FERNANDA MANENTE MILANEZ

**O uso de medicações anti-TNF não influencia o
eixo IL-23/IL-17 em pacientes com espondilite
anquilosante**

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
Infecciosos

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eloísa Dutra de Oliveira
Bonfá

**SÃO PAULO
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Milanez, Fernanda Manente

O uso de medicações anti-TNF não influencia o eixo IL-23/IL-17 em pacientes com espondilite anquilosante / Fernanda Manente Milanez. -- São Paulo, 2017.

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

Orientadora: Eloísa Dutra de Oliveira Bonfá.

Descritores: 1.Espondilite anquilosante 2.Interleucina-17 3.Interleucina-23
4.Inflamação 5.Fator de necrose tumoral alfa 6.Dinoprostona 7.Medicções anti-TNF

USP/FM/DBD-110/17

“A vida é uma eterna adaptação.”

Antônio Carlos Althoff

in memoriam

*Dedico esse trabalho às pessoas que pela
minha vida passaram e, em especial, às
que ficaram.*

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Eloisa Silva Dutra de Oliveira Bonfá, excepcional orientadora e líder nata. Muito obrigada pelo seu tempo, suas críticas construtivas, conhecimentos compartilhados e apoio integral a esse projeto.

À querida coautora do coração Dra. Carla Gonçalves Schahin Saad. Não há como agradecer tamanha dedicação em todas as etapas desse trabalho. Você é merecedora de todo o reconhecimento.

Ao mestre Dr. Célio Roberto Gonçalves, um apaixonado pelas espondiloartrites e fonte de inúmeros questionamentos e ideias.

À Dra. Ana Cristina de Medeiros Ribeiro, por toda a ajuda nos cálculos estatísticos.

À equipe do Centro de Infusão CDMAC (médicos, enfermeiros, alunos e pacientes) que por inúmeras manhãs teve sua rotina alterada na fase de coleta de dados. Obrigada pelo apoio e pela compreensão.

À excepcional equipe do LIM-17, em especial às queridas Vilma e Elaine. Muito obrigada por me ensinarem o “caminho das pedras” da análise laboratorial das amostras. Só pessoas especiais como vocês possuem tamanha organização, competência e seriedade.

À minha família, meu pai Joacir, minha mãe Nair, meu irmão Ricardo, minha cunhada Susi e meu sobrinho Francisco. Vocês são meu porto seguro. Um agradecimento especial aos meus pais que sempre me disseram que tudo é possível quando se trabalha duro. Sem o apoio e sem o exemplo de vocês esse sonho não teria saído de Criciúma.

Ao Grégory, por abraçar meus projetos e me ajudar a concretizá-los. Obrigada por compreender minha ausência e pelo apoio incondicional a esse trabalho. Ter você ao meu lado deixou tudo mais leve e alegre.

Às queridas amigas e excepcionais reumatologistas Karina, Renata, Ana Luiza, Luiza e Luciana (as Epamis). A convivência com vocês foi única e transformadora.

À equipe da Sulclínicas, em especial aos queridos Dr. Antônio Carlos Althoff (*in memoriam*) e Dr. Sérgio Augusto Daminelli. Obrigada pela confiança e por todo o apoio no início da minha vida profissional.

Às criciumenses Gabriela, Elisa, Karina, Fernanda, Alice e Cristina. Obrigada pela torcida. Vocês são especiais.

A querida Med 00.1, em especial à Michele e à Ângela. Obrigada pela amizade que se estende além da formatura.

A Reumato-USP (docentes, secretariado e equipe de enfermagem) pelo compromisso com a qualidade no ensino da reumatologia e pela dedicação aos pacientes.

Agradeço a todos que participaram direta e indiretamente para a concretização dessa tese.

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. Serviço de Biblioteca e Documentação.
Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentações; 2011.

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

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de tabelas

Resumo

Abstract

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	6
2.1	Objetivo Primário	7
2.2	Objetivo Secundário	7
3	MÉTODOS	8
3.1	População do Estudo	9
3.2	Desenho do Estudo	10
3.3	Parâmetros Clínicos e Uso de AINH	10
3.4	Avaliação Laboratorial dos Níveis das Citocinas e dos Marcadores de Atividade Inflamatória	13
3.5	Análise da Progressão Radiológica	14
3.6	Análise Estatística	15
4	RESULTADOS	17
4.1	Características Clínicas e Demográficas da População Estudada no Tempo Basal	18
4.2	Níveis Plasmáticos das Citocinas nos Grupos de Pacientes com Espondilite Anquilosante e Controles Saudáveis no Tempo Basal	20
4.3	Seguimento Longitudinal do Grupo EA-ativo Após 24 Meses de Tratamento com Medicamentos anti-TNF	21
4.4	Resposta ao Tratamento anti-TNF	24
4.5	Pesquisa das Correlações Entre os Parâmetros Clínicos, Marcadores de Atividade Inflamatória e Níveis Plasmáticos das Interleucinas no Grupo EA-ativo	26
4.6	Progressão Radiológica no Grupo EA-ativo	26
5	DISCUSSÃO	28
6	CONCLUSÃO	35
7	ANEXOS	37
8	REFERÊNCIAS	54
	APÊNDICES	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINH	- Anti-inflamatório não hormonal
Anti-TNF	- Anti-fator de necrose tumoral
ASAS	- <i>Assessment of Spondyloarthritis International Society</i>
ASDAS-PCR	- <i>C-reactive protein - Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score</i>
ASQoI	- <i>Ankylosing Spondylitis Quality-of-life questionnaire</i>
BASDAI	- <i>Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index</i>
BASFI	- <i>Bath Ankylosing Spondylitis Funcional Index</i>
BASMI	- <i>Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index</i>
CAPPesq	- Comissão de Ética para análise de Projetos de Pesquisa da Universidade de São Paulo
CD	- Células dendríticas
CEDMAC	- Centro de Dispensação de Medicação de Alto Custo
COX	- Cicloxigenase
CS	- Controle saudável
DARMDs	- Drogas antirreumáticas modificadoras de doença
DP	- Desvio padrão
EA	- Espondilite anquilosante
ELISA	- <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EP-2	- Receptor 2 de PGE2
EP-4	- Receptor 4 de PGE2
EpA	- Espondiloartrites
HC-FMUSP	- Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HLA-B27	- Antígeno leucocitário humano B27
IC	- Intervalo de confiança
IIQ	- Intervalo interquartil
IL	- Interleucina
IL-23R	- Receptor da IL-23
LT $\gamma\delta$	- Linfócito T gama-delta
LTh17	- Linfócitos T auxiliares 17
mSASSS	- <i>modified Stoke Ankylosing Spondylitis Spine Score</i>

MTX	- Metotrexato
NK	- <i>Natural Killer</i>
PCR	- Proteína C reativa
PGE2	- Prostaglandina E2
PTGS1	- <i>Prostaglandin-endoperoxide synthase 1</i>
TNF	- Fator de necrose tumoral
VHS	- Velocidade de hemossedimentação
Wnt	- <i>Wingless</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características clínicas e demográficas dos pacientes com espondilite anquilosante no tempo basal*	19
Tabela 2 - Níveis plasmáticos das citocinas nos grupos de pacientes com espondilite anquilosante e controles saudáveis no tempo basal*	21
Tabela 3 - Evolução dos parâmetros clínicos e laboratoriais no seguimento do grupo EA-ativo no tempo basal, 12 meses e 24 meses após uso de anti-TNF	23
Tabela 4 - Comparação dos níveis das citocinas nos grupos EA-ativo respondedor e não respondedor à anti-TNF, EA-controle e controle saudável	25

RESUMO

Milanez FM. *O uso de medicações anti-TNF não influencia o eixo IL-23/IL-17 em pacientes com espondilite anquilosante* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

Introdução: Apesar dos recentes avanços no entendimento da fisiopatologia e no tratamento da espondilite anquilosante (EA), pouco se sabe acerca da influência das medicações anti-fator de necrose tumoral (anti-TNF) sobre as novas vias inflamatórias descritas na patogênese das espondiloartrites.

Objetivo: Dessa forma, o objetivo desse estudo é investigar e descrever a influência a longo prazo das medicações anti-TNF sobre o eixo da IL-23/IL-17 em pacientes com EA e sua possível correlação com o tratamento, parâmetros clínicos, laboratoriais e radiológicos. **Métodos:** Oitenta e seis pacientes com EA sem exposição prévia a medicações anti-TNF foram recrutados. Desses, 47 possuíam *Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index* (BASDAI) ≥ 4 (grupo EA-ativo) e haviam sido encaminhados para iniciar tratamento anti-TNF e 39 possuíam BASDAI < 4 (grupo EA-controle) em uso de anti-inflamatório não hormonal (AINH) e/ou drogas antirreumáticas modificadoras do curso de doença tradicionais. O grupo EA-ativo foi avaliado clinicamente e laboratorialmente no tempo basal e após 12 e 24 meses de uso das medicações anti-TNF e foi comparado com o grupo EA-controle e com 47 controles saudáveis (CS) pareados por idade e sexo. O escore de uso de AINH foi calculado no tempo basal, 12 meses e 24 meses. Os níveis plasmáticos das interleucinas (IL) IL-17A, IL-22, IL-23 e PGE2 e a dosagem sérica da velocidade de hemossedimentação (VHS) e proteína C-reativa (PCR) foram realizados no grupo EA-ativo no tempo basal, 12 meses e 24 meses e somente no tempo basal nos grupos EA-controle e CS. No grupo EA-ativo, a progressão radiológica foi medida pelo *modified Stoke Ankylosing Spondylitis Spine Score* (mSASSS) no tempo

basal e após 24 meses de tratamento. **Resultados:** No tempo basal, o grupo EA-ativo apresentou maiores níveis plasmáticos de IL-23 e PGE2 quando comparado ao grupo EA-controle ($p<0,001$ e $p=0,008$) e ao grupo controle saudável ($p<0,001$ e $p=0,02$). Após 24 meses de uso de anti-TNF, os níveis plasmáticos de IL-23 e PGE2 ainda se mantiveram elevados quando comparado ao grupo CS ($p<0,001$ e $p=0,03$) apesar da melhora de todos os parâmetros clínicos e laboratoriais (VHS/PCR) ($p<0,001$). A subanálise de 27 pacientes do grupo EA-ativo que obtiveram boa resposta ao uso de anti-TNF (atingiram ASDAS-PCR $<2,1$ em 24 meses, com queda $\geq 1,1$ em relação ao ASDAS-PCR basal) revelou que, ainda assim, os níveis plasmáticos de IL-23 eram superiores aos encontrados nos CS ($p<0,001$) e superiores ao grupo EA-controle com atividade de doença similar (ASDAS-PCR $<2,1$; $p=0,01$). No grupo EA-ativo foi encontrada uma correlação positiva entre os níveis plasmáticos de IL-23 e IL-17A no tempo basal, 12 meses e 24 meses do estudo ($p\leq 0,001$). **Conclusão:** Os dados apresentados sugerem que o eixo da IL-23/IL-17 não é influenciado pelas medicações anti-TNF apesar da melhora dos parâmetros clínicos e marcadores de atividade inflamatória estudados.

Descritores: Espondilite anquilosante. Interleucina-17. Interleucina-23. Inflamação. Fator de necrose tumoral alfa. Dinoprostona. Medicações anti-TNF.

ABSTRACT

Milanez FM. *IL-23/IL-17 axis is not influenced by TNF-blocking agents in ankylosing spondylitis patients* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

Background: Advances in pathophysiology and treatment of ankylosing spondylitis (AS) was recently demonstrated. However, the effect of anti-tumor necrosis factor (TNF) in the newly described inflammatory pathways involved in this disease remains to be determined. **Objective:** The aim of our study was, therefore, investigate long-term influence of anti-TNF drugs in IL-23/IL-17 axis of AS patients and their possible correlation with treatment, clinical, laboratory and radiographic parameters. **Methods:** Eighty six AS anti-TNF naïve patients, 47 referred for anti-TNF therapy (active-AS group; *Bath Ankylosing Spondylitis Activity Index* (BASDAI) ≥ 4) and 39 with BASDAI < 4 (control-AS group) were included. The active group was evaluated clinically and laboratorially at baseline, 12-months and 24-months after TNF blockade and compared at baseline to control-AS group and to 47 healthy age- and gender-matched controls. Plasma levels of interleukin (IL)17A, IL-22, IL-23 and PGE2 and serum levels of erythrocyte sedimentation rate (ESR) and c-reactive protein (CRP) were measured at three study times in active-AS and at baseline in control-AS and healthy-controls. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) intake were recorded at baseline, 12 months and 24 months. Radiographic severity and progression was assessed by *modified Stoke Ankylosing Spondylitis Spine Score* (mSASSS) at baseline and 24 months after therapy in active-AS patients. **Results:** At baseline, active-AS group presented higher IL-23 and PGE2 levels compared to control-AS group ($p<0.001$ and $p=0.008$) and to healthy controls ($p<0.001$ and $p=0.02$). After 24-months of TNF blockade, IL-23 and PGE2 remained elevated with higher levels compared with the healthy-control group ($p<0.001$

and $p=0.03$) in spite of significant improvements in all clinical/inflammatory parameters ($p<0.001$). Further analysis of 27 anti-TNF-treated patients who achieved a good response (ASDAS-CRP <2.1 , with a drop ≥ 1.1) at 24-months revealed that IL-23 plasma levels remained higher than healthy controls ($p<0.001$) and higher than control-AS group with similar disease activity (ASDAS-CRP <2.1 , $p=0.01$). In active-AS group ($n=47$), there was a correlation between IL-23 and IL-17A at baseline, 12-months and 24-months after anti-TNF therapy ($p\leq 0.001$). **Conclusion:** This study provides novel data demonstrating that the IL-23/IL-17 axis is not influenced by TNF blockade drugs in AS patients despite clinical and inflammation improvements and NSAID intake.

