ranganath VK, Deal C, Caplan L, Chen W, et al. American College of Rheumatology 2010 recommendations for the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2010;62:1515-26.
5. Lekamwasam S, Adachi JD, Agnusdei D, Bilezikian J, Boonen S, Borgström F, et al; Joint IOF-ECTS GIO Guidelines Working Group. A framework for the development of guidelines for the management of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Osteoporos Int* 2012;23:2257-76.

6. Franchimont N, Canalis E. Management of glucocorticoid induced osteoporosis in premenopausal women with autoimmune disease. *Autoimmun Rev* 2003;2:224-8.
7. Levy S, Favez I, Taguchi N, Han JY, Aiello J, Matsui D, et al; Joint IOF-ECTS GIO Guidelines Working Group. Pregnancy outcome following in utero exposure to bisphosphonates. *Bone* 2009;44:428-30.
8. Kalla AA, Fataar AB, Jessop SJ, Bewerunge L. Loss of trabecular bone mineral density in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1993;36:1726-34.
9. Regio P, Bonfá E, Takayama L, Pereira R. The influence of lean mass in trabecular and cortical bone in juvenile onset systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2008;17:787-92.
10. Sinigaglia L, Varenna M, Binelli L, Zucchi F, Ghiringhella D, Gallazzi M, et al. Determinants of bone mass in systemic lupus erythematosus: a cross sectional study on premenopausal women. *J Rheumatol* 1999;26:1280-4.
11. Yeap SS, Fauzi AR, Kong NC, Halim AG, Soehardy Z, Rahimah S, et al. Influences on bone mineral density in Malaysian premenopausal systemic lupus erythematosus patients on corticosteroids. *Lupus* 2009;18:178-81.
12. Souto MI, Coelho A, Guo C, Mendonça LM, Pinheiro MF, Papi JÁ, et al. The prevalence of low bone mineral density in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus and its relationship with the disease damage index and other associated factors. *J Clin Densitom* 2012;15:320-7.

13. Pons F, Peris P, Guañabens N, Font J, Huguet M, Espinosa G, et al. The effect of systemic lupus erythematosus and long-term steroid therapy on bone mass in pre-menopausal women. *Br J Rheumatol* 1995;34:742-6.
14. Hansen M, Halberg P, Kollerup G, Pedersen-Zbinden B, Hørslev-Petersen K, Hyldstrup L, et al. Bone metabolism in patients with systemic lupus erythematosus. Effect of disease activity and glucocorticoid treatment. *Scand J Rheumatol* 1998;27:197-206.
15. Formiga F, Nolla JM, Moga I, Roig-Escofet D. Sequential study of bone mineral density in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 1996;55:857.
16. Kipen Y, Briganti EM, Strauss B, Will R, Littlejohn G, Morand E. Three year followup of bone mineral density change in premenopausal women with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1999;26:310-7.
17. Jardinet D, Lefebvre C, Depresseux G, Lambert M, Devogelaer JP, Houssiau FA. Longitudinal analysis of bone mineral density in premenopausal female systemic lupus erythematosus patients: deleterious role of glucocorticoid therapy at the lumbar spine. *Rheumatology (Oxford)* 2000;39:389-92.
18. Boyanov M, Robeva R, Popivanov P. Bone mineral density changes in women with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol* 2003;22:318-23.
19. Uaratanawong S, Deesomchok U, Hiransuttikul N, Uaratanawong S. Four years follow-up of bone mineral density change in premenopausal

women with systemic lupus erythematosus. J Med Assoc Thai 2004;87:1374-9.

