

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

Kenia Rodrigues de Andrade

**Avaliação de marcadores inflamatórios e de metabolismo ósseo em
pacientes com Espondilite Anquilosante**

Florianópolis
2014

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

Kenia Rodrigues de Andrade

**Avaliação de marcadores inflamatórios e de metabolismo ósseo em
pacientes com Espondilite Anquilosante**

*Dissertação apresentada a Banca
Examinadora do Programa de Pós-
Graduação em Ciências Médicas do Centro
de Ciências da Saúde da Universidade
Federal de Santa Catarina, como requisito
parcial para obtenção do grau de Mestre em
Ciências Médicas*

Orientadora: Prof^ª. Tânia Silvia
Fröde, Dra.

Florianópolis
2014

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

Andrade, Kenia

Avaliação de marcadores inflamatórios e de metabolismo ósseo em pacientes com Espondilite Anquilosante / Kenia Andrade ; orientadora, Tânia Fröde - Florianópolis, SC, 2014.
81 p.

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

Inclui referências

1. Ciências Médicas. 2. espondilite anquilosante. 3. inflamação. 4. citocinas. 5. metabolismo ósseo. I. Fröde, Tânia. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas. III. Título.

FOLHA DE ASSINATURAS

*Dedico este trabalho a 3
amados anjos: Amabile, Betina, Henrique*

AGRADECIMENTOS

Após a finalização de mais uma etapa, e a realização de mais um sonho, paro para pensar e certifico-me de quão feliz sou por ter tido a oportunidade de ter convivido com pessoas tão especiais.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à professora e orientadora Tânia Silvia Fröde, por ter sido uma orientadora sempre atenciosa, paciente e competente. Muito obrigada por ter me aceitado como aluna e por sempre ter atendido minhas dúvidas, meus anseios, e me ensinando sempre, no melhor sentido da palavra.

Gostaria de agradecer meus pais, João Batista Rodrigues e Virginia Pirath Rodrigues, por todo o exemplo, pela dedicação, pelo esforço. Por terem nos educado e nos guiado num caminho seguro, com valores estabelecidos e com muito amor.

Ao meu esposo, João Paulo de Andrade, meu amor, amigo e companheiro, pela cumplicidade, compreensão e paciência. Por confiar sempre e nunca me deixar abater.

Aos meus irmãos, Georgia Paula Rodrigues Alves e Roger Pirath Rodrigues, minha avó, Eulália Maria Pirath e minha sobrinha, Amabile Rodrigues Alves, pela torcida persistente, pela amizade, e amor.

Aos meus colegas de profissão Ivânio Alves Pereira, Adriana Zimmermann, Fabricio Souza Neves, Sonia Cristina de Magalhães Fialho, Giovana Ribeiro, Maria Amazile Ferreira Toscano, Juliana Paupitz por terem dividido comigo muito deste trabalho com idéias, sugestões e incentivo.

Ao meu colega Glaucio Castro, pela participação ativa no trabalho e ajuda com as análises estatísticas.

À colega Julia Salvan pela ajuda com as amostras e análises laboratoriais.

Ao colega Igor K. Rodrigues pela colaboração na coleta de dados dos pacientes.

Aos colegas de trabalho do Hospital Universitário, aos meus queridos e especiais amigos.

Ao queridos pacientes que sempre participaram tão animadamente e voluntariamente deste trabalho.

A Deus, por tudo.

RESUMO

A Espondilite Anquilosante (EA) é uma doença inflamatória crônica auto-imune cuja patogênese ainda não está totalmente esclarecida, mas se sabe que além da inflamação, há a neoformação óssea, que determina importante dano estrutural. **Objetivos:** 1) Avaliar a resposta inflamatória e a neoformação óssea de pacientes com EA por meio da dosagem de marcadores pró-inflamatórios (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-17, MPO, ADA e NO $_x$) e de metabolismo ósseo (FAO, OP e DKK-1). 2) Comparar as concentrações séricas dos marcadores pró-inflamatórios e dos marcadores de metabolismo ósseo entre controles, pacientes portadores de EA sem medicação, em uso somente de agentes anti-TNF- α por pelo menos 12 semanas e pacientes portadores de EA em uso somente de fármacos anti-inflamatórios não hormonais (AINHs) por pelo menos 4 semanas. 3) Correlacionar os marcadores pró-inflamatórios (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-17, MPO, ADA e NO $_x$) e os marcadores de metabolismo ósseo (FAO, OP e DKK-1) nos pacientes com EA com os questionários clínicos: BASDAI (Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index), BASFI (Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index) e BASMI (Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index). **Métodos:** As concentrações séricas de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-17, MPO, ADA, NO $_x$, FAO, OP e DKK-1 foram mensurados em 52 pacientes com EA, sem medicamentos, tratados com AINHs ou com anti-TNF- α e em 26 controles saudáveis utilizando-se testes colorimétricos e/ou de enzimaímoensaio (ELISA). A atividade e gravidade da doença EA foram determinadas por meio dos questionários BASDAI, BASFI e BASMI. **Resultados:** Comparados aos controles, os pacientes com EA apresentaram concentrações mais elevadas de TNF- α ($p = 0,014$), NO $_x$ ($p = 0,0003$), FAO ($p < 0,0001$, OP ($p = 0,0005$) e DKK-1 ($p = 0,0037$). As análises de variância (ANOVA) de todos os grupos estudados apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação ao NO $_x$ ($p = 0,004$), FAO ($p < 0,0001$), OP ($p < 0,0001$) e DKK-1 ($p = 0,026$). O teste pos-hoc com comparações múltiplas mostraram diferenças estatisticamente significativas entre os controles e os pacientes sem medicação para NO $_x$ ($p = 0,008$), FAO ($p < 0,0001$), e OP ($p < 0,0001$), mas não para a MPO, ADA e DKK-1, $p > 0,05$). Houve correlação positiva entre os níveis séricos de ADA e BASDAI ($r = 0,286$, $p = 0,044$), e correlação negativa entre os níveis de OP e BASFI ($r = -0,323$, $p = 0,022$). **Conclusão:** os pacientes com EA sem medicação apresentaram diferenças significativas nas concentrações de NO $_x$, FAO e OP, em comparação aos controles, e parece que estes

marcadores não se alteram com o tratamento específico. A ADA parece estar relacionada com atividade de doença em pacientes com EA.