Descriptors: Spondylitis, ankylosing. Interlukin-17. Interleukin-23. Inflammation. Tumor necrosis factor-alpha. Dinoprostone. Anti-TNFdrugs.

1 INTRODUÇÃO

As espondiloartrites (EpA) são um grupo de doenças inflamatórias em que a espondilite anquilosante (EA) é o protótipo. Apesar dos avanços significativos na compreensão da fisiopatologia e o surgimento de novas opções de tratamento, o entendimento completo das vias inflamatórias envolvidas na fisiopatologia, a descrição dos fatores preditores de resposta às medicações anti-fator de necrose tumoral (anti-TNF) e os fatores de risco para a progressão radiológica ainda são desafios nesta doença.

Recentemente foi descrito a influência do eixo das interleucinas (IL) 23 e 17 na fisiopatologia das EpA, inclusive com resultados clínicos favoráveis do bloqueio dessa via como sendo mais uma possível opção terapêutica nesse grupo de doenças¹⁻⁶. Corroborando esse fato, estudos genéticos têm descrito que polimorfismos no receptor da IL-23 (IL-23R) podem estar relacionados a uma maior susceptibilidade no desenvolvimento da EA⁷. Além disso, já foi descrito em pacientes com EA, uma maior expressão do IL-23R nos linfócitos T gama/delta (LT γ/δ) estimulados com uma consequente elevação na expressão da IL-17 (em níveis mais elevados do que em controles saudáveis e em pacientes com artrite reumatoide)⁸.

Também foi demonstrado uma associação entre os fatores de risco tradicionais, como o antígeno leucocitário humano B27 (HLA-B27), com o eixo a IL-23/IL17^{1,9}. Estudos em ratos transgênicos evidenciaram que a propensão

do HLA-B27 em se oligomerizar e formar complexos no interior do retículo endoplasmático poderia gerar um estresse no mesmo com subsequente erro na transcrição proteica e um aumento na produção da IL-23 (dentre outras citocinas inflamatórias) pelos macrófagos ativados e células dendríticas^{1,9}. No entanto, estudos em pacientes com EA não confirmaram esses achados^{10,11}. Em humanos, um estudo que utilizou biópsias de intestino de pacientes com EA identificou a oligomerização do HLA-B27 nas células intestinais acompanhada de ativação autofágica (ao invés do erro na transcrição proteica como descrito dos estudos em ratos) como sendo responsável pela modulação intestinal dos níveis de IL-23 na EA¹⁰. Um outro trabalho que analisou os monócitos periféricos de pacientes com EA identificou uma maior produção de IL-23 pelos macrófagos de pacientes em resposta ao estímulo de lipopolissacarídeos. No entanto, neste estudo a maior produção de IL-23 não pode ser atribuída ao erro na transcrição proteica relacionado ao HLA-B27¹¹.

Outros trabalhos descreveram que a interação entre a IL-23 e o IL-23R possui papel importante na maturação e na diferenciação dos linfócitos T auxiliares 17 (LTh17)^{1,12-15}. Além disso, em indivíduos predispostos, essa interação (IL-23/IL-23R) predispõe a uma maior diferenciação de LTh17 patogênicos (levando ao aumento da expressão do IL-23R e a maior produção da IL-17 e IL-22) além de uma maior produção de IL-17 por células da imunidade inata (LT γ/δ , mastócitos, neutrófilos e células *natural killer* [NK])¹²⁻¹⁵. A IL-17, por sua vez, já foi relacionada às manifestações fenotípicas da EA além de ser importante indutora da produção de TNF e de outras citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias^{14,15}.

Dentre as outras citocinas pró-inflamatórias, uma que merece destaque é a prostaglandina E2 (PGE2). Apesar de ainda pouco estudada na EA, sabe-se que a PGE2 pode influenciar o eixo da IL-23/IL-17, além de participar classicamente da resposta inflamatória^{16,17}. Um estudo que utilizou células dentrídicas (CD) humanas demonstrou que o estímulo com *β -glucan* da *Cândida albicans* favorece a secreção de um padrão de citocinas pró-Th17¹⁶. Nesse mesmo trabalho, a inibição da síntese da PGE2 ou o bloqueio dos seus receptores tipo 2 (EP2) e tipo 4 (EP4) reduziu drasticamente a produção de IL-23, sugerindo que a PGE2 endógena possa ter um papel regulatório na produção da via IL-23/IL-17¹⁶. Além disso, já foi descrito que a PGE2 tem um efeito *dual* no osso (reabsortivo e anabólico) além de ter influência sobre a diferenciação das células tendíneas humanas^{17,18}.

Deve-se considerar ainda que as observações da prática clínica e dos estudos de registro sugerem que o uso isolado de medicações anti-TNF não é o suficiente para que se reduza a progressão radiológica na EA, indicando que outras vias possam estar envolvidas¹⁹⁻²¹. Além disso, estudos subsequentes reportaram o possível benefício do uso do anti-inflamatório não hormonal (AINH) na progressão radiológica dos pacientes com EA^{22,23}. Em 2005, Wanders *et al.*²² demonstraram que a estratégia de usar AINH de forma contínua foi mais eficaz em reduzir a progressão radiográfica em pacientes com EA sintomáticos, independentemente do dano radiográfico no tempo basal ou dos parâmetros de atividade de doença. Corroborando esse fato, dados prospectivos da coorte alemã encontraram uma menor progressão radiológica com o uso de AINH em altas doses²³. Esses achados

levantam a hipótese de que a inibição da cicloxigenase (COX) pelos AINH possa influenciar os níveis de PGE2 com um possível impacto no eixo da IL-23/IL-17 e na neoformação óssea dos pacientes com EA.

Mais recentemente, Appel *et al.*²⁴ descreveram em pacientes com EA de longa evolução, uma maior presença de células IL-23 positivas (macrófagos e células dendríticas) no osso subcondral e nos tecidos fibrosos da coluna (ligamentos e sindesmoses). Além disso, em um modelo de espondiloartrites foi demonstrado que as ênteses são sítios anatomicamente responsivos à IL-23 e que, quando estimuladas por essa, aumentam a expressão local de IL-17 e IL-22²⁵. A IL-22, por sua vez, induz genes que regulam a formação óssea [especificamente aqueles que codificam a via *Wingless* (Wnt)], sugerindo que esta citocina possa ter uma influência no componente osteoproliferativo da EA²⁵.

A literatura recente traz vários indícios da participação do eixo da IL-23/IL-17 na fisiopatogênese da EA. No entanto, não há dados a longo prazo sobre a influência do bloqueio do fator de necrose tumoral (TNF) (via medicações anti-TNF) sobre esse eixo. Dessa forma, estudar o comportamento dessas citocinas em humanos, no pré e pós tratamento, pode trazer informações reais sobre o que ocorre *in vivo*, auxiliando na compreensão das vias inflamatórias envolvidas e no desenvolvimento de novas opções terapêuticas para os pacientes com EA.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Primário

Investigar a influência a longo prazo da terapia anti-TNF sobre o eixo da IL-23/IL-17 em pacientes com EA.

2.2 Objetivo Secundário

Estudar e descrever a possível associação das citocinas IL-17A, IL-22, IL-23 e PGE2 com os parâmetros clínicos, marcadores tradicionais de atividade inflamatória (velocidade de hemossedimentação [VHS] e proteína C reativa [PCR]), resposta ao tratamento anti-TNF e progressão radiológica.

3 MÉTODOS

3.1 População do Estudo

Oitenta e seis pacientes com EA com idade ≥ 18 e < 65 anos sem exposição prévia à medicação anti-TNF foram recrutados. Todos os pacientes preenchiam os critérios de Nova Iorque modificados para espondilite anquilosante e estavam em seguimento clínico regular no ambulatório de espondiloartrites do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP)²⁶. Destes, 47 haviam sido referenciados para o Centro de Dispensação de Medicação de Alto Custo (CEDMAC) para iniciar terapia anti-TNF conforme consenso e recomendação terapêutica do grupo *Assessment of Spondyloarthritis International Society* (ASAS)²⁷. Esse primeiro grupo foi classificado como grupo “EA-ativo” pois os pacientes possuíam *Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index* (BASDAI) ≥ 4 apesar de terem sido tratados previamente com pelo menos dois AINHs diferentes na maior dose tolerada, por um período igual ou superior a três meses cada, associado ou não a drogas antirreumáticas modificadores de doença (DARMDs): metotrexato (MTX), sulfassalazina ou leflunomida, em doses plenas por pelo menos seis meses²⁷. O segundo grupo denominado “EA-controle” foi composto por outros 39 pacientes com EA que possuíam BASDAI < 4 em uso de AINH e/ou DARMDs. Adicionalmente, foi criado o grupo “controle saudável” (CS)

composto por 47 indivíduos saudáveis, pareados por idade e sexo com o grupo EA-ativo.

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para análise de Projetos de Pesquisa da Universidade de São Paulo (CAPPesq) sob o número de protocolo 1298/06 (Anexo A). O termo de consentimento informado foi obtido de todos os sujeitos da pesquisa (Anexos B, C e D).

3.2 Desenho do Estudo

A pesquisa em questão possui duas linhas de estudo:

- a) Análise transversal feita no tempo basal (início do estudo), comparando os 47 pacientes com EA e BASDAI ≥ 4 (grupo EA-ativo), os 39 pacientes com EA e BASDAI < 4 (grupo EA-controle) e os 47 CS.
- b) Análise longitudinal do grupo EA-ativo nos tempos 12 e 24 meses após o início do tratamento anti-TNF, utilizando para isso parâmetros clínicos, dosagem das interleucinas, marcadores tradicionais de atividade inflamatória e escore de progressão radiológica.

3.3 Parâmetros Clínicos e Uso de AINH

Os parâmetros de avaliação e seguimento clínico foram realizados em todos os 86 pacientes com EA no tempo basal. No grupo EA-ativo, os mesmos parâmetros foram reanalisados em 12 e 24 meses após o uso do Anti-TNF.

A análise incluiu os escores recomendados pelo ASAS para avaliação e seguimento de pacientes com EA conforme descrito baixo^{28,29}:

- a) BASDAI: O escore BASDAI foi utilizado para definir atividade de doença no tempo zero (basal). Trata-se de um instrumento composto por seis perguntas (já traduzidas e validadas previamente para o português) que avaliam cinco sintomas: fadiga, dor na coluna, dor e inflamação articular (excluindo-se a coluna vertebral), áreas de dor a palpação e rigidez matinal^{30,31}. Conforme recomendação vigente para prescrição de medicações anti-TNF, foram considerados em atividade de doença os pacientes com BASDAI ≥ 4 e sem de atividade de doença os com BASDAI < 4 ²⁷ (Anexo E).
- b) C-reactive protein - Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score (ASDAS-PCR): O ASDAS-PCR foi escolhido para definir a resposta ao uso de anti-TNF²⁹. Esse escore reúne alguns domínios do BASDAI (como a duração da rigidez matinal e a intensidade da dor lombar e periférica), a avaliação global do paciente sobre a doença e a dosagem da PCR em um cálculo matemático. Após 24 meses, foram considerados responsivos ao tratamento com anti-TNF os pacientes com EA que atingiram ASDAS-PCR $< 2,1$ com queda do escore $\geq 1,1$ em relação ao basal²⁹ (Anexo F).
- c) Bath Ankylosing Spondylitis Funcional Index (BASFI): Índice composto por dez questões que avaliam a capacidade funcional e a capacidade de integração do paciente nas atividades de vida diária (já traduzido previamente para o português)^{28,31} (Anexo G).

- d) Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index (BASMI): esse escore quantifica de forma objetiva o grau de redução de mobilidade em coluna e quadris (dano articular crônico). Foram avaliados: flexão lateral da coluna, distância tragus-parede; Schober modificado e distância intermaleolar máxima (em centímetros) além da rotação cervical (em ângulo) utilizando a técnica de mensuração recomendada pelo grupo ASAS²⁸. Os resultados foram convertidos em uma tabela estratificada em três faixas, com pontuação variando entre 0, 1 e 2 (resultados expressos entre 0 a 10 unidades)^{28,32,33} (Anexo H).
- e) Ankylosing Spondylitis Quality-of-life questionnaire (ASQoL): A qualidade de vida foi avaliada por meio do questionário ASQoL composto por 18 questões. Cada uma permite uma resposta dicotômica “sim/não”, pontuada como “1” e “0”, respectivamente (resultados entre 0 a 18). Quanto maior a pontuação, pior a qualidade de vida. O ASQoL foi previamente traduzido validado e adaptado culturalmente ao português do Brasil (Anexo I)^{34,35}.