20. Jacobs J, Korswagen LA, Schilder AM, van Tuyl LH, Dijkmans BA, Lems WF, et al. Six-year follow-up study of bone mineral density in patients with systemic lupus erythematosus. Osteoporos Int 2012.
21. El Maghraoui A, Achemlal L, Bezza A. Monitoring of dual-energy X-ray absorptiometry measurement in clinical practice. J Clin Densitom 2006;9:281-6.
22. Vasikaran S, Eastell R, Bruyère O, Foldes AJ, Garnero P, Griesmacher A, et al; IOF-IFCC Bone Marker Standards Working Group. Markers of bone turnover for the prediction of fracture risk and monitoring of osteoporosis treatment: a need for international reference standards. Osteoporos Int 2011;22:391-420.
23. Pereira RM, Falco V, Corrente JE, Chahade WH, Yoshinari NH. Abnormalities in the biochemical markers of bone turnover in children with juvenile chronic arthritis. Clin Exp Rheumatol 1999;17:251-5.
24. Falcini F, Ermini M, Bagnoli F. Bone turnover is reduced in children with juvenile rheumatoid arthritis. J Endocrinol Invest 1998;21:31-6.
25. Brown JP, Albert C, Nassar BA, Adachi JD, Cole D, Davison KS, et al. Bone turnover markers in the management of postmenopausal osteoporosis. Clin Biochem 2009;42:929-42.
26. Bezerra MC, Carvalho JF, Prokopowitsch AS, Pereira RM. RANK, RANKL and osteoprotegerin in arthritic bone loss. Braz J Med Biol Res 2005;38:161-70.

27. Carmona-Fernandes D, Santos MJ, Perpétuo IP, Fonseca JE, Canhão H. Soluble receptor activator of nuclear factor kB ligand/osteoprotegerin ratio is increased in systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Res Ther* 2011;13:R175.
28. Long L, Liu Y, Wang S, Zhao Y, Guo J, Yu P, et al. Dickkopf-1 as potential biomarker to evaluate bone erosion in systemic lupus erythematosus. *J Clin Immunol* 2010;30:669-75.
29. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982;25:1271-7.
30. Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum* 1992;35:630-40.
31. Gladman D, Ginzler E, Goldsmith C, Fortin P, Liang M, Urowitz M, et al. The development and initial validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology damage index for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1996;39:363-9.
32. Lopes JB, Danilevicius CF, Takayama L, Caparbo VF, Menezes PR, Scazufca M, et al. Prevalence and risk factors of radiographic vertebral fracture in Brazilian community-dwelling elderly. *Osteoporos Int* 2011;22:711-9.

33. Lewiecki EM, Gordon CM, Baim S, Leonard MB, Bishop NJ, Bianchi ML, et al. International Society for Clinical Densitometry 2007 Adult and Pediatric Official Positions. *Bone* 2008;43:1115-21.
34. Domiciano DS, Figueiredo CP, Lopes JB, Kuroishi ME, Takayama L, Caparbo VF, et al. Vertebral fracture assessment by dual X-ray absorptiometry: a valid tool to detect vertebral fractures in community-dwelling older adults in a population-based survey. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2013;65:809-15.
35. Compston J. Management of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Nat Rev Rheumatol* 2010;6:82-8.
36. Haskelberg H, Hoy JF, Amin J, Ebeling PR, Emery S, Carr A, et al. Changes in bone turnover and bone loss in HIV-infected patients changing treatment to tenofovir-emtricitabine or abacavir-lamivudine. *PLoS One* 2012;7:e38377.
37. Parfitt AM. Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J Cell Biochem* 1994;55:273–286
38. Yamamoto T, Tsujimoto M, Hamaya E, Sowa H. Assessing the effect of baseline status of serum bone turnover markers and vitamin D levels on efficacy of teriparatide 20 µg/day administered subcutaneously in Japanese patients with osteoporosis. *J Bone Miner Metab* 2013;31:199–205.
39. Eriksen EF, Charles P, Melsen F, Mosekilde L, Risteli L, Risteli J. Serum markers of type I collagen formation and degradation in metabolic bone

disease: correlation with bone histomorphometry. *J Bone Miner Res* 1993;8:127-32.