Palavras chaves: espondilite anquilosante, inflamação, citocinas, metabolismo ósseo, anti- TNF- α , AINHs.

ABSTRACT

Ankylosing spondylitis (AS) is a chronic inflammatory autoimmune disease, whose pathogenesis is still not completely understood. It is known that, in addition to inflammation, there is new bone formation, that determines major structural damages. **Objectives:** 1) To evaluate the inflammatory response and bone formation in patients with AS through the measurement of proinflammatory markers (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-17, MPO, ADA and NO $_x$) and bone metabolism (BAP, OP and DKK-1). 2) To compare the serum concentration of proinflammatory markers and bone metabolism markers among controls, patients with AS without medication, patients using only anti-TNF- α agents for at least 12 weeks and patients with AS treated with nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) continuously for at least 4 weeks. 3) To correlate the proinflammatory (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-17, MPO, ADA and NO $_x$) and bone metabolism (BAP, OP and DKK-1) markers in AS patients with clinical questionnaires: BASDAI (Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index), BASFI (Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index), and BASMI (Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index). **Methods:** The serum levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-17, MPO, ADA, NO $_x$, BAP, OP and DKK-1 were measured in 52 patients with AS without medication, treated with NSAIDs or anti-TNF- α and in 26 healthy controls. The activity and severity of AS were determined by the questionnaires BASDAI, BASFI and BASMI. **Results:** Compared to controls, patients with AS had higher levels of TNF- α ($p = 0.0147$), NO $_x$ ($p = 0.0003$), BAP ($p < 0.0001$), OP ($p = 0.0005$) and DKK-1 ($p = 0.0037$). The analyses of variance (ANOVA) of all groups showed statistically significant differences for NO $_x$ ($p = 0.004$), BAP ($p < 0.0001$), OP ($p < 0.0001$) and DKK-1 ($p = 0.026$). The roc test with multiple comparisons showed statistically significant differences between controls and patients without medication NO $_x$ ($p = 0.008$), BAP ($p < 0.0001$), and OP ($p < 0.0001$), but not for MPO, ADA and DKK-1 ($p > 0.05$). There was a positive correlation between serum levels of ADA and BASDAI ($r = 0,286$, $p = 0,044$) and a negative correlation between OP and BASFI ($r = -0,323$, $p = 0,022$). **Conclusion:** AS patients without medication presented significant differences on levels of NO $_x$, BAP and OP in comparison to control patients, and it seems that these markers expression do not change with specific treatment. ADA seems to be related with disease activity in AS patients.

Key words: ankylosing spondylitis, inflammation, cytokines, bone metabolism, anti- TNF- α , NSAIDs

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Identificação dos grupos de estudo	34
Tabela 2	Características clínicas e demográficas dos grupos controle (C), pacientes com espondilite anquilosante (EA) total, pacientes com EA sem medicação, pacientes com EA+anti-inflamatórios não hormonais (AINHs) e dos pacientes com EA+anti-TNF- α .	45
Tabela 3	Concentrações séricas de marcadores inflamatórios e de metabolismo ósseo do grupo controle e dos pacientes com espondilite anquilosante (EA) total.	47
Tabela 4	Análise de variância (ANOVA) de marcadores inflamatórios e de metabolismo ósseo do grupo controle, pacientes com espondilite anquilosante (EA) sem medicação, pacientes com EA + anti-inflamatórios não hormonais (AINHs) e dos pacientes com EA + anti-TNF- α .	49
Tabela 5	Concentrações séricas de marcadores inflamatórios e de metabolismo ósseo do grupo controle, pacientes com espondilite anquilosante (EA) sem medicação, pacientes com EA + anti-inflamatórios não hormonais (AINHs) e dos pacientes com EA + anti-TNF- α .	50
Tabela 6	Correlação entre os marcadores de inflamação e do metabolismo ósseo e os parâmetros clínicos no grupo espondilite anquilosante (EA) total.	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA	Adenosina deaminase
AINHs	Anti-inflamatórios não hormonais
Anti-TNF- α	Medicação antagonista do fator de necrose tumoral α
AR	Artrite reumatoide
ASAS	Sociedade internacional de avaliação das espondiloartrites
BASDAI	Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index
BASFI	Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index
BASMI	Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index
DMARDs	Fármacos modificadores de doença
DKK-1	Dikkopff-1
EA	Espondilite Anquilosante
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
EROS	Espécies reativas de oxigênio
EVA	Escala visual analógica
FAO	Fosfatase alcalina óssea
HIV	Imunodeficiência adquirida
HLA B27	Antígeno leucocitário humano B 27
H2O2	Peróxido de hidrogênio
HOCL/OCL ⁻	Ácido hipocloroso/hipoclorídrico
IL-1	Interleucina 1
IL-1 α	Interleucina 1 α
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-1Ra	Antagonista do receptor da IL-1
IL-6	Interleucina 6

IL-8	Interleucina 8
IL-17	Interleucina 17
IL-23	Interleucina 23
NF- κ B	fator de transcrição nuclear NF-Kappa β
MHC classe I	Complexo de histocompatibilidade principal classe I
MMP3	Metaloproteinase 3
MPO	Mieloperoxidase
NO	oxido nítrico
NO _x	Nitrito/nitrato
NOS	oxido nítrico sintase
OP	Osteoprotegerina
PCR	Proteína C reativa
RANK	Receptor ativador do fator nuclear κ B
RANKL	Ligante do receptor ativador do fator nuclear κ B
RM	Ressonância Magnética
Th17	Células T <i>helper</i> 17
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
VHS	Velocidade de hemossedimentação
Wnt	Via Wingless

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	21
2.	OBJETIVOS	31
2.1	Objetivo geral	31
2.2	Objetivos específicos:.....	31
3.	CASUÍSTICA E MÉTODOS	33
3.1	Delineamento do estudo	33
3.2	Local e Período de realização do estudo.....	33
3.3	Cálculo da Amostra	33
3.4.1	Critérios de categorização dos pacientes com espondilite anquilosante e controles	34
3.4.2	Critérios de inclusão de pacientes com espondilite anquilosante	34
3.4.3	Critérios de inclusão de controles	35
3.4.4	Critérios de exclusão de pacientes com espondilite anquilosante e controles	35
3.5	Procedimentos para coleta de dados	36
3.5.1	Coleta de dados clínicos.....	36
3.5.2	Procedimentos para avaliação de atividade de pacientes com EA.....	36
3.5.3	Procedimentos para avaliação da funcionalidade dos pacientes com EA.....	36
3.5.4	Procedimentos para avaliação das alterações da mobilidade dos pacientes com EA	36
3.5.5	Procedimentos para a coleta de material	37
3.6	Análises laboratoriais	37
3.6.1	Determinação sérica das citocinas pró-inflamatórias por ELISA.....	37
3.6.2	Determinação sérica da mieloperoxidase	38