Além dos parâmetros clínicos citados acima, foi realizado o cálculo do uso de AINH no início do estudo, 12 meses e 24 meses após o tratamento com anti-TNF. Os pacientes eram arguidos sobre tipo de medicação, dose e frequência de uso. Os resultados foram apresentados em escore de equivalência conforme graduação de 0-100³⁶.

3.4 Avaliação Laboratorial dos Níveis das Citocinas e dos Marcadores de Atividade Inflamatória

Amostras de sangue foram coletadas de todos os pacientes. Do grupo EA-ativo (n=47) foram colhidas três amostras por paciente (tempos basal, 12 e 24 meses) sempre imediatamente antes da infusão endovenosa ou da aplicação subcutânea do anti-TNF. Nos grupos EA-controle (n=39) e controle saudável (n=47) foi feita uma única coleta no tempo basal. Todas as amostras seguiam o mesmo protocolo de coleta que incluía a centrifugação imediata para separação do soro e plasma, com posterior congelamento e armazenamento de ambas as amostras a -80°C. As interleucinas IL-17A, IL-22 e IL-23 foram mensuradas em plasma através da tecnologia LUMINEX 200™ utilizando para isso kit do fornecedor Millipore™ com os seguintes limites mínimos de detecção: IL-17A = 2,1 pg/mL; IL-22 = 0,021 ng/mL e IL-23 = 0,098 ng/mL. A análise plasmática da PGE2, foi realizada pela técnica *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), utilizado o kit do fornecedor USCN com sensibilidade de 1,52 pg/mL e com leitura realizada em aparelho Stat Fax-2.100. Das amostras estudadas, os níveis de IL-23 estavam em 72% das vezes acima do limite mínimo de detecção, 100% para PGE2, 36% para IL-17A e 8% para IL-22. Além das dosagens plasmáticas acima citadas, nos pacientes com EA (grupos EA-ativo e EA-controle) foram pesquisados em soro os marcadores de atividade inflamatória como a VHS (em mm/h) e a PCR (em mg/L).

3.5 Análise da Progressão Radiológica

Todos os pacientes com EA realizaram radiografias em formato digital da coluna cervical e lombossacra em posição perfil no tempo basal. Os pacientes do grupo EA-ativo realizaram nova avaliação radiográfica após 24 meses de tratamento com anti-TNF. A análise radiográfica foi feita com a aplicação do escore *modified Stoke Ankylosing Spondylitis Spine Score* (mSASSS)³⁷. Foram analisados os cantos vertebrais anteriores da coluna cervical (da borda inferior de C2 até à margem superior de T1) e lombar (da borda inferior de T12 à margem superior de S1). Foram consideradas não válidas para análise as radiografias com ausência ≥ 3 locais de pontuação. Cada canto foi classificado e pontuado como normal (0 ponto), presença de erosão e/ou esclerose e/ou quadratura (um ponto), presença de sindesmófito incompleto (dois pontos) e presença de ponte sindesmofitária (três pontos). Devido a forma naturalmente mais retilínea da porção anterior da terceira vértebra cervical, essa vértebra não foi pontuada para quadratura (poderia ser pontuada na presença de erosão e/ou esclerose). O escore total mSASSS varia de 0 a 72³⁷.

A análise das imagens foi feita no final do estudo, de forma independente, por dois leitores (um reumatologista e um radiologista musculoesquelético), ambos cegos para tempo, parâmetros clínicos e laboratoriais. Foram definidos como “progressores” os pacientes com EA que sofreram um aumento no mSASSS ≥ 2 unidades após 24 meses de tratamento.

O coeficiente de correlação intraclass (modelo aleatório bidirecional com concordância absoluta no SPSS 20) entre os dois leitores foi de 0,997

(95% com intervalo de confiança (IC) 0,995-0,998) no tempo basal e 0,998 (95% IC 0,0996-0,0999) em 24 meses. A taxa de concordância sobre a variação do escore mSASSS foi de 0,951 (95% IC 0,914-0,972) entre os observadores.

3.6 Análise Estatística

A análise estatística foi feita através do programa SPSS 20 com auxílio de profissional especializado em estatística médica. Baseado em um estudo prévio que comparou os níveis de IL-23 e IL-17A em pacientes com EA e CS, foi calculada uma quantidade mínima de sete indivíduos por grupo para que o estudo tivesse validade (cálculo da amostra)³⁸. Dessa forma, o estudo atual assegura um poder maior que 95% para detectar as possíveis diferenças entre os grupos de pacientes com EA e CS (poder da amostra).

Os resultados foram apresentados em média e desvio padrão (DP) para as variáveis paramétricas e como mediana e intervalo interquartil (IIQ) de 25% a 75% para as variáveis não paramétricas. As variáveis categóricas foram apresentadas em valores percentuais (%). A análise transversal utilizou o teste do *Qui-quadrado* ou teste exato de *Fisher* para as variáveis categóricas e o *Teste-t* ou o teste de *Mann-Whitney U* para as variáveis contínuas conforme distribuição paramétrica e não paramétrica, respectivamente. Como os grupos EA-ativo e EA-controle não eram pareados, foi feita uma regressão logística linear múltipla incluindo todas as diferenças clínicas estatisticamente significantes entre os grupos que poderiam influenciar nas dosagens das interleucinas e da PGE2. Para o

seguimento longitudinal do grupo EA-ativo, os dados clínicos e laboratoriais foram analisados no tempo basal, 12 e 24 meses por meio dos testes *ANOVA* ou *Friedman* para amostras sequenciais conforme apropriado (distribuição paramétrica e não paramétrica, respectivamente). Posteriormente foi feita uma análise *post-hoc* pelo teste de *Tukey* para determinar em quais grupos as amostras se diferenciavam.

A análise estatística ainda foi complementada pela pesquisa de possíveis fatores relacionados à progressão radiológica e aos fatores preditores de resposta aos anti-TNF. Para isso, utilizou-se os dados disponíveis no tempo basal e suas variações comparativas após 12 e 24 meses após o tratamento. As correlações foram estudadas pela análise de *Spearman*. A significância estatística foi definida como $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Características Clínicas e Demográficas da População Estudada no Tempo Basal

Não foram identificadas diferenças com significância estatística entre os grupos EA-ativo e controle saudável. Ambos foram equivalentes em relação à idade ($38,02 \pm 11,09$ vs $37,34 \pm 10,95$ anos, $p=0,09$), predominância de sexo masculino (74% vs 74%, $p=1,00$) e de maioria caucasiana (89% vs 76%, $p=0,17$). Já a comparação entre os grupos EA-controle e controle saudável revelou proporções semelhantes em relação ao sexo masculino (74% vs 74%, $p=1,00$), predomínio de caucasianos (74% vs 76%, $p=1,00$) e diferenças em relação a idade. O grupo EA-controle possuía maior média de idade ($49,51 \pm 10,53$ vs $37,74 \pm 10,95$ anos, $p<0,001$) do que a encontrada nos controles saudáveis.

A comparação entre os grupos EA-ativo e EA-controle está ilustrada na Tabela 1. O grupo EA-ativo possui indivíduos mais jovens ($p<0,001$), com um menor tempo de doença ($p=0,007$), piores parâmetros de avaliação clínica mensurados pelo BASDAI, ASDAS-PCR, BASFI e ASQol ($p<0,001$), maiores níveis de VHS e PCR ($p<0,001$), menor mSASSS ($p<0,001$) e menor BASMI ($p=0,03$) quando comparado ao grupo EA-controle.

A proporção de pacientes usando MTX foi maior no grupo EA-ativo quando comparado com EA-controle ($p<0,001$). A dose média de uso do MTX foi de $20,76 \pm 4,67$ mg por semana no grupo EA-ativo.

Tabela 1 - Características clínicas e demográficas dos pacientes com espondilite anquilosante no tempo basal*

Variável	Espondilite anquilosante (n = 86)		p
	EA-ativo BASDAI ≥ 4 (n = 47)	EA-controle BASDAI < 4 (n = 39)	
Sexo, masculino (%)	35 (74%)	29 (74%)	1,00
Idade (anos)	38,02 ± 11,09	49,51 ± 10,53	<0,001
Raça (caucasiana) (%)	42 (89%)	29 (74%)	0,09
Envolvimento periférico (%)	31 (66%)	23 (59%)	0,65
HLA B27 positivo (%)	82%	90%	0,36
Tempo de doença (anos)	10,77 ± 4,48	17,60 ± 8,98	0,007
BASDAI	5,54 ± 2,13	2,73 ± 1,17	<0,001
ASDAS-PCR	3,93 ± 1,04	1,99 ± 0,84	<0,001
BASFI	5,80 ± 2,33	3,80 ± 2,07	<0,001
BASMI	4,53 ± 2,70	5,82 ± 2,66	0,03
ASQol	12,59 ± 4,83	5,28 ± 4,05	<0,001
PCR (mg/L)	29,71 ± 39,56	4,55 ± 3,54	<0,001
VHS (mm/h)	29,70 ± 23,32	6,94 ± 6,65	<0,001
mSASSS	15,83 ± 18,73	37,94 ± 25,48	<0,001
Escore AINH	70,26 ± 44,78	68,25 ± 41,43	0,77
Metotrexato (%)	23 (48%)	2 (5%)	<0,001
Sulfassalazina (%)	27 (57%)	21 (53%)	0,83
Leflunomida (%)	2 (4%)	1 (2%)	1,00

*Todos os valores estão expressos em média ± desvio padrão, exceto proporções (%). BASDAI = *Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index*; ASDAS-PCR = *C-reactive protein - Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score*; BASFI = *Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index*; BASMI = *Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index*; ASQol = *Ankylosing Spondylitis Quality of Life*; PCR = Proteína C reativa; VHS = Velocidade de hemossedimentação; mSASSS = *modified Stoke Ankylosing Spondylitis Spine Score*; AINH = anti-inflamatório não hormonal.

4.2 Níveis Plasmáticos das Citocinas nos Grupos de Pacientes com Espondilite Anquilosante e Controles Saudáveis no Tempo Basal

A análise das citocinas do tempo basal pode identificar que o grupo EA-ativo apresentou níveis de IL-23 e PGE2 mais altos quando comparados ao grupo EA-controle ($p < 0,001$ e $p = 0,008$) e aos controles saudáveis ($p < 0,001$ e $p = 0,02$). Não foi encontrada diferença entre os níveis plasmáticos de IL-23 e PGE2 na comparação entre os grupos EA-controle e controle saudável ($p = 0,57$ e $p = 0,99$). Em relação a IL-17A e a IL-22, não houve diferença ao se comparar os grupos EA-ativo *versus* EA-controle ($p = 0,45$ e $p = 0,68$), EA-ativo *versus* controle saudável ($p = 0,48$ vs $p = 0,47$) e EA-controle *versus* controle saudável ($p = 0,90$ e $p = 0,78$). Os dados citados estão ilustrados na Tabela 2.

Além das análises citadas, foi realizada uma regressão logística linear múltipla incluindo todas as diferenças clínicas encontradas entre os grupos EA-ativo e EA-controle como idade, tempo de doença, BASFI, BASMI, ASQol, mSASSS e uso de metotrexato. Não foi possível identificar nenhum fator que pudesse estar associado às diferenças encontradas nos níveis da IL-23 e da PGE2 ($p > 0,05$).

Tabela 2 - Níveis plasmáticos das citocinas nos grupos de pacientes com espondilite anquilosante e controles saudáveis no tempo basal*

Citocina	Espondilite Anquilosante (n=86)		P^1	Controles Saudáveis (n=47)	P^2	P^3
	EA-ativo BASDAI ≥ 4 (n=47)	EA-controle BASDAI < 4 (n=39)				
IL-17A pg/mL	1,62 (1,06-2,98)	1,57 (1,04-2,17)	0,45	1,57 (1,04-2,17)	0,48	0,90
IL-22 ng/mL	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-0,00)	0,68	0,00 (0,00-0,00)	0,47	0,78
IL-23 ng/mL	0,08 (0,04-0,17)	0,03 (0,01-0,08)	$<0,001$	0,02 (0,00-0,05)	$<0,001$	0,57
PGE2 pg/mL	19,46 (5,41-102,58)	7,67 (3,96-24,73)	0,008	7,66 (3,30-30,32)	0,02	0,99

*Todos os valores estão expressos como mediana e intervalo interquartil 25-75% (IIQ). IL = Interleucina; BASDAI = *Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index*; PGE2 = Prostaglandina E2. P^1 = EA-ativo vs EA-controle; P^2 = EA-ativo vs controles saudáveis; P^3 = EA-controle vs controles saudáveis.

4.3 Seguimento Longitudinal do Grupo EA-ativo Após 24 Meses de Tratamento com Medicções anti-TNF

No início do estudo, 32 (68%) pacientes do grupo EA-ativo iniciaram tratamento com infliximabe, 13 (28%) com adalimumabe e 2 (4%) com etanercepte em doses plenas. Ao longo dos 24 meses de seguimento, 17 pacientes (36%) necessitaram trocar a medicação inicial por outro anti-TNF devido a ineficácia ou efeitos adversos.