40. Kim JG, Kim JH, Kim JY, Ku SY, Jee BC, Suh CS, et al. Association between osteoprotegerin (OPG), receptor activator of nuclear factor-kappaB (RANK), and RANK ligand (RANKL) gene polymorphisms and circulating OPG, soluble RANKL levels, and bone mineral density in Korean postmenopausal women. *Menopause* 2007;14:913-8.
41. Moreira Kulak CA, Schussheim DH, McMahon DJ, Kurland E, Silverberg SJ, Siris ES, et al. Osteoporosis and low bone mass in premenopausal and perimenopausal women. *Endocr Pract* 2000;6:296-304.
42. Nakayamada S, Okada Y, Saito K, Tanaka Y. Etidronate prevents high dose glucocorticoid induced bone loss in premenopausal individuals with systemic autoimmune diseases. *J Rheumatol* 2004;31:163-6.
43. Nzeusseu Toukap A, Depresseux G, Devogelaer JP, Houssiau FA. Oral pamidronate prevents high-dose glucocorticoid-induced lumbar spine bone loss in premenopausal connective tissue disease (mainly lupus) patients. *Lupus* 2005;14:517-20.
44. Khan A. Management of low bone mineral density in premenopausal women. *J Obstet Gynaecol Can* 2005;27:345-9.
45. Okada Y, Nawata M, Nakayamada S, Saito K, Tanaka Y. Alendronate protects premenopausal women from bone loss and fracture associated with high-dose glucocorticoid therapy. *J Rheumatol* 2008;35:2249-54.
46. Hershman DL, McMahon DJ, Crew KD, Shao T, Cremers S, Brafman L, et al. Prevention of bone loss by zoledronic acid in premenopausal women undergoing adjuvant chemotherapy persist up to one year

following discontinuing treatment. J Clin Endocrinol Metab 2010;95:559-66.

47. Roux C, Reid DM, Devogelaer JP, Saag K, Lau CS, Reginster JY, et al. Post hoc analysis of a single IV infusion of zoledronic acid versus daily oral risedronate on lumbar spine bone mineral density in different subgroups with glucocorticoid-induced osteoporosis. Osteoporos Int 2012;23:1083-90.
48. Cohen A, Stein EM, Recker RR, Lappe JM, Dempster DW, Zhou H, et al. Teriparatide for idiopathic osteoporosis in premenopausal women: a pilot study. J Clin Endocrinol Metab 2013;98:1971-81.
49. Langdahl BL, Marin F, Shane E, Dobnig H, Zanchetta JR, Maricic M, et al. Teriparatide versus alendronate for treating glucocorticoid-induced osteoporosis: an analysis by gender and menopausal status. Osteoporos Int 2009;20:2095-104.
50. Baron R, Hesse E. Update on bone anabolics in osteoporosis treatment: rationale, current status, and perspectives. J Clin Endocrinol Metab. 2012;97:311-25.

Table 1: Demographic, clinical, laboratorial and treatment data during the study in premenopausal SLE patients with bone mass loss vs. no change vs. bone mass gain at lumbar spine and/or femur sites

	Total (n=63)	Bone Mass Loss (n=23)	No Bone Mass Change (n=29)	Bone Mass Gain (n=11)	P
Age, years	31.10 ± 6.84	29.78 ± 6.27	32.21 ± 7.40	30.91 ± 6.53	0.452
Disease dur, years	5.25 ± 3.75	4.78 ± 4.00	5.93 ± 3.83	4.45 ± 2.88	0.411
Weight, kg	66.87 ± 13.60	67.19 ± 16.11	66.47 ± 9.17	67.28 ± 18.40	0.977
Height, m	1.60 ± 0.06	1.60 ± 0.07	1.60 ± 0.06	1.60 ± 0.07	0.993
BMI, kg/m ²	26.07 ± 5.05	26.09 ± 5.67	26.00 ± 3.69	26.20 ± 7.03	0.994
Maximum SLEDAI	4.35 ± 5.13	4.22 ± 4.39	5.48 ± 6.08	1.64 ± 2.29	0.097
Cutaneous activity	16 (25.4)	6 (26.1)	9 (31.0)	1 (9.1)	0.306
Renal activity	9 (14.3)	5 (21.7)	3 (10.3)	1 (9.1)	0.450
CNS activity	5 (7.9)	2 (8.7)	3 (10.3)	0	0.359
Serositis	1 (1.6)	0	0	1 (9.1)	0.168
Arthritis	13 (20.6)	2 (8.7)	10 (34.5)	1 (9.1)	0.039*
Hematologic activity	20 (31.7)	7 (30.4)	11 (37.9)	2 (18.2)	0.461
Positive anti-dsDNA	10 (15.9)	5 (21.7)	5 (17.2)	0	0.112
Low complement	22 (34.9)	11 (47.8)	9 (31.0)	2 (18.2)	0.190
Cum GC dose, g	5.27 ± 5.57	6.39 ± 5.16	5.96 ± 6.22	1.14 ± 1.66	0.003*
Mean GC dose, mg	12.06 ± 12.86	14.61 ± 11.22	13.59 ± 14.82	2.67 ± 3.86	0.003*
Max GC dose, mg	22.82 ± 20.49	30.43 ± 21.72	21.81 ± 19.2	9.55 ± 14.22	0.015*
IS use	52 (82.5)	19 (82.6)	24 (82.8)	9 (81.8)	0.998
HXCQ use	49 (77.8)	19 (82.6)	23 (79.3)	7 (63.6)	0.727