3.6.3	Determinação sérica da Adenosina-desaminase	39
3.6.4	Determinação sérica dos metabólitos Nitrito/Nitrato (NOx).....	39
3.6.5	Determinação sérica do isotipo ósseo da fosfatase alcalina.....	40
3.6.6	Determinação sérica de OP	40
3.6.7	Determinação sérica de DKK-1	41
3.7	Análise Estatística	42
3.8	Considerações Éticas.....	42
4.	RESULTADOS	43
5.	DISCUSSÃO	55
6.	CONCLUSÕES	61
	REFERÊNCIAS.....	63
	ANEXOS	73

1. INTRODUÇÃO

A Espondilite Anquilosante (EA) é uma doença inflamatória crônica caracterizada pelo comprometimento de esqueleto axial, ênteses e articulações periféricas [1,2]. Esta doença também pode ocasionar manifestações extra-articulares, tais como uveíte e comprometimento de estruturas cardíacas dentre outras [3-6]. A principal característica desta doença é a dor lombar de caráter inflamatório podendo ser responsável por até 15% de todos os tipos de lombalgias [7]. A doença caracteriza-se pela presença de lombalgia inflamatória, associada à sacroiliíte radiográfica e, frequentemente, espondilite. Acomete principalmente homens jovens, com uma razão de proporção de 2 homens, para cada 1 mulher acometida [1, 6, 8]. A prevalência varia entre 0,1 a 1,4% da população geral, e a incidência varia conforme a população estudada [9].

A EA é uma doença autoimune cuja etiologia ainda não está totalmente esclarecida, mas se sabe que tem caráter multifatorial, dependendo de fatores ambientais e genéticos [10]. Esta doença está associada à presença do gene codificador do antígeno leucocitário humano (HLA)-B27, que é um complexo de histocompatibilidade principal (MHC) classe I, porém, apenas cerca de 5% dos pacientes HLA B27 positivos apresentam a doença, o que fortalece a hipótese de que existem muitos outros genes possivelmente associados a esta doença [11].

A EA é o protótipo do grupo das espondiloartrites, que é extensamente estudado pela sociedade internacional de avaliação das espondiloartrites (ASAS) que, com intuito de estabelecer diagnóstico precoce e tratamento apropriado propôs novos critérios classificatórios para o diagnóstico de espondiloartrite axial. Segundo os novos critérios, é necessária a presença de sacroiliíte avaliado por Ressonância Magnética (RM) ou radiográfica associada a mais um critério clínico; ou a presença do HLA-B27 positivo mais dois critérios clínicos para espondiloartrites dentre os quais se incluem: lombalgia inflamatória, artrite, entesite de calcânhar, uveíte, dactilite, psoríase, doença inflamatória intestinal, boa resposta a anti-inflamatórios não-hormonais (AINHs), histórico familiar de espondiloartrites, HLA-B27 positivo, e proteína C reativa (PCR) alterada [12]. Fazem parte das Espondiloartrites a EA, a artrite psoriásica, a artrite reativa, as enteroartropatias, a espondiloartrite indiferenciada, a espondiloartrite juvenil e a uveíte anterior aguda [12].

Para o diagnóstico de EA, os critérios mais utilizados são os de Nova York modificados, que combinam critérios clínicos e

radiográficos. Os critérios clínicos são: 1) dor lombar há mais de três meses de duração que melhora com o exercício e não alivia com o repouso; 2) limitação da coluna lombar nos planos frontal e sagital; 3) expansibilidade torácica diminuída (corrigida para idade e sexo) [13]. Os critérios radiográficos são: 1) sacroiliíte bilateral, grau 2, 3 ou 4; 2) sacroiliíte unilateral, grau 3 ou 4. Para o diagnóstico de EA é necessária a presença de um critério clínico e um critério radiográfico [13].

A EA pode ter um curso clínico variável, podendo apresentar-se de forma leve, causando pouca ou nenhuma incapacidade, bem como de forma extremamente agressiva, assumindo um caráter deformante e/ou incapacitante. Diversos estudos têm sido realizados na tentativa de esclarecer os fatores relacionados ao pior prognóstico desta doença. Algumas características, portanto, já estão bem estabelecidas como preditores de curso clínico desfavorável, tais como agressividade e aumento das concentrações de marcadores de atividade inflamatória, ausência de resposta ao uso de AINHS, limitação da coluna lombar, dedos em salsicha, início em idade precoce, envolvimento de quadril, artrite periférica, dentre outras [7]. O grau de incapacidade é determinante no impacto sócio-econômico relacionado a esta enfermidade, o que determina cada vez mais a necessidade de estudos que elucidem a fisiopatologia da doença e que possam trazer novas possibilidades terapêuticas.

Tendo em vista que a EA é uma doença crônica, com vários perfis de gravidade e acometimento, tornou-se imprescindível a utilização de instrumentos de avaliação clínica para o seguimento dos pacientes, que auxiliam na avaliação do grau de comprometimento funcional e da mobilidade, bem como no acompanhamento da resposta ao tratamento utilizado. Entre estes instrumentos, podemos citar um índice de atividade de doença, o BASDAI (*Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index*) [14], índices funcionais, como o BASFI (*Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index*) [15]; um índice metrológico, o BASMI (*Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index*) [16].

O BASDAI é um questionário já validado para a língua portuguesa [17] e é bastante utilizado na prática clínica por ser de fácil aplicação no acompanhamento periódico e na avaliação da resposta ao tratamento utilizado no paciente com EA. O índice é obtido por meio de um questionário composto por seis perguntas, feitas ao paciente na consulta médica. Para cada pergunta, o paciente responde por meio de uma escala visual analógica (EVA). As perguntas englobam questões como fadiga, dor axial inflamatória, componente periférico e a intensidade e duração da rigidez matinal, na semana que antecede a

consulta médica (anexo 1). O resultado é expresso em números (0 = bom, 10 = ruim), considerando-se como atividade da doença o resultado acima de 4 [14].