A Tabela 3 traz a evolução dos parâmetros clínicos e laboratoriais após dois anos de tratamento. Pode-se constatar uma importante melhora dos parâmetros avaliados (BASDAI, ASDAS-PCR, BASFI, BASMI e ASQoL) e dos marcadores de atividade inflamatória (VHS/PCR) ($p<0,001$). No entanto, apesar da evidente melhora clínica e laboratorial, os níveis plasmáticos de IL-23 e PGE2 mantiveram-se elevados, sem diferença na

comparação longitudinal entre os tempos basal, 12 e 24 meses, com valores de $p=0,38$ e $p=0,98$ respectivamente. Após 24 meses de tratamento com anti-TNF, os níveis plasmáticos dessas citocinas (IL-23 e PGE2) continuaram mais altos quando comparados aos do grupo controle saudável ($p<0,001$ e $p=0,03$). Os dados mostram ainda que não houve mudanças significativas nos níveis de IL-17A e de IL-22 durante o uso dos anti-TNF ($p>0,05$) sendo que, no final do seguimento, os níveis dessas interleucinas (IL-17A e IL-22) continuavam sem diferenças significativas quando comparados aos controles saudáveis ($p>0,05$).

Foi observado uma redução significativa no escore de uso de AINH após a introdução os anti-TNF ($p<0,01$). Entretanto, não foi encontrada uma correlação significativa entre o escore de uso de AINH e os níveis plasmáticos de PGE2 nos tempos basal ($r = 0,07$), 12 meses ($r = -0,20$) e 24 meses ($r = -0,28$) de tratamento ($p>0,05$).

Tabela 3 - Evolução dos parâmetros clínicos e laboratoriais no seguimento do grupo EA-ativo no tempo basal, 12 meses e 24 meses após uso de anti-TNF

Variável	EA-ativo			Controle Saudável	
	Basal (n=47)	12 Meses (n=47)	24 Meses (n=47)	P ¹	P ²
VHS (mm/h)*	29,70 ± 23,32	9,59 ± 12,10	10,53 ± 13,90	<0,001	NA
PCR (mg/L)*	29,71 ± 39,56	7,57 ± 13,50	5,13 ± 6,23	<0,001	NA
mSASSS*	15,83 ± 18,73	NA	19,49 ± 19,61	<0,001	NA
BASDAI*	5,54 ± 2,13	2,86 ± 2,33	2,77 ± 2,54	<0,001	NA
ASDAS-PCR*	3,93 ± 1,04	2,08 ± 1,12	1,93 ± 1,11	<0,001	NA
BASFI*	5,80 ± 2,33	3,60 ± 2,97	3,18 ± 2,95	<0,001	NA
BASMI*	4,53 ± 2,70	3,70 ± 2,72	3,34 ± 2,56	<0,001	NA
ASQol*	12,59 ± 4,83	6,57 ± 5,51	5,83 ± 5,81	<0,001	NA
Escore AINH*	70,26 ± 44,78	62,43 ± 47,56	45,16 ± 46,37	<0,01	NA
IL-17A pg/mL**	1,62 (1,06-2,98)	1,58 (1,14-3,52)	1,69 (0,78-3,46)	0,78	1,57 (1,04-2,17) 0,96
IL-22 ng/mL**	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-0,00)	0,87	0,00 (0,00-0,00) 0,59
IL-23 ng/mL**	0,08 (0,04-0,17)	0,04 (0,02-0,17)	0,06 (0,03-0,15)	0,38	0,02 (0,00-0,05) <0,001
PGE2 pg/mL**	19,46 (5,41-102,58)	23,73 (4,72-102,82)	35,50 (5,88-75,82)	0,98	7,66 (3,30-30,32) 0,03

*Valores expressos em média ± DP **Valores expressos em mediana e intervalo interquartil 25-75%(IQ). VHS = Velocidade de hemossedimentação; PCR = Proteína C reativa; mSASSS = modified Stoke Ankylosing Spondylitis Spine Score; BASDAI = Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index; ASDAS-PCR = C-reactive protein - Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score; BASFI = Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index; BASMI = Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index; ASQol = Ankylosing Spondylitis Quality of life; AINH = Anti-inflamatório não hormonal; IL= Interleucina; PGE2 = Prostaglandina E2. NA = Não analisado. P¹ = EA-ativo no tempo basal vs 12 meses vs 24 meses; P² = EA-ativo após 24 meses de tratamento anti-TNF vs controle saudável.

4.4 Resposta ao Tratamento anti-TNF

Após dois anos, 27 (57,5%) pacientes do grupo EA-ativo foram classificados como respondedores ao tratamento com anti-TNF (ASDAS-PCR < 2,1 com queda $\geq 1,1$ em relação ao basal). Comparando os pacientes respondedores com os não respondedores no tempo basal, não foi observada diferença significativa na mediana e no IIQ 25-75% nos níveis plasmáticos de IL-17A: 2,06 (1,26-3,04) vs 1,53 (0,75-2,17) pg/mL, $p=0,10$; nos níveis de IL-22: 0,00 (0,00-0,00) vs 0,00 (0,00-0,00) ng/mL, $p=0,75$; IL-23: 0,08 (0,04-0,13) vs 0,07 (0,05-0,31) ng/mL, $p=0,70$ e nos níveis de PGE2: 19,07 (4,25-83,16) vs 36,34 (7,55-127,89) pg/mL, $p=0,51$.

No final do estudo, pode-se perceber ainda que o grupo dos respondedores ao tratamento anti-TNF possuía maiores níveis plasmáticos de IL-17A quando comparado aos não respondedores ($p=0,03$). Não foram encontradas diferenças em 24 meses nos níveis de IL-22, IL-23 e PGE2 entre os dois grupos ($p>0,05$).

A análise adicional de todas as citocinas no final do seguimento do estudo (24 meses) mostrou que os níveis plasmáticos de IL-23 continuavam elevados no grupo EA-ativo respondedor ao tratamento anti-TNF quando comparado aos 21 pacientes do grupo EA-controle com semelhante ponto de corte para atividade de doença (ASDAS-PCR < 2,1) ($p=0,01$) e quando comparado aos controles saudáveis ($p<0,001$) (Tabela 4).

Tabela 4 - Comparação dos níveis das citocinas nos grupos EA-ativo respondedor e não respondedor à anti-TNF, EA-controle e controle saudável

Citocina	EA-ativo após 24 meses de anti-TNF		P ¹	EA-controle		P ²	Controle Saudável		P ³
	Respondedor ASDAS-PCR < 2,1 (n=27)	Não Respondedor ASDAS-PCR ≥ 2,1 (n=20)		ASDAS-PCR < 2,1 (n=21)	(n=47)				
IL-17A pg/mL*	2,17 (0,86-3,99)	1,04 (0,66-1,82)	0,03	1,29 (1,10-2,17)	1,57 (1,04-2,17)	0,07	1,57 (1,04-2,17)	0,23	
IL-22 ng/mL*	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-0,00)	0,99	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-0,00)	0,71	0,00 (0,00-0,00)	0,64	
IL-23 ng/mL*	0,09 (0,03-0,21)	0,05 (0,02-0,13)	0,49	0,02 (0,01-0,06)	0,02 (0,00-0,05)	0,01	0,02 (0,00-0,05)	<0,001	
PGE2 pg/mL*	13,03 (4,30-56,59)	45,17 (10,92-93,76)	0,10	8,13 (4,17-23,07)	7,66 (3,30-30,32)	0,11	7,66 (3,30-30,32)	0,33	

*Valores expressos em mediana e intervalo interquartil 25-75% (IIQ); EA = Espondilite anquilosante; ASDAS-PCR = C-reactive protein - Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score; IL= Interleucina; PGE2 = Prostaglandina E2. P¹= EA-ativo respondedor à anti-TNF após 24 meses vs não respondedor; P²= EA-ativo respondedor à anti-TNF após 24 meses vs EA-controle com ASDAS-PCR<2,1; P³: EA-ativo respondedor à anti-TNF após 24 meses vs controle saudável.

4.5 Pesquisa das Correlações Entre os Parâmetros Clínicos, Marcadores de Atividade Inflamatória e Níveis Plasmáticos das Interleucinas no Grupo EA-ativo

Foi observada uma correlação significativa entre os níveis plasmáticos de IL-23 e IL-17A nos tempos basal ($r=0,64$, $p<0,001$), 12 meses ($r=0,47$, $p=0,001$) e 24 meses ($r=0,61$, $p<0,001$). A IL-23 também se correlacionou positivamente com a PGE2 nos tempos 12 meses ($r=0,45$, $p=0,001$) e 24 meses ($r=0,33$, $p=0,02$). A PGE2, por sua vez, correlacionou-se positivamente em 24 meses com o VHS ($r=0,32$, $p=0,03$), o PCR ($r=0,32$, $p=0,03$) e com o ASDAS-PCR ($r=0,28$, $p=0,04$).

4.6 Progressão Radiológica no Grupo EA-ativo

Foi observado um aumento no escore mSASSS durante os dois anos de seguimento do grupo EA-ativo (mSASSS basal $15,83 \pm 18,73$ vs $19,49 \pm 19,61$ unidades, $p<0,001$) (Tabela 3). Vinte e sete (57,5%) pacientes do grupo EA-ativo apresentaram um aumento no escore mSASSS $\geq$ duas unidades em 24 meses e foram considerados progressores. Este grupo mostrou um aumento médio no mSASSS de $6,35 \pm 5,88$ unidades, com um escore inicial de $18,37 \pm 17,93$ unidades e um escore final de $24,44 \pm 18,61$ unidades ($p<0,001$). O grupo de não progressores (20 pacientes) demonstrou um aumento médio de $0,67 \pm 0,86$ unidades, com um mSASSS inicial de $12,40 \pm 19,07$ e um escore final de $12,80 \pm 19,40$ unidades ($p>0,05$). No tempo basal, os grupos de progressores e não progressores possuíam níveis semelhantes de mSASSS ($p>0,05$).

A análise comparativa entre os níveis plasmáticos das citocinas estudadas, marcadores de atividade inflamatória e parâmetros clínicos no tempo basal, 12 meses e 24 meses e a variação destes parâmetros após 12 e 24 meses de tratamento não conseguiu identificar nenhum fator de risco para progressão radiológica nestes pacientes ($p>0,05$).

5 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que a persistência de níveis plasmáticos elevados da IL-23 e da PGE-2 no grupo EA ativo é independente do bloqueio do TNF e da melhora clínica destes pacientes, corroborando a relevância destas interleucinas na patogênese desta doença.

O seguimento longitudinal por dois anos do grupo EA-ativo e a comparação com o grupo EA-controle e controles saudáveis foi o grande diferencial desse estudo, pois permitiu analisar de forma mais aprimorada a relação do eixo da IL-23/IL-17 com os parâmetros utilizados na prática clínica tanto no pré, quanto no pós-tratamento com anti-TNF.

Em relação aos níveis de IL-23, os resultados corroboram com os achados da literatura. Estudos prévios já haviam demonstrado maiores níveis desta interleucina em pacientes com EA quando comparado aos controles saudáveis, sugerindo o papel desta citocina na fisiopatologia da EA³⁸⁻⁴⁰. Foram encontrados no presente estudo maiores níveis de IL-23 no grupo EA-ativo quando comparado com o grupo EA-controle como já descrito por Chen *et al.*³⁸ em 2012. Dois outros estudos encontraram dados conflitantes sobre a IL-23 na EA, mas a análise destes não incluiu níveis distintos de atividade e avaliação longitudinal pós-tratamento^{41,42}. Deve-se considerar ainda que Melis *et al.*⁴¹ utilizaram uma coorte mista (artrite reumatoide, artrite psoriásica, EA e EpA indiferenciada) com somente uma pequena amostra de pacientes com EA.

Além disso, a avaliação longitudinal e concomitante das interleucinas IL-23, IL-17A, IL-22 e da PGE2 em pacientes com EA no pré e pós-tratamento com anti-TNF possibilitou uma oportunidade única de descrever como essas citocinas interagem com a via do TNF. A falta de informação acerca das medicações em uso e a análise unicamente transversal dos estudos anteriores podem ter dificultado a correta compreensão sobre o papel destas citocinas na EA³⁸⁻⁴⁰. O único estudo que considerou a relação do eixo da IL-23/IL-17 em associação com a terapia anti-TNF foi feito com uma amostra pequena de sete pacientes com EA e foi de curta duração (12 semanas)⁴¹.

Pode-se considerar como uma limitação do estudo a falta da dosagem destas citocinas em amostra tecidual. É sabido que algumas citocinas, como a IL-22, podem ter maior produção *in loco*, dessa forma, a dosagem plasmática da mesma pode não refletir uma intensa atividade tecidual^{25,43}. Além disso, é necessário considerar que os dados do presente estudo possam ter subestimados os níveis de IL-17A e IL-22 uma vez que uma quantidade significativa das amostras estava abaixo do limite mínimo de detecção (64% e 92% respectivamente). De fato, uma detecção confiável dos níveis plasmáticos da IL-22 e da IL-17A ainda é um desafio. Ainda em relação as amostras teciduais, um estudo em modelo murino descreveu a presença de células responsivas à IL-23 (expressavam IL-23R) na interface entre tendão/osso (êntese), sendo que, a exposição à níveis elevados de IL-23, causou o desenvolvimento de alterações na êntese e no periósteo semelhantes às encontradas em pacientes com EpA²⁵. Além disso, uma pesquisa prévia que utilizou biópsia de íleo em pacientes com EA já

descreveu maiores níveis locais de IL-23 na EA quando comparado com controles saudáveis⁴³.