Data expressed as mean±SD or number (percentage)

BMI: bone mass index; dur: duration; SLEDAI: Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index; CNS: central nervous system; Cum: cumulative; GC: glucocorticoid; Max: maximum; IS: Immunosuppressant; HXCQ: Hydroxychloroquine *:significant.

Table 2: SLICC damage index, previous cumulative GC dose, baseline bone mineral density (BMD) and risk factors for osteoporosis of premenopausal SLE patients with bone mass loss vs. no change vs. bone mass gain at lumbar spine and/or femur sites

	Total (n=63)	Bone Mass Loss (n=23)	No Bone Mass Change (n=29)	Bone Mass Gain (n=11)	P
SLICC/ACR	0.70 ± 0.80	0.57 ± 0.84	0.76 ± 0.74	0.82 ± 0.87	0.441
Cum GC p, g	22.34 ± 12.94	20.20 ± 12.06	24.34 ± 14.39	21.58 ± 10.76	0.631
Cum GC py, g	5.18 ± 5.01	5.49 ± 5.33	5.75 ± 5.27	3.06 ± 3.06	0.272
LS BMD, g/cm ²	0.965 ± 0.11	0.954 ± 0.11	0.977 ± 0.11	0.956 ± 0.14	0.754
FN BMD, g/cm ²	0.805 ± 0.12	0.796 ± 0.09	0.826 ± 0.13	0.766 ± 0.13	0.321
TF BMD, g/cm ²	0.918 ± 0.11	0.909 ± 0.09	0.941 ± 0.12	0.875 ± 0.12	0.228
Low BM at LS	9 (14.3)	3 (13.0)	3 (10.3)	3 (27.3)	0.431
Low BM at femur	6 (9.5)	1 (4.4)	3 (10.3)	2 (18.2)	0.432
Low BM at any site	15 (23.8)	4 (17.4)	6 (20.7)	5 (45.5)	0.204
Vertebral fractures	12 (19.0)	3 (13.0)	8 (27.6)	1 (9.1)	0.262
BMI ≤ 20 kg/m ²	4 (6.3)	1 (4.3)	2 (6.9)	1 (9.1)	0.856
Menarche, years	12.95 ± 1.40	12.70 ± 1.61	13.28 ± 1.10	12.60 ± 1.58	0.229
Pers H fracture	8 (12.7)	2 (8.7)	4 (13.8)	2 (18.2)	0.665
Par H fracture	5 (7.9)	3 (13.0)	2 (6.9)	0	0.302
Tobacco use	6 (9.5)	3 (13.0)	1 (3.4)	2 (18.2)	0.234
Physical activity	19 (30.2)	8 (34.8)	9 (31.0)	2 (18.2)	0.684
Dietary ca, mg/day	428.50 ± 296.67	447.98 ± 291.02	412.24 ± 264.42	430.84 ± 412.51	0.913
Ca sup, mg/day	511.90 ± 467.55	554.35 ± 464.39	534.48 ± 461.58	363.64 ± 504.52	0.513
Vit D sup, UI/day	531.75 ± 449.31	504.35 ± 399.41	589.66 ± 472.34	436.36 ± 504.52	0.595

Data expressed as mean±SD or number (percentage)

SLICC/ACR: Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index; P: previous; Py:previous year; LS: lumbar spine; FN: femoral neck; TF: total femur; Cum: cumulative; GC: glucocorticoid; L: lumbar; BMD: bone mineral density; Fem: femur/femoral; BM: bone mass; BMI: bone mass index; Pers: personal; H: history; Par: parental; Ca: calcium; Sup: supplementation; Vit: vitamin