O BASFI também tem validação para o português [17] e é bastante eficiente para avaliar o grau de incapacidade funcional dos pacientes. Diferentemente do BASDAI, o BASFI pode ter pouca variabilidade, principalmente nos casos nas doenças de longa evolução, pois muitas alterações funcionais são irreversíveis. O índice é obtido por meio de um questionário composto por oito itens relacionados às atividades da vida diária e dois itens que avaliam as habilidades do paciente em lidar com o seu dia-a-dia. A resposta para cada pergunta é obtida através de uma EVA. O resultado do escore é dado em número de 0 a 10 (0 = bom; 10 = ruim) [15] (anexo 2).

O BASMI é um índice metrológico que avalia medidas da coluna e sua mobilidade no intuito de definir o comprometimento axial e de quadril do paciente. As medidas envolvidas são: rotação cervical, distância occipito-parede, flexão lombar, teste de Schober modificado e distância intermaleolar. Cada medida é convertida em um escore de 0 a 10 (0 = bom; 10 = ruim) [16] (Anexo 3).

Dentre os marcadores inflamatórios importantes na EA destaca-se a citocina pró-inflamatória denominada fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). O TNF- α é liberado por neutrófilos, macrófagos, células T, células B, células natural killer, mastócitos, células endoteliais, células musculares cardíacas, fibroblastos, osteoclastos entre outras. O TNF- α tem a capacidade de induzir a liberação de outras citocinas, como a IL-1 β , a produção de moléculas de adesão e a quimiotaxia celular para o tecido lesado. Além disso, promove a ativação do NF- κ B, que, por sua vez, induz novamente a síntese e a liberação de vários mediadores pró-inflamatórios, atuando em várias cascatas de sinalização, perpetuando o processo inflamatório [18].

Sabe-se que o TNF- α tem uma importante função na defesa contra infecções. Além disto, estudos demonstram concentrações elevadas desta citocina em doenças inflamatórias autoimunes, tais como artrite reumatóide (AR), artrite psoriásica, além da EA. A importância desta citocina na patogênese da doença EA foi consagrada após a evidência de que o uso de medicações anti-TNF- α está relacionado com a melhora clínica e laboratorial, como PCR e Velocidade de hemossedimentação (VHS) destes pacientes [19].

Várias são as outras citocinas que participam da resposta inflamatória em doenças crônicas. A interleucina 17 (IL-17) é outra citocina pró-inflamatória, produzida principalmente por uma linhagem

de células T conhecida como linfócitos T *helper* 17 (Th17) que influencia na patogênese de uma série de doenças inflamatórias, além de induzir neutrófilos a exercer importante papel na presença de infecção e dano tecidual [20-21]. Esta citocina exerce uma série de efeitos pleiotrópicos sobre vários tipos celulares tais como fibroblastos, células endoteliais e epiteliais, participando de repostas pró-inflamatórias e hematopoiéticas. Em modelos murinos, esta citocina está relacionada com lesão de cartilagens e é responsável por induzir a produção de outras citocinas inflamatórias, como interleucina 6 (IL-6), interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 8 (IL-8) e TNF- α , além de estimular a granulopoiese [22]. A IL-17 estimula ainda a expressão do Ligante do receptor ativador do fator nuclear-k β (RANKL) que tem importante papel da osteoclastogênese [22].

A interleucina 23 (IL-23), por sua vez, é produzida por células dendríticas e macrófagos, e é capaz de regular a maturação de células Th17, induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e levando a um estado de inflamação crônica. Pacientes com EA parecem ter concentrações séricas aumentadas de IL-17 e IL-23, o que sustenta a hipótese de que o eixo de células Th17 exerce um importante papel na patogênese e na suscetibilidade da doença [23-24].

A família da interleucina 1 (IL-1) é composta por duas proteínas homólogas: IL-1 α , IL-1 β e o antagonista do receptor da IL-1 (IL-1Ra) [25]. As proteínas IL-1 α e IL-1 β são secretadas por todas as células nucleadas, principalmente por macrófagos, mas também por fibroblastos, células sinoviais, endotélio, neutrófilos, dentre outras. Estas citocinas são importantes mediadores da inflamação aguda e crônica, e participam de diversos eventos inflamatórios, tais como febre, dor, vasodilatação e hipotensão, os quais estão relacionados com o efeito da IL-1 β sobre a indução das enzimas ciclooxigenase-2 (COX-2), fosfolipase A₂ e óxido nítrico sintase induzida (iNOS), e síntese prostaglandinaE₂ (PGE₂), fator ativador de plaquetas (PAF) e óxido nítrico (NO) [26]. A proteína IL-1Ra é capaz de ligar-se aos receptores da IL-1, inibindo a ligação das proteínas IL-1 α e IL-1 β . Isto gera a possibilidade de neutralização da propriedade inflamatória dessas proteínas [25-26]. Estas citocinas estimulam a liberação de TNF- α e IL-6 e ainda são capazes de aumentar de moléculas de adesão, promovendo a quimiotaxia de leucócitos para o sítio de inflamação [26].

O real papel da IL-1 na patogênese da EA ainda não está bem esclarecido, tendo em vista que os estudos evidenciam resultados controversos em relação às concentrações séricas da IL-1 β nestes pacientes [27-28]. Estudos em modelos animais demonstraram que e IL-

1α e $L-1\beta$ estimulam a inflamação na fase aguda e relacionam-se com destruição articular. Porém, apesar de $TNF-\alpha$ ter sido encontrado em altas concentrações nas biópsias de sacroilíacas de pacientes com EA [29], os estudos não evidenciaram o mesmo achado em relação a $IL-1\beta$ [29].

A $IL-6$, por sua vez, tem papel importante tanto na resposta imune inata como adaptativa e é secretada principalmente por células mononucleares e por linfócitos T *helper* ativadas, em resposta à infecção ou inflamação ou estimulada por outras citocinas, tais como $IL-1$ ou $TNF-\alpha$, tem caráter multifuncional e está envolvida na resposta imune, hematopoiese e inflamação exercendo importante função no recrutamento de leucócitos, na indução da produção de citocinas, moléculas de adesão, participando na transição da reposta inflamatória aguda para crônica [30].