Os dados desta coorte revelaram de forma pioneira a participação da PGE2 no processo inflamatório da EA. O grupo EA-ativo possuía níveis mais elevados dessa interleucina do que os encontrados no grupo CS e no grupo EA-controle (escores de uso de AINH equivalentes) e este último com níveis comparáveis aos controles saudáveis. Além disso, o seguimento de dois anos do grupo EA-ativo revelou a manutenção dos elevados níveis plasmáticos da IL-23 e PGE2 apesar da aparente melhora clínica e laboratorial apresentada após o tratamento com anti-TNF. Este dado sugere que a terapia anti-TNF provavelmente não bloqueia de forma completa todo o processo inflamatório.

Talvez a PGE tenha um papel maior na EA do que a simples reação inflamatória em si^{16,17,44,45}. Um estudo já descreveu a maior secreção de IL-23 e a indução de uma resposta Th17 via PGE2 após estímulo com β -glucan¹⁶. Há evidências de literatura que as prostaglandinas, particularmente a PGE2, possuem um papel importante no metabolismo ósseo (com efeito *dual*, anabólico e reabsortivo) e na diferenciação das células tendíneas^{17,18,45,46}. Corroborando, estudos genéticos também apontam para o papel das prostaglandinas na EA^{47,48}. Já foram descritas a correlação entre o gene que codifica o receptor 4 da PGE2 (PTGER4) com maior susceptibilidade e maior gravidade na EA⁴⁷. Além disso foi descrito a associação do gene que codifica a COX-1 (*Prostaglandin-endoperoxide synthase 1* [PTGS1]) com a menor progressão do mSASSS⁴⁸. A

demonstração dos maiores níveis da PGE2 no grupo EA-ativo, sua correlação com a IL-23, com os parâmetros clínicos de atividade de doença (ASDAS-PCR) e com os marcadores inflamatórios (VHS e PCR), corrobora com a hipótese da interação da PGE2 com o eixo da IL-23/IL-17 na EA.

Ao contrário do que se esperava, os dados deste trabalho não mostraram elevados níveis plasmáticos de IL-17 e IL-22 no grupo EA-ativo. No entanto, foi encontrada uma correlação entre os níveis plasmáticos de IL-23 e IL-17 no grupo EA-ativo nos tempos basal, 12 meses e 24 meses após tratamento. Além de estimular a resposta Th17 com a maior expressão da família IL-17 (A-F), já foi descrita a capacidade da IL-23 em estimular células da imunidade inata a produzir outras citocinas como o TNF e a IL-22^{15,49}. Estudos prévios também encontraram aumento das células Th17 circulantes e aumento dos níveis da IL-17 em pacientes com EA^{8,38-40,50}.

Curiosamente, foram encontrados maiores níveis de IL-17A no grupo de pacientes que responderam à terapia anti-TNF. Sabe-se que a IL-17A é um potente indutor da produção de TNF, assim sendo, é possível considerar que pacientes com EA com elevação da IL-17 possam ter maiores níveis de TNF e assim, uma possível melhor resposta ao seu bloqueio⁴⁹. De qualquer forma, essa sugestão deve ser interpretada com cautela já que, estatisticamente, os dados não permitiram identificar nenhum fator preditor de resposta às medicações anti-TNF.

Quanto à progressão radiológica, alguns dados prévios descreveram alta variabilidade no percentual de progressores e não progressores⁵¹⁻⁵³. Já foi sugerido que a presença de sindesmófitos no tempo basal, o sexo masculino,

tabagismo, presença do HLA-B27, maior tempo de doença e a elevação das provas de atividade inflamatória (PCR) seriam possíveis fatores de risco para a maior formação óssea na EA⁵¹⁻⁵⁴. Embora o atual estudo tenha contemplado a maioria destas variáveis, os dados não permitiram identificar possíveis fatores de risco relacionados à progressão radiográfica no grupo EA-ativo. Este fato corrobora a possibilidade de que a formação óssea seja de origem multifatorial. Além disso, deve-se considerar que o número de amostra do presente estudo possa não ter sido suficiente para análise desse desfecho.

A moderada correlação encontrada entre a IL-23 e a PGE2, a elevação persistente das mesmas durante o seguimento longitudinal do grupo EA-ativo e a significativa progressão radiográfica deste grupo sugerem que os parâmetros clínicos atuais para avaliação da atividade de doença e os marcadores atuais de atividade inflamatória (VHS e PCR) possam não ser suficientes para nortear um programa terapêutico baseado em metas (*treat-to-target*) na EA^{55,56}.

Mesmo os pacientes do grupo EA-ativo que responderam ao uso de anti-TNF (ASDAS-PCR < 2,1) mantiveram elevados níveis de IL-23. Esse dado sugere que o bloqueio do TNF age em uma via final de uma cascata inflamatória que tem no seu início a maior produção da IL-23 e da IL-17. Dessa forma, a ausência de bloqueio do início da cascata inflamatória pode ser uma explicação plausível do motivo pelo qual ainda não se conseguiu conter de forma eficaz a progressão radiológica.

Outro ponto negativo a ser considerado, foi a falta de um exame de imagem mais acurado, como a ressonância nuclear magnética pré e pós-

tratamento no seguimento do grupo EA-ativo. Este recurso poderia ter trazido informações mais precisas sobre o comportamento do processo inflamatório ósseo local.

Mais recentemente, novas medicações que bloqueiam essas citocinas, como ustequinumabe, um anticorpo monoclonal contra a unidade P40 (comum à IL-23 e IL-12) e o secuquinumabe, um anticorpo monoclonal contra a IL-17A foram aprovados para o tratamento das EpA no Brasil. O uso dessas novas medicações vem como uma nova opção de tratamento, permitindo um bloqueio mais acima na cascata inflamatória do que o feito atualmente com o uso dos anti-TNF^{5,6}. É possível que o seguimento a longo prazo desses pacientes e os consequentes estudos possam preencher as lacunas do conhecimento no que concerne ao real papel dessas vias inflamatórias na etiopatogenia e na progressão radiográfica vista na EA.

6 CONCLUSÃO

O estudo traz dados pioneiros sobre o comportamento do eixo da IL-23/IL-17 e da PGE2 em pacientes com EA no pré e pós tratamento com os anti-TNF. Além disso, os resultados mostraram que essa via continua ativada durante todo o seguimento de dois anos, sugerindo que a mesma não é influenciada pelo bloqueio do TNF apesar da melhora dos parâmetros clínicos e dos marcadores tradicionais de atividade inflamatória.

7 ANEXOS

Anexo A - Aprovação da CAPPesq

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

Nº Protocolo: 1298/06

Título: Implantação de centro multidisciplinar de dispensação de medicação de alto custo (CEMDIMAC)

Pesquisador Responsável: Eloisa Silva Dutra de Oliveira Bonfá

Pesquisador Executante: Evandro A. Rivitti, Paulo Lotufo, Ieda M. M. Laurindo, Sérgio C. Kowalski

Departamento: CLÍNICA MÉDICA

O Coordenador da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA ad referendum** em 15/01/2013, do(s) documento(s) abaixo mencionado(s):

•Carta não-datada: Solicitação de prorrogação do projeto para mais 5 anos e inclusão dos pesquisadores Karina R. Bonfiglioli, Fernando H.C. de Souza, Mariana G. Waisberg, Ana L. Calish, Clovis A. A. Silva, Nadia Aikawa, Fernanda M. Milanez e Célio R. Gonçalves + Relatório parcial e adendo "O PAPEL DA IL-17, IL-23, TNF- α , PGE-2 E ESCLEROSTINA NA ESPONDILITE ANQUILOSANTE, CORRELAÇÃO COM O USO DE AGENTES ANTI-TNF- α E COM A PROGRESSÃO RADIOLÓGICA" para novas coletas

•Carta não-datada: Resposta às pendências: TCLE's corrigidos

•Carta datada de 12.12.12: Adendo "EFETIVIDADE DO RASTREAMENTO E TRATAMENTO DE TUBERCULOSE LATENTE EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATÓIDE EXPOSTOS A INIBIDORES DO TNF-ALFA, RESIDENTES EM ÁREA ENDÊMICA"

CAPPesq, 15 de janeiro de 2013

PROF. DR. LUIZ EUGÊNIO GARCEZ LEME
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Rua Dr. Ovidio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar - CEP 05403-010 - São Paulo - SP.
55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

Anexo B - Termo de consentimento livre e esclarecido - Grupo EA-Ativo

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

GRUPO 1: Espondilite Anquilosante em uso de agente Anti-TNF

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: .....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : .M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....
BAIRRO: ..... CIDADE .....
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....
2. RESPONSÁVEL LEGAL .....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :..... SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....
ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....
BAIRRO: ..... CIDADE .....
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA “O PAPEL DA IL-17, IL-23, TNF- α , PGE-2 E ESCLEROSTINA NA ESPONDILITE ANQUILOSANTE, CORRELAÇÃO COM O USO DE AGENTES ANTI- TNF- α E COM A PROGRESSÃO RADIOLÓGICA” (Adendo ao protocolo 1298/06 - Implantação de centro multidisciplinar de dispensação de medicação de alto custo).

PESQUISADOR PRINCIPAL: Eloisa Silva Dutra de Oliveira Bonfa
CARGO/FUNÇÃO: Professor Titular
INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 42.708/SP
UNIDADE DO HCFMUSP: Clínica Médica - Disciplina de Reumatologia

PESQUISADOR EXECUTANTE: Fernanda Manente Mllanez
CARGO/FUNÇÃO: Médica Voluntária no CEDMAC
INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 122.142/SP.
UNIDADE DO HCFMUSP: Clínica Médica - Disciplina de Reumatologia

PESQUISADOR AUXILIAR: Carla Gonçalves Schahin Saad
CARGO/FUNÇÃO: Médica do CEDMAC
INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 104518/ SP
UNIDADE DO HCFMUSP: Clínica Médica - Disciplina de Reumatologia

PESQUISADOR AUXILIAR: Celio Roberto Goncalves
CARGO/FUNÇÃO: Médico Assistente Ambulatório de Espondiloartrites
INSCRIÇÃO Nº /SP 20.383/SP
UNIDADE DO HCFMUSP: Clínica Médica - Disciplina de Reumatologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	☒	RISCO MÉDIO	☐
RISCO BAIXO	☐	RISCO MAIOR	☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 2 anos

5. Justificativa e objetivos da pesquisa:

Você possui uma doença chamada Espondilite Anquilosante e para o controle da inflamação e das dores você faz uso de forma regular de medicações chamadas Anti-TNFalfa (infiximab, etanercept ou adalimumab) e seguimento no CEDMAC - Centro de Dispensação de Medicação de alto Custo.

Você está sendo convidado a participar de um estudo com pacientes portadores da sua doença (Espondilite Anquilosante - EA) que tem como objetivo entender melhor como é o comportamento dessa doença nos ossos. Nós médicos sabemos que a EA pode afetar o osso causando o que chamamos de ANQUILOSE. A anquilose é a criação de pontes ósseas que podem causar a redução dos movimentos da coluna. O motivo porque a anquilose acontece ainda não é bem compreendido por isso estamos estudando melhor esse assunto.

No nosso sangue circulam várias substancias que chamamos de interleucinas que são as responsáveis por gerar a dor e a inflamação que você sente na coluna e nas juntas. Nós acreditamos que elas também possam ter relação com o comprometimento ósseo e o desenvolvimento da aquilose. Dessa forma, desenvolvemos um protocolo de pesquisa intitulado **“O PAPEL DA IL-17, IL-23, TNF- α , PGE-2 E ESCLEROSTINA NA ESPONDILITE ANQUILOSANTE, CORRELAÇÃO COM O USO DE AGENTES ANTI- TNF- α E COM A PROGRESSÃO RADIOLÓGICA.”**

Nesse estudo temos como objetivo estudar as interleucinas em uma amostra de sangue e cruzar esses achados com seus dados clínicos e de radiografias. Como você já sabe, a cada consulta, antes da infusão ou aplicação do seu medicamento anti-TNFalfa (infiximab, etanercept ou adalimumab) você responde uma série de perguntas relacionadas a sua doença e aos seus sintomas, logo após você é examinado, colhe sangue, recebe a medicação e é liberado. Você já realiza, também a cada dois anos radiografias da sua coluna para pesquisa da anquilose.

Para o presente estudo estamos solicitando a sua autorização para coleta dos seus dados clínicos (exames clínicos e radiografias) e solicitamos também, sua autorização para uso de uma das suas amostras de sangue. Seu sigilo será preservado, pois o sangue é identificado através de letras e números sendo que somente o médico pesquisador terá acesso a identidade do mesmo.

Não será feito nenhum exame ou procedimento a mais do que você já realiza nas suas consultas de rotina, por esse motivo, o presente estudo não te oferece nenhum risco, nem desconforto. Você não terá qualquer benefício direto com estudo, mas acreditamos que com seu ato de ceder seus dados e sua amostra de sangue você poderá ajudar no estudo e no entendimento do que acontece na sua doença.