Table 3: Baseline laboratorial bone metabolism parameters of premenopausal SLE patients with bone mass loss vs. no change vs. bone mass gain at lumbar spine and/or femur sites

	Total (n=63)	Bone Mass Loss (n=23)	No Bone Mass Change (n=29)	Bone Mass Gain (n=11)	P
Ionic Ca, mg/dL	5.15 ± 0.20	5.15 ± 0.25	5.17 ± 0.14	5.10 ± 0.24	0.621
U Ca, mg/24h	91.68 ± 63.68	93.37 ± 69.08	82.42 ± 58.37	117.53 ± 67.16	0.447
P, mg/dl	3.80 ± 0.60	3.86 ± 0.60	3.75 ± 0.60	3.81 ± 0.62	0.120
Creat, mg/dl	0.74 ± 0.13	0.77 ± 0.13	0.73 ± 0.14	0.72 ± 0.10	0.421
Alk phosp, UI/L	67.48 ± 24.71	59.35 ± 18.24	70.79 ± 27.49	75.73 ± 26.07	0.120
25OHD, ng/mL	28.74 ± 12.89	31.37 ± 14.76	26.53 ± 11.06	29.09 ± 13.37	0.410
PTH, pg/mL	40.14 ± 18.39	35.57 ± 18.22	42.14 ± 16.71	44.45 ± 22.49	0.210
P1NP, ng/mL	53.32 ± 34.66	36.95 ± 23.37	54.63 ± 30.82	84.09 ± 43.85	0.001*
CTX, ng/mL	0.39 ± 0.21	0.36 ± 0.16	0.36 ± 0.22	0.52 ± 0.22	0.069
OPG, pmol/L	5.16 ± 2.01	5.50 ± 2.56	4.81 ± 1.70	5.42 ± 1.42	0.454
RANKL, pmol/L	0.46 ± 0.57	0.48 ± 0.48	0.49 ± 0.71	0.32 ± 0.28	0.584

Data expressed as mean±SD or number (percentage)

Ca: calcium; U: urinary; P: phosphorus; Creat: creatinine; Alk phosp: alkaline phosphatase; PTH: parathormone; P1NP: N-terminal propeptide of type 1 collagen; CTX: C-terminal telopeptide of type 1 collagen; OPG: osteoprotegerin; RANKL: Receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand; *:significant.

Table 4: Logistic regression models of bone mass loss and P1NP, cumulative, mean and maximum daily glucocorticoid dose during the study

Variables	Model 1	Model 2	Model 3
P1NP			
OR (95% CI)	1.03 (1.01-1.05)	1.03 (1.01-1.05)	1.03 (1.01-1.05)
<i>p</i> Value	0.012*	0.013*	0.025*
Cumulative GC			
OR (95% CI)	1.00 (1.00-1.00)		
<i>p</i> Value	0.799		
Mean GC			
OR (95% CI)		1.0 (0.95-1.04)	
<i>p</i> Value		0.908	
Maximum GC			
OR (95% CI)			0.98 (0.95-1.01)
<i>p</i> Value			0.224

P1NP: N-terminal propeptide of type 1 collagen; GC: glucocorticoid; *:significant

Figure 1. Differences among groups regarding GC dose during the study and baseline P1NP serum levels

Multiple comparisons analysis showed that cumulative, mean and maximum GC dose during the study were comparable in patients with bone loss and no bone mass change, but lower in patients with bone gain (1a,1b,1c). Baseline P1NP levels were different in the three groups, with lowest levels in patients with bone loss and highest levels in patients with bone gain (1d).

GC: glucocorticoid; cum: cumulative dose; mean: mean dose; max: maximum dose; P1NP: N-terminal propeptide of type 1 collagen

Figure 2. ROC curve analysis for baseline P1NP serum levels and bone loss

Baseline serum levels of P1NP ≤ 38 ng/ml were predictor of bone loss with 70.0% sensitivity and 60.9% specificity.

P1NP: N-terminal propeptide of type 1 collagen; AUC: area under the curve