Esta citocina está comprovadamente relacionada com doenças inflamatórias, tais como AR, asma e alguns tipos de câncer [31-32]. Isto ficou ainda mais claro após a evidência de que o bloqueio desta citocina está relacionado com a melhora clínica e laboratorial em pacientes com AR [30,32]. A $IL-6$ parece também ter relação com a patogênese da EA, mas a sua real função e relação com a atividade da doença ainda não está totalmente esclarecida [30]. Contrastando com a AR, os estudos não comprovam eficácia do bloqueio da $IL-6$ nos pacientes com EA, evidenciando que ainda há muito a desvendar em relação ao papel desta citocina na patogênese da EA [30].

Na resposta imune, também há a participação de enzimas pró-inflamatórias, tais como a mieloperoxidase (MPO), a adenosina deaminase (ADA) e a óxido nítrico sintase (NOS). Essas enzimas são liberadas por leucócitos ativados e promovem a ativação de neutrófilos e linfócitos, contribuindo para a manutenção do processo inflamatório, e portanto, apresentando importante papel na patogênese de algumas doenças inflamatórias crônicas, incluindo a EA. Os produtos desta ativação, como o óxido nítrico (NO), contribuem para a lesão tecidual relacionada com a inflamação [33-35].

A ADA é uma enzima liberada durante o processo inflamatório e suas concentrações são dependentes da ação de células nucleares, especialmente de células T e de macrófagos, participando da resposta imune celular. A adenosina é um nucleosídeo liberado por células mononucleares durante o processo inflamatório, podendo exercer diversas funções no organismo, com um efeito anti-inflamatório ou pró-inflamatório, dependendo das suas concentrações e dos seus receptores

envolvidos. Durante a resposta inflamatória, a adenosina extra-celular formada é degradada por uma reação de desaminação catalisada pela enzima adenosina-desaminase. A ADA pode funcionar como marcador da atividade de células mononucleares pois desempenha função importante na maturação e na ativação de monócitos e linfócitos. Há evidências de que a ligação da adenosina no receptor A_{2A} pode inibir a quimiotaxia de neutrófilos, a liberação de NO, de citocinas, tais como TNF- α e IL-1 β e da expressão de moléculas de adesão [36].

Alguns estudos evidenciam o aumento das concentrações séricas e sinoviais desta enzima em pacientes com AR e sugerem que a ADA possa ser um possível marcador para diagnóstico e seguimento destes pacientes, bem como um possível alvo terapêutico [37-38]. Em 2012, Camargo e colaboradores (e col.) estudaram a possível relação entre EA e a presença do polimorfismo do gene 22 A, que está relacionado com a ADA, mas não encontraram associação significativa [40].

Já a MPO é uma enzima presente nos neutrófilos, capaz de gerar produtos como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o ácido hipocloroso/hipoclorídrico ($HOCl/OCl^-$) [41-42]. Esses produtos têm ação bactericida e apresentam considerável toxicidade levando a um estresse oxidativo e dano tecidual [39-40]. A MPO está associada a efeitos fisiopatológicos tanto em fagócitos, como em células endoteliais, contribuindo para o processo inflamatório em pacientes com aterosclerose. A oxidação mediada pela MPO parece ter um importante papel na patogênese de algumas doenças inflamatórias crônicas, tais como aterosclerose, fibrose cística e AR [43]. Stamp et al, em 2012, estudaram a relação entre as concentrações de MPO e o efeito do estresse oxidativo nos pacientes com AR e demonstraram que concentrações elevadas desta enzima estavam relacionadas com a atividade da doença [35]. Além disso, sabe-se que MPO pode ser liberada por neutrófilos no sítio da inflamação promovendo a inflamação extracelular e dano tecidual [44]. Em EA, alguns estudos sugerem que as concentrações séricas elevadas de MPO podem refletir na ativação de neutrófilos e consequentemente induzir a liberação de espécies reativas de oxigênio (EROS) e de nitrogênio (ERN) na corrente sanguínea [45].

O NO é um radical livre liberado principalmente por células endoteliais e macrófagos que participa de uma série de processos biológicos, tais como inflamação, funções neuronais, apoptose e contração de vias aéreas e vasos sanguíneos., exercendo função da imunidade inata e específica. Ele é liberado a partir de uma reação mediada por enzimas denominadas óxido nítrico sintase (NOS). Há três

isoformas de NOS. A NOS induzível (iNOS) é liberada por macrófagos, células endoteliais, células da musculatura lisa após estímulos causados por bactérias ou por citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β , TNF- α , IFN- γ e IL-6. O NO e seus metabólitos nitrito/nitrato (NO $_x$) são substâncias envolvidas na quimiotaxia celular e parecem contribuir para a degradação da cartilagem pelo dano ao condrócito induzido pela liberação de EROS E ERN, porém a sua relação com patogênese da EA ainda não está bem esclarecida [46-48].

O RANKL é um estimulador expressivo da reabsorção óssea por se ligar ao receptor ativador do fator nuclear- $\kappa\beta$ (RANK) na membrana dos osteoclastos [49-51]. O RANKL é uma citocina da família do TNF- α produzida por linfócitos, fibroblastos e osteoblastos. Sua ligação a seu receptor RANK deflagra a ativação de fator de transcrição nuclear NF-Kappa β (NF- $\kappa\beta$) e resulta na diferenciação e ativação e osteoclastos. A osteoprotegerina (OP), por sua vez, é um receptor solúvel que tem a capacidade de se ligar ao RANKL e impedir a maturação e a ativação dos osteoclastos [52]. Esse eixo RANK/RANKL/OP tem a capacidade de regular o metabolismo ósseo entre remodelamento e perda óssea, podendo participar diretamente na patogênese de algumas doenças. Em AR, observa-se o aumento na expressão de RANKL e concentrações reduzidas de OP, o que se relaciona com erosão óssea e destruição cartilaginosa [51, 53-54]. Na EA, os estudos ainda são conflitantes e a relação das concentrações da OP com perda de massa óssea e neoformação ainda não está bem esclarecido.