Você tem a liberdade de decidir se quer ou não ceder seus dados e sua amostra de sangue para o presente estudo. Independente de você decidir (se quer ou não participar) isso não vai levar a nenhuma alteração no seu tratamento ou na maneira como você é

tratado na instituição. Todos os dados levantados serão usados somente para essa pesquisa e nós garantimos o completo sigilo das informações.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dra. Fernanda Manente Milanez que pode ser encontrada no endereço Av. Dr. Arnaldo, 455 - prédio dos ambulatorios (PAMB) ou no próprio CDMAC em horário comercial ou nos Telefone(s) 2661-8023 2662-8024 ou ainda no e-mail femanente@terra.com.br. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) - Av. Dr. Arnaldo, 455 – Instituto Oscar Freire – 2º andar– tel: 3061-8004, FAX: 3061-8004 - E-mail: cep.fm@usp.br.

É garantida sua liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente. Você tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores sendo que os dados podem ser enviados a você, caso seja solicitado.

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

Há o compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo " **O PAPEL DA IL-17, IL-23, TNF- α , PGE-2 E ESCLEROSTINA NA ESPONDILITE ANQUILOSANTE, CORRELAÇÃO COM O USO DE AGENTES ANTI- TNF- α E COM A PROGRESSÃO RADIOLÓGICA.**

Eu discuti com a Dra. **Fernanda Manente Milanez** (CRM-SP 122.142) sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representantelegal   Data   /   /

Anexo C - Termo de consentimento livre e esclarecido - Grupo EA-controle

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO GRUPO 2: Espondilite Anquilosante - Sem Anti-TNFalfa (EA-controle)

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: .....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : .M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....
BAIRRO: ..... CIDADE .....
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....
2. RESPONSÁVEL LEGAL .....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE : ..... SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....
ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....
BAIRRO: ..... CIDADE .....
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA **“O PAPEL DA IL-17, IL-23, TNF- α , PGE-2 E ESCLEROSTINA NA ESPONDILITE ANQUILOSANTE, CORRELAÇÃO COM O USO DE AGENTES ANTI- TNF- α E COM A PROGRESSÃO RADIOLÓGICA” (Adendo ao protocolo 1298/06 - Implantação de centro multidisciplinar de dispensação de medicação de alto custo).**

PESQUISADOR PRINCIPAL: Eloisa Silva Dutra de Oliveira Bonfa
CARGO/FUNÇÃO: Professor Titular
INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 42.708/SP
UNIDADE DO HCFMUSP: Clínica Médica - Disciplina de Reumatologia

PESQUISADOR EXECUTANTE: Fernanda Manente Millanez
CARGO/FUNÇÃO: Médica Voluntária no CEDMAC
INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 122.142/SP.
UNIDADE DO HCFMUSP: Clínica Médica - Disciplina de Reumatologia

PESQUISADOR AUXILIAR: Carla Gonçalves Schahin Saad
CARGO/FUNÇÃO: Médica do CEDMAC
INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 104518/ SP
UNIDADE DO HCFMUSP: Clínica Médica - Disciplina de Reumatologia

PESQUISADOR AUXILIAR: Celio Roberto Goncalves
CARGO/FUNÇÃO: Médico Assistente Ambulatório de Espondiloartrites
INSCRIÇÃO Nº /SP 20.383/SP
UNIDADE DO HCFMUSP: Clínica Médica - Disciplina de Reumatologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	☒	RISCO MÉDIO	☐
RISCO BAIXO	☐	RISCO MAIOR	☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 2 anos

5. Justificativa e objetivos da pesquisa:

Você possui uma doença chamada Espondilite Anquilosante e para o controle da inflamação e das dores você faz uso de forma regular de algumas medicações como Metotrexato, Sulfassalzina, Leflunomida e anti-inflamatórios (diclofenaco, nimesulida, meloxicam, celebra, etc.).

Você está sendo convidado a participar de um estudo com pacientes portadores da sua doença (Espondilite Anquilosante - EA) que tem como objetivo entender melhor como é o comportamento dessa doença nos ossos. Nós médicos sabemos que a EA pode afetar o osso causando o que chamamos de ANQUILOSE. A anquilose é a criação de pontes ósseas que podem causar a redução dos movimentos da coluna. O motivo porque a anquilose acontece ainda não é bem compreendido por isso nós estamos estudando melhor esse assunto.

No nosso sangue circulam várias substâncias que chamamos de interleucinas que são as responsáveis por gerar a dor e a inflamação que você sente na coluna e nas juntas. Nós acreditamos que elas também possam ter relação com o comprometimento ósseo e o desenvolvimento da anquilose. Dessa forma, desenvolvemos um protocolo de pesquisa intitulado **“O PAPEL DA IL-17, IL-23, TNF- α , PGE-2 E ESCLEROSTINA NA ESPONDILITE ANQUILOSANTE, CORRELAÇÃO COM O USO DE AGENTES ANTI- TNF- α E COM A PROGRESSÃO RADIOLÓGICA. (Adendo ao protocolo 1298/06).**

Nesse estudo temos como objetivo estudar as interleucinas em uma amostra de sangue e cruzar esses achados com seus dados clínicos e de radiografias. Como você já sabe, a cada consulta que você tem no ambulatório, você responde uma série de perguntas relacionadas a sua doença e aos seus sintomas, logo após você é examinado, e todos os seus dados são arquivados no prontuário eletrônico. Você já realiza, também a cada 2 anos radiografias da sua coluna para pesquisa da anquilose.

Para o presente estudo estamos solicitando a sua colaboração para responder questionários sobre a sua doença, autorização para ver e coletar os dados clínicos que já estão arquivados no seu prontuário eletrônico e para ver as suas radiografias que você já fez rotineiramente. Além disso, precisaremos COLETAR uma amostra do seu sangue. A coleta do seu sangue é importante para que possamos fazer o estudo das interleucinas (substâncias responsáveis pela dor e pela inflamação que você sente nas juntas e na coluna).

O Sangue colhido será congelado e armazenado no laboratório da disciplina de REUMATOLOGIA / LIM 17, ficando seu uso sob responsabilidade dessa disciplina e será usado exclusivamente para fins dessa pesquisa. Esse laboratório, no qual seu sangue ficará estocado se chama BIORREPOSITORIO e segue as recomendações de armazenagem, sigilo e descarte recomendados pelo MINISTERIO DA SAUDE. Seu sigilo será preservado, pois o sangue é identificado através de letras e números sendo que somente o médico pesquisador terá acesso a identidade do mesmo.

Não será feito nenhum exame ou procedimento a mais do que o que você já realiza nas suas consultas de rotina e da coleta UNICA de sangue (uma vez só). Por esse motivo, o

presente estudo não te oferece risco, somente um pequeno desconforto para a coleta de sangue, mas que será ÚNICA. Você não terá qualquer benefício direto com estudo, mas acreditamos que com seu ato de ceder seus dados e sua amostra de sangue você poderá ajudar no estudo e no entendimento da Anquilose que acontece na sua doença.

Você tem a liberdade de decidir se quer ou não ceder seus dados de prontuário e sua amostra de sangue para o presente estudo. Independente de você decidir (se quer ou não participar) isso não vai levar a nenhuma alteração no seu tratamento ou na maneira como você é tratado na instituição. Todos os dados levantados serão usados somente para essa pesquisa e nós garantimos o completo sigilo das informações.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dra. Fernanda Manente Milanez que pode ser encontrada no endereço Av. Dr. Arnaldo, 455 - prédio dos ambulatorios (PAMB) ou no próprio CDMAC em horário comercial ou nos Telefone(s) 2661-8023 2662-8024 ou ainda no e-mail femanente@terra.com.br. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) - Av. Dr. Arnaldo, 455 – Instituto Oscar Freire - 2º andar - tel: 3061-8004, FAX: 3061-8004 - E-mail: cep.fm@usp.br.

É garantida sua liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente. Você tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores sendo que os dados podem ser enviados a você, caso seja solicitado.

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa. Há o compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo **“O PAPEL DA IL-17, IL-23, TNF- α , PGE-2 E ESCLEROSTINA NA ESPONDILITE ANQUILOSANTE, CORRELAÇÃO COM O USO DE AGENTES ANTI- TNF- α E COM A PROGRESSÃO RADIOLÓGICA.” (Adendo ao protocolo 1298/06).**

Eu discuti com a Dra. **Fernanda Manente Milanez** (CRM-SP 122.142) sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concorro voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste serviço.

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____ / ____ / ____

Anexo D - Termo de consentimento livre e esclarecido - Controles Saudáveis

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

GRUPO 3: Controles Saudáveis

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: .....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....
BAIRRO: ..... CIDADE .....
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....
2. RESPONSÁVEL LEGAL .....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE : ..... SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....
ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....
BAIRRO: ..... CIDADE .....
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA “O PAPEL DA IL-17, IL-23, TNF- α , PGE-2 E ESCLEROSTINA NA ESPONDILITE ANQUILOSANTE, CORRELAÇÃO COM O USO DE AGENTES ANTI- TNF- α E COM A PROGRESSÃO RADIOLÓGICA” (Adendo ao protocolo 1298/06 - Implantação de centro multidisciplinar de dispensação de medicação de alto custo).

PESQUISADOR PRINCIPAL: Eloisa Silva Dutra de Oliveira Bonfa
CARGO/FUNÇÃO: Professor Titular
INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 42.708/SP
UNIDADE DO HCFMUSP: Clínica Médica - Disciplina de Reumatologia

PESQUISADOR EXECUTANTE: Fernanda Manente Millanez
CARGO/FUNÇÃO: Médica Voluntária no CEDMAC
INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 122.142/SP.
UNIDADE DO HCFMUSP: Clínica Médica - Disciplina de Reumatologia

PESQUISADOR AUXILIAR: Carla Gonçalves Schahin Saad
CARGO/FUNÇÃO: Médica do CEDMAC
INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 104518/ SP
UNIDADE DO HCFMUSP: Clínica Médica - Disciplina de Reumatologia

PESQUISADOR AUXILIAR: Celio Roberto Goncalves
CARGO/FUNÇÃO: Médico Assistente Ambulatório de Espondiloartrites
INSCRIÇÃO Nº /SP 20.383/SP
UNIDADE DO HCFMUSP: Clínica Médica - Disciplina de Reumatologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	☒	RISCO MÉDIO	☐
RISCO BAIXO	☐	RISCO MAIOR	☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 2 anos

5. Justificativa e objetivos da pesquisa:

Você é um adulto saudável e felizmente não possui nenhuma doença. No entanto, existe uma doença (um tipo de reumatismo) chamada Espondilite Anquilosante que produz quadro crônico de dor e inflamação em coluna e nas articulações geralmente de homens jovens, da sua faixa etária.

Além da dor e da inflamação a Espondilite Anquilosante pode gerar anquilose da coluna dos pacientes acometidos. A anquilose é a formação de pontes ósseas na coluna que gera a redução dos movimentos (a coluna fica rígida, com menos movimento). O motivo porque ela acontece ainda não é bem compreendido por isso nós estamos estudando melhor esse assunto.

Você está sendo convidado a participar COMO GRUPO CONTROLE SAUĐAVEL de um estudo com pacientes portadores da sua doença (Espondilite Anquilosante - EA) que tem como objetivo entender melhor como é o comportamento dessa doença nos ossos.

No nosso sangue circulam várias substâncias que chamamos de interleucinas que são as responsáveis por gerar a dor e a inflamação que esses pacientes sentem na coluna e nas juntas. Nós acreditamos que elas também possam ter relação com o comprometimento ósseo e o desenvolvimento da anquilose. Dessa forma, desenvolvemos um protocolo de pesquisa intitulado **“O PAPEL DA IL-17, IL-23, TNF- α , PGE-2 E ESCLEROSTINA NA ESPONDILITE ANQUILOSANTE, CORRELAÇÃO COM O USO DE AGENTES ANTI- TNF- α E COM A PROGRESSÃO RADIOLÓGICA. (Adendo ao protocolo 1298/06).**

Nesse estudo temos como objetivo estudar as interleucinas em uma amostra de sangue e cruzar esses achados com dados clínicos e de radiografias de pacientes com Espondilite Anquilosante.

Para o presente estudo estamos solicitando a sua autorização para COLETAR uma amostra do seu sangue. A coleta do seu sangue é importante para que possamos fazer o estudo das interleucinas e comparar os achados dos indivíduos saudáveis com os portadores da doença Espondilite Anquilosante. Será realizada a coleta de uma ÚNICA amostra de sangue (5ml) para a dosagem das interleucinas. Você não será submetido a nenhum procedimento experimental nem ao uso de medicação. Por esse motivo, o presente estudo não te oferece risco, somente um pequeno desconforto para a coleta de sangue, mas que será ÚNICA. O Sangue colhido será congelado e armazenado no laboratório da disciplina de REUMATOLOGIA / LIM 17, ficando seu uso sob responsabilidade dessa disciplina e será usado exclusivamente para fins dessa pesquisa. Esse laboratório, no qual seu sangue ficará estocado se chama BIORREPOSITORIO e segue as recomendações de armazenagem, sigilo e descarte recomendados pelo MINISTÉRIO DA SAÚDE. Seu sigilo será preservado, pois o sangue é identificado através de letras e números sendo que somente o médico pesquisador terá acesso a identidade do mesmo.