A via clássica das proteínas “Wigless” (Via da Wnt) sinaliza a translocação da β -catenina ao núcleo, levando ao estímulo da osteoblastogênese e a inibição da osteoclastogênese. Esta via possui uma série de inibidores, sendo o Dickkopf-1 (DKK-1) um dos principais. O DKK-1 tem a capacidade de se ligar nos receptores de membrana das proteínas da via Wnt, impedindo a sua ligação e levando à degradação da β -catenina, reduzindo então o estímulo a osteoblastogênese [55]. Em modelos murinos de artrite inflamatória, observa-se que a destruição óssea pode transformar-se em formação óssea pelo bloqueio de TNF- α ou de DKK-1 [54]. A inibição da neoformação óssea e o estímulo à osteoclastogênese pelo TNF- α dependem da relação entre várias vias da DKK-1 e da RANK/RANKL/OP [56].

A Fosfatase alcalina é uma enzima localizada na superfície celular, e é encontrada em diversos órgãos e tecidos como os ossos (osteoblastos), o fígado e intestinos. É uma glicoproteína dimérica, que cliva a ligação de fosfato de ésteres monofosfatos é conhecida por estar

na superfície de osteoblastos. Sua função ainda não totalmente elucidada mas é conhecida com um marcador de atividade osteoblástica e portanto, de formação óssea [57].

Uma vez que a EA é uma doença inflamatória e também relacionada à neoformação óssea, com dano estrutural, ainda há muito a ser esclarecido em relação à sua patogênese. Não se sabe ao certo se os dois processos ocorrem juntos ou de forma independente [9]. A terapia com agentes antagonistas do Fator de Necrose Tumoral-alfa (anti-TNF- α), tais como infliximabe, etanercepte e adalimumabe, tem sido descrita como eficaz em reduzir a inflamação e os sinais e sintomas dolorosos da EA, bem como redução de biomarcadores, tais como a PCR. Da mesma forma, são comprovadamente eficazes no controle de manifestações extra-articulares, tais como uveíte [9, 58-59]. Todavia, estudos sobre a progressão radiológica em pacientes com EA sob uso de medicações anti-TNF- α tem evidenciado que estas medicações têm pouco ou nenhum efeito sobre o remodelamento ósseo, sendo incapazes de impedir a progressão da neoformação óssea [57-58], ao contrário do que já foi observado em pacientes em tratamento com AINHS [62-63]. Desta forma, há um grande interesse por parte dos pesquisadores em elucidar o papel dos agentes terapêuticos na resposta inflamatória e na osteoproliferação na EA.

Pedersen e col. observaram que a terapia com adalimumabe (agente anti-TNF- α) promove a redução de marcadores da resposta inflamatória como a IL-6 e da metaloproteinase 3 (MMP3) [64]. A informação sobre o efeito desta terapia sobre outras citocinas na EA ainda é escassa. Com relação a marcadores do metabolismo ósseo, sabe-se que a terapia com agente anti-TNF- α promove o aumento nas concentrações séricas de fosfatase alcalina óssea (FAO), que é um marcador de formação óssea e pode esclarecer sobre a neoformação óssea presente na EA [65]. Estes dados sugerem que a neoformação óssea ocorre de forma independente ao bloqueio do TNF- α , ou até mesmo pode ser estimulada por esta terapia [65]. Não se sabe se a neoformação óssea é um processo totalmente independente da resposta inflamatória na EA, ou se algumas citocinas pró-inflamatórias, não adequadamente bloqueadas pela terapia anti-TNF- α , seriam responsáveis pela ativação da neoformação óssea.

Sabe-se que o uso contínuo de agentes AINHS é capaz de reduzir a progressão da osteogênese na EA, quando avaliada radiologicamente [65]. Porém, o efeito do uso de AINHS nas concentrações séricas de marcadores de metabolismo ósseo, como a FAO, OP e FKK-1, na EA não é bem conhecido.

Com base no exposto, propôs-se a realização deste estudo, com intuito de esclarecer alguns pontos ainda obscuros da patogênese da EA, o real papel dos tratamentos consagrados sobre os parâmetros inflamatórios e de metabolismo ósseo, bem como tentar identificar possíveis alvos terapêuticos para esta doença que tem caráter crônico, progressivo e com grande impacto sócio-econômico.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a resposta inflamatória e a neoformação óssea de pacientes com EA por meio da dosagem de marcadores pró-inflamatórios e de metabolismo ósseo.

2.2 Objetivos específicos:

Principais

- Dosar as citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-17) no soro de pacientes portadores de EA.
- Dosar enzimas pró-inflamatórias MPO e ADA e concentração de metabólitos do óxido nítrico (NO $_x$) no soro de pacientes portadores de EA.
- Dosar os marcadores de metabolismo ósseo FAO, OP e DKK-1 no soro de pacientes portadores de EA.

Secundários

- Comparar os marcadores pró-inflamatórios (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-17, MPO, ADA e NO $_x$) e dos marcadores de metabolismo ósseo (FAO, OP e DKK-1) no soro de pacientes portadores de EA sem medicação, que usam somente AINHs de forma contínua por pelo menos 4 semanas e naqueles em uso somente de agentes anti-TNF- α por mínimo de 12 semanas.
- Correlacionar os marcadores pró-inflamatórios (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-17, MPO, ADA e NO $_x$) e os marcadores de metabolismo ósseo (FAO, OP e DKK-1) nos pacientes com EA com a sua avaliação clínica por meio dos questionários validados BASDAI, BASFI e BASMI.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Delineamento do estudo

Estudo observacional analítico e transversal controlado.

3.2 Local e Período de realização do estudo

A coleta de dados ocorreu entre os períodos de maio de 2012 a janeiro de 2013, no Ambulatório de Reumatologia do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago, da Universidade Federal de Santa Catarina.

3.3 Cálculo da Amostra

O cálculo da amostra foi realizado considerando erro amostral de 5%, nível de confiança de 95% e percentual máximo da população de 1,5%, segundo seguinte fórmula:

$$n = \frac{N \cdot Z^2 \cdot p \cdot (1 - p)}{Z^2 \cdot p \cdot (1 - p) + e^2 \cdot (N - 1)}$$

3.4 Pacientes e controles

Neste estudo foram coletadas amostras de sangue total de onde foi separado o soro e foram analisados os dados clínicos de uma amostra de 52 pacientes portadores de EA, e 26 indivíduos saudáveis, todos acima de 18 anos. O grupo de pacientes com EA (EA total) foi dividido em três sub-grupos de acordo com a terapia vigente. Grupo 1 (EA sem medicação): pacientes sem medicação para EA há pelo menos 12 semanas; grupo 2 (EA+AINHs): pacientes portadores de EA somente em uso de AINHs há pelo menos 4 semanas, em dose plena (aceclofenaco 200 mg/dia, celecoxibe 400 mg/dia, diclofenaco 125-150 mg/dia, etoricoxibe 90 mg/dia, ibuprofeno 3200 mg/dia, cetoprofeno 200-300 mg/dia) [66] ou nimesulida 200-400 mg/dia [67]; grupo 3 (EA+anti-TNF- α): pacientes portadores de EA em uso continuado somente de terapia anti-TNF- α há pelo menos 12 semanas (Tabela 1).