Você não terá qualquer benefício direto com estudo, mas acreditamos que com seu ato de ceder seus dados e sua amostra de sangue você poderá ajudar no estudo e no entendimento da Anquilose que acontece nos pacientes com Espondilite Anquilosante.

Você tem a liberdade de decidir se quer ou não doar sua amostra de sangue para o presente estudo e não haverá nenhum tipo de punição ou represália caso você opte por não participar do estudo. Todos os dados levantados serão usados somente para essa pesquisa e nós garantimos o completo sigilo das informações.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dra. Fernanda Manente Milanez que pode ser encontrada no endereço Av. Dr. Arnaldo, 455 - prédio dos ambulatorios (PAMB) ou no próprio CDMAC em horário comercial ou nos Telefone(s) 2661-8023 ou 2661-8024 ou ainda no e-mail femanente@terra.com.br. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) - Av. Dr. Arnaldo, 455 - Instituto Oscar Freire - 2º andar - tel: 3061-8004, FAX: 3061-8004 - E-mail: cep.fm@usp.br.

É garantida sua liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente. Você tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores sendo que os dados podem ser enviados a você, caso seja solicitado.

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Há o compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo **“O PAPEL DA IL-17, IL-23, TNF- α , PGE-2 E ESCLEROSTINA NA ESPONDILITE ANQUILOSANTE, CORRELAÇÃO COM O USO DE AGENTES ANTI- TNF- α E COM A PROGRESSÃO RADIOLÓGICA. (Adendo ao protocolo 1298/06).**

Eu discuti com a Dra. **Fernanda Manente Milanez** (CRM-SP 122.142) sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representantelegal

Data ____ / ____ / ____

Anexo E - BASDAI (Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index)

BASDAI (Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index)

Coloque uma marca em cada linha abaixo indicando sua resposta para cada questão, relacionada à **semana passada**.

1. Como você descreveria o grau de fadiga ou cansaço que você tem tido?

0 10
Nenhum Intenso

2. Como você descreveria o grau total de dor no pescoço, nas costas e no quadril relacionada à sua doença?

0 10
Nenhum Intenso

3. Como você descreveria o grau total de dor e edema (inchaço) nas outras articulações sem contar com pescoço, costas e quadril?

0 10
nenhum Intenso

4. Como você descreveria o grau total de desconforto que você teve em regiões do corpo dolorosas ao toque ou à compressão?

0 10
Nenhum Intenso

5. Como você descreveria a intensidade da rigidez matinal que você tem tido à partir da hora em que você acorda?

0 10
Nenhum Intenso

6. Quanto tempo dura sua rigidez matinal a partir do momento em que você acorda?

0 30 min 1 h 1h30 2 h

BASDAI = Soma dos valores em centímetros das questões 1, 2, 3, 4 e a média dos valores da 5 e 6, dividindo este total por 5 (resultados de 0-10).

Anexo F - ASDAS - PCR (C-reactive protein -Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score)

Para o cálculo, foi utilizada a calculadora *on line* do grupo ASAS disponível em:

http://www.asas-group.org/clinical-instruments/asdas_calculator/asdas.html

- FÓRMULA DO ASDAS-PCR

$$\text{ASDAS-PCR} = (0,12 \times \text{Dor na Coluna Global}) + (0,06 \times \text{Duração da Rigidez Matinal}) + (0,11 \times \text{Avaliação Global do Paciente}) + (0,07 \times \text{Dor/Inflamação Periférica}) + [0,58 \times \text{Ln (PCR+1)}]$$

- VALORES DE CORTE

- RESPOSTA CLÍNICA

Anexo G - BASFI (*The Bath Ankylosing Spondylitis Funcional Index*)

Faça uma marca em cada linha abaixo de cada pergunta indicando o seu grau de capacidade para realizar as seguintes atividades durante a **última semana**.

1. Vestir meias ou meia-calça sem ajuda ou auxílio de aparelhos.

0 10
Fácil Impossível

2. Curvar o corpo da cintura para cima para pegar uma caneta no chão sem o uso de um instrumento de auxílio.

0 10
Fácil Impossível

3. Alcançar uma prateleira alta sem ajuda ou auxílio de um instrumento.

0 10
Fácil Impossível

4. Levantar-se de uma cadeira sem braços da sala de jantar sem usar suas mãos ou qualquer outro tipo de ajuda.

0 10
Fácil Impossível

5. Levantar-se quando deitado de costas no chão sem ajuda.

0 10
Fácil Impossível

6. Ficar em pé sem ajuda por 10 minutos sem desconforto.

0 10
Fácil Impossível

7. Subir 12 a 15 degraus sem usar o corrimão ou outra forma de apoio (andador). Um pé em cada degrau.

0 10
Fácil Impossível

8. Olhar para trás, virando a cabeça sobre o seu ombro sem virar o corpo.

0 10
Fácil Impossível

9. Fazer atividades que exijam esforço físico, isto é, fisioterapia, jardinagem ou esporte.

10. Ter um dia repleto de atividades, seja em casa ou no trabalho.

BASFI = Somatório dos valores em centímetros dividido por 10 (resultados entre 0-10)

Anexo H - BASMI (The Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index)

	0	1	2
Distância parede-tragus	□ <15 cm	□ 15~30 cm	□ >30 cm
Flexão lombar (Schober modificado)	□ >4 cm	□ 2~4 cm	□ < 2 cm
Rotação cervical	□ > 70°	□ 20~70°	□ < 20°
Flexão lombar lateral	□ > 10 cm	□ 5~10 cm	□ <5 cm
Distância intermaleolar	□ >100 cm	□ 70~100 cm	□ <70 cm

BASMI = Somatória dos valores estratificados em cada coluna (resultados entre 0-10).

Anexo I - ASQoL (The Ankylosing Spondylitis Quality of Life)

Você encontrará abaixo algumas frases que foram ditas por pessoas que têm Espondilite Anquilosante. Por favor, leia cada frase com cuidado. Nós gostaríamos que você marcasse “sim” se você sente que a frase se aplica a você, e “não” se ela não se aplica a você. Marque uma única resposta que melhor se aplica a você **neste momento**.

1. Minha doença limita os lugares que eu posso ir.	sim ( ) não ( )
2. Às vezes tenho vontade de chorar.	sim ( ) não ( )
3. Eu tenho dificuldade para me vestir	sim ( ) não ( )
4. Eu tenho dificuldade para fazer os serviços de casa.	sim ( ) não ( )
5. É impossível dormir.	sim ( ) não ( )
6. Eu sou incapaz de participar de atividades com a família ou amigos.	sim ( ) não ( )
7. Estou cansado(a) o tempo todo.	sim ( ) não ( )
8. Eu tenho que ficar parando o que estou fazendo para descansar.	sim ( ) não ( )
9. Eu tenho dores insuportáveis.	sim ( ) não ( )
10. Eu demoro muito tempo para começar minhas coisas pela manhã.	sim ( ) não ( )
11. Eu sou incapaz de fazer os serviços de casa.	sim ( ) não ( )
12. Eu me canso facilmente.	sim ( ) não ( )
13. Eu me sinto frustrado frequentemente.	sim ( ) não ( )
14. A dor está sempre presente.	sim ( ) não ( )
15. Eu sinto que deixo de fazer muitas coisas.	sim ( ) não ( )
16. Eu acho difícil lavar meu cabelo.	sim ( ) não ( )
17. Minha doença me deixa deprimido	sim ( ) não ( )
18. Eu me preocupo se deixo as pessoas desapontadas.	sim ( ) não ( )

8 REFERÊNCIAS

1. Sherlock JP, Buckley CD, Cua DJ. The critical role of interleukin-23 in spondyloarthropathy. *Mol Immunol*. 2014; 57:38-43.
2. Hreggvidsdottir HS, Noordenbos T, Baeten DL. Inflammatory pathways in spondyloarthritis. *Mol Immunol*. 2014; 57:28-37.
3. Leonardi C, Matheson R, Zachariae C, Cameron G, Li L, Edson-Heredia E, Braun D, Banerjee S. Anti-interleukin-17 monoclonal antibody ixekizumab in chronic plaque psoriasis. *N Engl J Med*. 2012; 366:1190-9.
4. Papp KA, Leonardi C, Menter A, Ortonne JP, Krueger JG, Kricorian G, Aras G, Li J, Russell CB, Thompson EH, Baumgartner S. Brodalumab, an anti-interleukin-17-receptor antibody for psoriasis. *N Engl J Med*. 2012; 366:1181-9.
5. Baeten D, Baraliakos X, Braun J, Sieper J, Emery P, van der Heijde D, McInnes I, van Laar JM, Landewé R, Wordsworth P, Wollenhaupt J, Kellner H, Paramarta J, Wei J, Brachat A, Bek S, Laurent D, Li Y, Wang YA, Bertolino AP, Gsteiger S, Wright AM, Hueber W. Anti-interleukin-17A monoclonal antibody secukinumab in treatment of ankylosing spondylitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2013; 382:1705-13.

6. Poddubnyy D, Hermann K-GA, Callhoff J, Listing J, Sieper J. Ustekinumab for the treatment of patients with active ankylosing spondylitis: results of a 28-week, prospective, open-label, proof-of-concept study (TOPAS). *Ann Rheum Dis*. 2014; 73:817-23.
7. Wellcome Trust Case Control Consortium (WTCCC), Australo-Anglo-American Spondylitis Consortium (TASC), Burton PR, Clayton DG, Cardon LR, Craddock N, et al. Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants. *Nat Genet*. 2007; 39:1329-37.
8. Kenna TJ, Davidson SI, Duan R, Bradbury LA, McFarlane J, Smith M, Weedon H, Street S, Thomas R, Thomas GP, Brown MA. Enrichment of circulating interleukin-17-secreting interleukin-23 receptor-positive γ/δ T cells in patients with active ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum*. 2012; 64:1420-9.
9. Colbert RA, Tran TM, Layh-Schmitt G. HLA-B27 misfolding and ankylosing spondylitis. *Mol Immunol*. 2014; 57:44-51.
10. Ciccia FA, Accardo-Palumbo A, Rizzo A, Guggino G, Raimondo S, Giardina A, Cannizzaro A, Colbert RA, Alessandro R, Triolo G. Evidence that autophagy, but not the unfolded protein response, regulates the expression of IL-23 in the gut of patients with Ankylosing Spondylitis and subclinical gut inflammation. *Ann Rheum Dis*. 2014; 73(8):1566-74.

11. Zeng L, Lindstrom MJ, Smith JA. Ankylosing spondylitis macrophage production of higher levels of interleukin-23 in response to lipopolysaccharide without induction of a significant unfolded protein response. *Arthritis Rheum.* 2011; 63:3807-17.
12. Zúñiga LA, Jain R, Haines C, Cua DJ. Th17 cell development: from the cradle to the grave. *Immunol Rev.* 2013; 252:78-88.
13. McGeachy MJ, Chen Y, Tato CM, Laurence A, Joyce-Shaikh B, Blumenschein WM, McClanahan TK, O'Shea JJ, Cua DJ. The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin17-producing effector T helper cells in vivo. *Nat Immunol.* 2009; 10:314-24
14. Yeremenko N, Paramarta JE, Baeten D. The interleukin-23/interleukin-17 immune axis as a promising new target in the treatment of spondyloarthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2014; 26:361-70.
15. Smith JA, Colbert RA. Review: The interleukin-23/interleukin-17 axis in spondyloarthritis pathogenesis: Th17 and beyond. *Arthritis Rheumatol.* 2014; 66:231-41.
16. Gagliardi MC, Teloni R, Mariotti S, Bromuro C, Chiani P, Romagnoli G, Giannoni F, Torosantucci A, Nisini R. Endogenous PGE2 promotes the induction of human Th17 responses by fungal β -glucan. *J Leukoc Biol.* 2010; 88:947-54.
17. Blackwell KA, Raisz LG, Pilbeam CC. Prostaglandins in bone: bad cop, good cop? *Trends Endocrinol Metab.* 2010; 2:294-301.

18. Zhang J, Wang JH. Prostaglandin E2 (PGE2) exerts biphasic effects on human tendon stem cells. *PlosOne*. 2014; 9:e87706.
19. van der Heijde D, Landewé R, Baraliakos X, Houben H, van Tubergen A, Williamson P, Xu W, Baker D, Goldstein N, Braun J; Ankylosing Spondylitis Study for the Evaluation of Recombinant Infliximab Therapy Study Group. Radiographic findings following two years of infliximab therapy in patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum*. 2008; 58:3063-70.
20. van der Heijde D, Landewé R, Einstein S, Ory P, Vosse D, Ni L, Lin SL, Tsuji W, Davis JC Jr. Radiographic progression of ankylosing spondylitis after up to two years of treatment with etanercept. *Arthritis Rheum*. 2008; 58:1324-31.
21. van der Heijde D, Salonen D, Weissman BN, Landewé R, Maksymowych WP, Kupper H, Ballal S, Gibson E, Wong R; Canadian (M03-606) study group.; ATLAS study group. Assessment of radiographic progression in the spines of patients with ankylosing spondylitis treated with adalimumab for up to 2 years. *Arthritis Res Ther*. 2009; 11:R127.
22. Wanders A, Heijde Dv, Landewé R, Béhier JM, Calin A, Olivieri I, Zeidler H, Dougados M. Nonsteroidal antiinflammatory drugs reduce radiographic progression in patients with ankylosing spondylitis: a randomized clinical trial. *Arthritis Rheum*. 2005; 52:1756-65.

23. Poddubnyy D, Rudwaleit M, Haibel H, Listing J, Märker-Hermann E, Zeidler H, Braun J, Sieper J. Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on radiographic spinal progression in patients with axial spondyloarthritis: results from the German Spondyloarthritis inception cohort. *Ann Rheum Dis*. 2012; 71:1616-22.
24. Appel H, Maier R, Bleil J, Hempfing A, Loddenkemper C, Schlichting U, Syrbe U, Sieper J. In situ analysis of interleukin-23- and interleukin-12-positive cells in the spine of patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum*. 2013; 65:1522-9.
25. Sherlock JP, Joyce-Shaikh B, Turner SP, Chao CC, Sathe M, Grein J, Gorman DM, Bowman EP, McClanahan TK, Yearley JH, Eberl G, Buckley CD, Kastelein RA, Pierce RH, Laface DM, Cua DJ. IL-23 induces spondyloarthropathy by acting on ROR- γ t⁺ CD3⁺CD4⁺CD8⁺ enthesal resident T cells. *Nat Med*. 2012; 18:1069-76.
26. van der Linden S, Valkenburg HA, Cats A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria. *Arthritis Rheum*. 1984; 27:361-8.
27. van der Heijde D, Sieper J, Maksymowych WP, Dougados M, Burgos-Vargas R, Landewé R, Rudwaleit M, Braun J; Assessment of SpondyloArthritis international Society. 2010 Update of the international ASAS recommendations for the use of anti-TNF agents in patients with axial spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2011; 70(6):905-8.

28. Sieper J, Rudwaleit M, Baraliakos X, Brandt J, Braun J, Burgos-Vargas R, Dougados M, Hermann KG, Landewé R, Maksymowych W, van der Heijde D. The Assessment of SpondyloArthritis international Society (ASAS) handbook: A guide to assess spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2009; 68(Suppl 2):ii1-44.
29. Machado P, Landewé R, Lie E, Kvien TK, Braun J, Baker D, van der Heijde D; Assessment of SpondyloArthritis international Society. Ankylosing spondylitis disease activity score (ASDAS): defining cut-off values for disease activity states and improvement scores. *Ann Rheum Dis.* 2011; 70:47-53.
30. Garret S, Jenkinson T, Kennedy LG, Whitelock H, Gaisford P, Calin A. A new approach to defining disease status in ankylosing spondylitis: the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index. *J Rheumatol.* 1994; 21:2286-91.
31. Cusmanich KG: *Validação para a língua portuguesa dos instrumentos de avaliação de índice funcional e índice de atividade da doença em pacientes com espondilite anquilosante* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2006.
32. Jenkinson TR, Mallorie PA, Whitelock HC, Kennedy LG, Garrett SL, Calin A. Defining spinal mobility in ankylosing spondylitis (AS). The Bath AS Metrology Index. *J Rheumatol.* 1994; 21:1694-8.

33. Shinjo SK, Gonçalves R, Kowalski S, Gonçalves CR. Brazilian-Portuguese version and applicability questionnaire of the mobility index for ankylosing spondylitis. *Clinics*. 2007; 62(2):139-44.
34. Doward LC, Spoorenberg A, Cook A, Whalley D, Helliwell PS, Kay LJ, McKenna SP, Tennant A, van der Heijde D, Chamberlain MA. Development of the ASQol: a quality of life instrument specific to ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis*. 2003; 63:20-6.
35. Torres, TM: *Avaliação da qualidade de vida e da utilização de recursos em espondilite anquilosante* [dissertação]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, 2008. [129] p.
36. Dougados M, Simon P, Braun J, Burgos-Vargas R, Maksymowych WP, Sieper J, van der Heijde D. ASAS recommendations for collecting, analysing and reporting NSAID intake in clinical trials/epidemiological studies in axial spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2011; 70:249-51.
37. Creemers MC, Franssen MJ, van't Hof MA, Gribnau FW, van de Putte LB, van Riel PL. Assessment of outcome in ankylosing spondylitis: an extended radiographic scoring system. *Ann Rheum Dis*. 2005; 64:127-9.
38. Chen WS, Chang YS, Lin KC, Lai CC, Wang SH, Hsiao KH, Lee HT, Chen MH, Tsai CY, Chou CT. Association of serum interleukin-17 and interleukin-23 levels with disease activity in Chinese patients with ankylosing spondylitis. *J Chin Med Assoc*. 2012; 75:303-8.

39. Wang X, Lin Z, Wei Q, Jiang Y, Gu J. Expression of IL-23 and IL-17 and effect of IL-23 on IL-17 production in ankylosing spondylitis. *Rheumatol Int.* 2009; 29:1343-7.
40. Mei Y, Pan F, Gao J, Ge R, Duan Z, Zeng Z, Liao F, Xia G, Wang S, Xu S, Xu J, Zhang L, Ye D. Increased serum IL-17 and IL-23 in the patient with ankylosing spondylitis. *Clin Rheumatol.* 2011; 30:269-73.
41. Melis L, Vandooren B, Kruithof E, Jacques P, De Vos M, Mielants H, Verbruggen G, De Keyser F, Elewaut D. Systemic levels of IL-23 are strongly associated with disease activity in rheumatoid arthritis but not spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2010; 69:618-23.
42. Sveaas SH, Berg IJ, Provan SA, Semb AG, Olsen IC, Ueland T, Aukrust P, Vøllestad N, Hagen KB, Kvien TK, Dagfinrud H. Circulating levels of inflammatory cytokines and cytokine receptors in patients with ankylosing spondylitis: a cross-sectional comparative study. *Scand J Rheumatol.* 2015; 44(2):118-24.
43. Ciccia F, Bombardieri M, Principato A, Giardina A, Tripodo C, Porcasi R, Peralta S, Franco V, Giardina E, Craxi A, Pitzalis C, Triolo G. Overexpression of interleukin-23, but not interleukin-17, as an immunologic signature of subclinical intestinal inflammation in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 2009; 60:955-65.
44. Gaston JS, Goodall JC, Baeten D. Interleukin-23: a central cytokine in the pathogenesis of spondylarthritis. *Arthritis Rheum.* 2011; 63:3668-71.

45. Yoshida K, Oida H, Kobayashi T, Maruyama T, Tanaka M, Katayama T, Yamaguchi K, Segi E, Tsuboyama T, Matsushita M, Ito K, Ito Y, Sugimoto Y, Ushikubi F, Ohuchida S, Kondo K, Nakamura T, Narumiya S. Stimulation of bone formation and prevention of bone loss by prostaglandin E EP4 receptor activation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99:4580-5.
46. Li M, Thompson DD, Paralkar VM. Prostaglandin E(2) receptors in bone formation. *Int Orthop*. 2007; 31:767-72.
47. Chai W, Lian Z, Chen C, Liu J, Shi LL, Wang Y. JARID1A, JMY, and PTGER4 polymorphisms are related to ankylosing spondylitis in Chinese Han patients: a case-control study. *PlosOne*. 2013; 19:e74794.
48. Cortes A, Maksymowych WP, Wordsworth BP, Inman RD, Danoy P, Rahman P, Stone MA, Corr M, Gensler LS, Gladman D, Morgan A, Marzo-Ortega H, Ward MM; SPARCC (Spondyloarthritis Research Consortium of Canada); TASC (Australo-Anglo-American Spondyloarthritis Consortium), Leach TJ, Reveille JD, Brown MA, Weisman MH. Association study of genes related to bone formation and resorption and the extent of radiographic change in ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis*. 2015;74(7):1387-93.
49. Miossec P, Kolls JK. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. *Nat Rev Drug Discov*. 2012; 11:763-76.

-
50. Bowness P, Ridley A, Shaw J, Chan AT, Wong-Baeza I, Fleming M, Cummings F, McMichael A, Kollnberger S. Th17 cells expressing KIR3DL2+ and responsive to HLA-B27 homodimers are increased in ankylosing spondylitis. *J Immunol.* 2011; 186:2672-80.
  51. Ramiro S, Stolwijk C, van Tubergen A, van der Heijde D, Dougados M, van den Bosch F, Landewé R. Evolution of radiographic damage in ankylosing spondylitis: a 12 year prospective follow-up of the OASIS study. *Ann Rheum Dis.* 2015; 74(1):52-9.
  52. Baraliakos X, Listing J, von der Recke A, Braun J. The natural course of radiographic progression in ankylosing spondylitis--evidence for major individual variations in a large proportion of patients. *J Rheumatol.* 2009; 36:997-1002.
  53. Poddubnyy D, Haibel H, Listing J, Märker-Hermann E, Zeidler H, Braun J, Sieper J, Rudwaleit M. Baseline radiographic damage, elevated acute-phase reactant levels, and cigarette smoking status predict spinal radiographic progression in early axial spondylarthritis. *Arthritis Rheum.* 2012; 64:1388-98.
  54. Haroon N, Inman RD, Leach TJ, Weisman MH, Lee M, Rahbar MH, Ward MM, Reveille JD, Gensler LS. The impact of tumor necrosis factor α inhibitors on radiographic progression in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 2013; 65:2645-54.

55. Maksymowych WP. Spondyloarthritis. Treat-to-target in spondyloarthritis--do we have a plan? *Nat Rev Rheumatol*. 2013; 9:507-8.
56. Smolen JS, Braun J, Dougados M, Emery P, Fitzgerald O, Helliwell P, Kavanaugh A, Kvien TK, Landewé R, Luger T, Mease P, Olivieri I, Reveille J, Ritchlin C, Rudwaleit M, Schoels M, Sieper J, Wit Md, Baraliakos X, Betteridge N, Burgos-Vargas R, Collantes-Estevez E, Deodhar A, Elewaut D, Gossec L, Jongkees M, MacCarone M, Redlich K, van den Bosch F, Wei JC, Winthrop K, van der Heijde D. Treating spondyloarthritis, including ankylosing spondylitis and psoriatic arthritis, to target: recommendations of an international task force. *Ann Rheum Dis*. 2014; 73:6-16.

APÊNDICES

Apêndice A - Artigo Publicado

A referida tese foi publicada na revista *Arthritis Research & Therapy* disponível para consulta no endereço <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26912133>

NCBI
Resources
How To

PubMed.gov
US National Library of Medicine
National Institutes of Health
PubMed
Advanced

Format: Abstract
Send to

Arthritis Res Ther. 2016 Feb 24;18:52. doi: 10.1186/s13075-016-0949-6.

IL-23/Th17 axis is not influenced by TNF-blocking agents in ankylosing spondylitis patients.

Milanez FM¹, Saad CG², Viana VT³, Moraes JC⁴, Périco GV⁵, Sampaio-Barros PD⁶, Goncalves CR⁷, Bonfá E⁸.

Author information

Abstract

BACKGROUND: Advances in pathophysiology and treatment of ankylosing spondylitis (AS) was recently demonstrated. However, the effect of anti-TNF in the newly described inflammatory pathways involved pathogenesis of this disease remains to be determined. The aim of our study was, therefore, to investigate long-term influence of anti-TNF drugs in IL-23/IL-17 axis of AS patients and their possible correlation with treatment, clinical, laboratory and radiographic parameters.

METHODS: Eighty-six AS anti-TNF naïve patients, 47 referred for anti-TNF therapy (active-AS; BASDAI ≥ 4) and 39 with BASDAI < 4 (control-AS) were included. The active group was evaluated at baseline, 12-months and 24-months after TNF blockade and compared at baseline to control-AS group and to 47 healthy age- and gender-matched controls. Plasma levels of IL-17A, IL-22, IL-23 and PGE2 were measured. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) intake were recorded every 6 months. Radiographic severity and progression was assessed by mSASSS at baseline and 24 months after therapy.

RESULTS: At baseline, active-AS group presented higher IL-23 and PGE2 levels compared to control-AS group ($p < 0.001$ and $p = 0.008$) and to healthy controls ($p < 0.001$ and $p = 0.02$). After 24-months of TNF blockade, IL-23 and PGE2 remained elevated with higher levels compared with the healthy group ($p < 0.001$ and $p = 0.03$) in spite of significant improvements in all clinical/inflammatory parameters ($p < 0.001$). Further analysis of 27 anti-TNF-treated patients who achieved a good response (ASDAS-CRP < 2.1 , with a drop ≥ 1.1) at 24-months revealed that IL-23 plasma levels remained higher than healthy controls ($p < 0.001$) and higher than control-AS group with similar disease activity (ASDAS-CRP < 2.1 , $p = 0.01$). In active-AS group ($n = 47$), there was a strong correlation between IL-23 and IL-17A at baseline, 12-months and 24-months after anti-TNF therapy ($p \leq 0.001$).

CONCLUSION: This study provides novel data demonstrating that the IL-23/IL-17 axis is not influenced by TNF blockade in AS patients despite clinical and inflammation improvements and NSAID intake.

PMID: 26912133 PMCID: PMC4765065 DOI: 10.1186/s13075-016-0949-6