3.4.1 Critérios de categorização dos pacientes com espondilite anquilosante e controles

Os pacientes apresentavam diagnóstico de EA ou de Espondiloartrite Axial e estavam em seguimento regular no Ambulatório de Reumatologia, do Hospital Professor Polydoro Ernani de São Thiago da Universidade Federal de Santa Catarina. O grupo controle foi composto por 26 indivíduos saudáveis e foi pareado com os pacientes do grupo de EA para sexo e idade.

Tabela 1 – Identificação dos grupos de estudo

Abreviações	Identificação do grupo
C	Controles
EA total	Pacientes com espondilite anquilosante (EA) com e sem tratamento (AINHs ou anti- TNF- α)
EA sem medicação	Pacientes com EA sem tratamento
EA+AINHs	Pacientes com EA em tratamento com AINHs
EA+anti-TNF- α	Pacientes com EA em tratamento com anti- TNF- α

EA = pacientes com espondilite anquilosante, AINHs = anti-inflamatório não hormonal, anti-TNF- α anti-TNF-alpha.

3.4.2 Critérios de inclusão de pacientes com espondilite anquilosante

Foram incluídos no estudo pacientes maiores de 18 anos com EA segundo os critérios de Nova York Modificados [13] e os pacientes com diagnóstico de Espondiloartrite Axial segundo os critérios do grupo ASAS [12]. Para inclusão, os pacientes poderiam estar sem qualquer medicação para a doença de base há pelo menos 12 semanas; estar usando apenas AINHs há pelo menos 4 semanas em dose plena ou estar em uso de medicação anti-TNF- α por no mínimo 12 semanas (e não poderiam ter usado AINHs mesmo que aleatoriamente). Nenhum dos pacientes estava sob uso de corticóide, bem como outra medicação imunossupressora. Ainda foram incluídos no estudo somente os pacientes que permitiram a utilização de seus dados para as atividades de pesquisa após leitura e assinatura do *termo de consentimento livre e esclarecido* (anexo 4).

3.4.3 Critérios de inclusão de controles

- Indivíduos saudáveis, com idade igual ou superior a 18 anos, que permitiram a utilização de seus dados para as atividades de pesquisa após leitura e assinatura do *termo de consentimento livre e esclarecido* (anexo 4).

3.4.4 Critérios de exclusão de pacientes com espondilite anquilosante e controles

Foram excluídos do estudo:

- Pacientes incapazes de compreender os termos do termo de consentimento livre e esclarecido;
- Pacientes com diagnóstico de psoríase, doença inflamatória intestinal (como doença de Crohn ou retocolite ulcerativa), pacientes com diagnóstico de Artrite reativa;
- Portadores de doenças infecciosas bacterianas, virais e/ou fúngicas em atividade;
- Portadores de infecções virais crônicas, incluindo infecções por hepatite B, hepatite C e imunodeficiência adquirida (HIV);
- Portadores de doenças neoplásicas;
- Pacientes em uso corticoterapia ou que tenham usado aleatoriamente nos últimos 30 dias;
- Pacientes que tenham utilizado rituximabe ou imunoglobulina antitimocítica nos últimos 12 meses;
- Pacientes em uso de agentes antireabsortivos para tratamento de osteoporose;
- Pacientes em uso de medicações que alterem o metabolismo ósseo, como denosumabe, teriparatide, ranelato de estrôncio;
- Pacientes com história de fratura óssea nos últimos 6 meses;
- Portadores de doenças ósseas metabólicas e/ou doenças que alterem o metabolismo ósseo, incluindo hiperparatiroidismo, insuficiência renal crônica, acidose metabólica e alteração dos níveis sérios de cálcio, fósforo e magnésio;
- Pacientes com uso de imunossupressores, que não anti-TNF- α .

3.5 Procedimentos para coleta de dados

3.5.1 Coleta de dados clínicos

As informações referentes a dados demográficos, duração de doença, alterações radiográficas, histórico medicamentoso foram coletadas utilizando-se questionário e análise do prontuário (anexo 5).

3.5.2 Procedimentos para avaliação de atividade de pacientes com EA

A atividade da doença foi determinada por um instrumento de avaliação validado para EA, o BASDAI [14] (anexo 1). Este consiste na utilização de um questionário composto por 6 perguntas, pelo qual o paciente responde por meio de uma EVA, que avalia o grau de fadiga, dor em coluna e em articulações periféricas, grau e duração de rigidez matinal. O resultado é expresso em números (0 = bom, 10 = ruim), realizando-se a média das questões 1 (que avalia fadiga), 2 (que avalia dor em coluna e quadris), 3 (que avalia artrite) e 4 (que avalia entesite) com a média das questões de 5 (intensidade da rigidez matinal) e 6 (duração da rigidez matinal), dividindo-se o resultado por 5. Considera-se como atividade da doença o resultado acima de 4 [14].

3.5.3 Procedimentos para avaliação da funcionalidade dos pacientes com EA

Para avaliação da funcionalidade dos pacientes foi utilizado o índice de avaliação funcional validado para EA, o BASFI [15] (anexo 2). O índice é obtido por meio de um questionário composto por oito itens relacionados às atividades da vida diária e dois itens que medem as habilidades do paciente em lidar com o seu dia-a-dia. O escore para cada uma das questões é de 0 a 10 em EVA (0 = bom; 10 = ruim) e o resultado final é média das respostas dividido por 10. O resultado varia de 0 (bom) a 10 (ruim).

3.5.4 Procedimentos para avaliação das alterações da mobilidade dos pacientes com EA

Para a avaliação do grau de limitação da mobilidade dos pacientes com EA foi utilizado um índice metrológico, o BASMI [16]. As medidas envolvidas são: rotação cervical, distância occipito-parede,

flexão lombar, teste de Schober modificado e distância intermaleolar. Cada medida é convertida em um escore de 0 a 10 (0 = bom; 10 = ruim). Este índice é composto por medidas da mobilidade da coluna e quadril (anexo 3). O teste de schober modificado é realizado fazendo-se um marca na linha imaginária que liga as duas espinhas anterossuperiores e outra marca 10 cm acima. Em seguida pede-se para o paciente flexionar anteriormente a coluna lombar sem dobrar os joelhos. O resultado é a distância medida entre os dois pontos nesta posição.

3.5.5 Procedimentos para a coleta de material

Para a análise de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-17, MPO, ADA, NO_x, FAO, OP e DKK-1 foram coletados 30 mL de sangue periférico total. Este foi centrifugado a 2.500 r.p.m. por 5 minutos para obtenção do soro e a quantificação dos parâmetros avaliados neste estudo. A amostra biológica foi estocada a -20° C para posterior análise dos parâmetros estudados.

3.6 Análises laboratoriais

3.6.1 Determinação sérica das citocinas pró-inflamatórias por ELISA

Para avaliar a concentração sérica de marcadores: TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-17, foi utilizado o método de Ensaio Imunoenzimático (ELISA) Sandwich. Neste protocolo foram utilizados anticorpos monoclonas de rato anti-humano específico para cada substância estudada: TNF- α (BD Biosciences, SanJose, CA), IL-1 β (BD Biosciences, SanJose, CA), IL-6 (BD Biosciences, SanJose, CA) e IL-17 (RayBio, Norcross, GA). As leituras de todas as citocinas e suas respectivas curvas-padrão foram realizadas em leitor de ELISA (TP-Reader, Thermo Plate, China). Os valores foram expressos em pg/mL.

Neste protocolo, foi realizada uma curva padrão com concentrações conhecidas de cada uma das citocinas. Além disso, padrões com concentrações também definidas de 0 pg/ml e 500 pg/ml foram também utilizados nesta reação. Inicialmente, adicionou-se 50 μ l de diluente em cada escavação na placa de ELISA conforme a instrução do fabricante. A seguir, adicionou-se 100 μ l de amostra sérica dos pacientes, padrões ou a curva padrão em cada escavação (well) na mesma placa. Agitou-se a mistura lentamente

(100rpm). Para a incubação da reação, a placa de ELISA foi tampada e a reação foi incubada por 2 horas, a temperatura ambiente. Após esta etapa, a placa de ELISA foi lavada com solução tampão de lavagem por 5 vezes, sendo dispensado o tempo de 1 minuto para cada lavagem. A seguir, adicionou-se 100 µl de substrato denominado de TMB em cada escavação, agitou-se a placa novamente da mesma forma que citado anteriormente, e mais uma incubação foi realizada durante 30 minutos, a temperatura ambiente. Após este procedimento, adicionou-se a esta mistura, 5050 µl de solução de parada da reação enzimática denominada de solução STOP, agitou-se novamente a placa da mesma forma que citado anteriormente e mais uma incubação foi realizada durante 30 minutos a temperatura ambiente. Após este procedimento, adicionou-se a esta mistura 50 µl de solução de parada da reação enzimática de solução STOP, agitou-se novamente a placa de ELISA conforme descrito anteriormente. A leitura foi realizada após 30 min em 450 nm em leitora de placa de ELISA

3.6.2 Determinação sérica da mieloperoxidase

O soro dos pacientes e de controles foram coletados e processada para a quantificação das concentrações da enzima MPO. Volumes de 20 µL do soro ou do padrão (MPO de neutrófilos humanos (0,7 - 140 mU/mL)) foram transferidos para as placas de ELISA e a reação enzimática iniciada com a adição de 180 µL de solução (0,167 mg/mL de \square -dianisidina 2HCl e 0,0005% de H₂O₂). Após 15 minutos de incubação, à temperatura ambiente, a reação foi interrompida com a adição de 30 µL de azida sódica (1%) [68]. Em seguida, as placas contendo as amostras foram lidas em leitora de microplacas de ELISA (Organon-Technica, Roseland, New Jersey, E.U.A.) em 450 nm. Curvas-padrão com concentrações conhecidas da MPO (0,7 - 140 mU/mL) também tiveram suas densidades ópticas determinadas, permitindo a quantificação dos valores desconhecidos. Os valores das concentrações da MPO foram expressos em mU/mL, com o auxílio da equação da reta.

3.6.3 Determinação sérica da Adenosina-desaminase

Inicialmente, amostras com concentrações conhecidas (volume final 2500 μL) de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (35 mM), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (15 mM) e NH_3SO_4 (15 mM) foram preparadas para a obtenção de uma curva-padrão (10-50 U/L). As amostras séricas do grupo de pacientes e dos controles contendo a enzima adenosina-desaminase (ADA) (20 μL) foram transferidas para cubetas e a reação enzimática iniciou-se com a adição da solução de tampão fosfato (pH 6,5, 500 μL , composição: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (35 mM), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (15 mM) e adenosina (0,5 mM)). Após período de incubação de 1 h a 37°C, a reação foi bloqueada pela adição da solução (1000 μL) de fenol (1 mM), nitroprussiato de sódio (0,17 mM) e tampão fosfato (1000 μL : NaOCl : 11 mM) [69]. Esta solução também foi adicionada às cubetas contendo as diferentes concentrações da curva-padrão (volume final 2500 μL). As absorvâncias das amostras foram lidas em leitora de microplacas de ELISA (Organon-Tecknica, Roseland, New Jersey, E.U.A.) em 620 nm. As concentrações da enzima ADA foram determinadas e expressas em U/L, com auxílio da equação da reta.

3.6.4 Determinação sérica dos metabólitos Nitrito/Nitrato (NO_x)

O NO foi quantificado por meio da formação de seus metabólitos: nitrato (NO_3^-) e nitrito (NO_2^-), utilizando-se a reação de Griess [70]. As amostras séricas (300 μL) de pacientes e controles foram submetidas à desproteinização com 20 μL de solução de sulfato de zinco a 20%. Estas foram incubadas em banho de gelo por 60 minutos. As amostras foram centrifugadas (2.500 rpm por 15 minutos), obtendo-se um sobrenadante límpido. A seguir, 100 μL do sobrenadante foram transferidos para uma cubeta e diluídos em solução contendo 200 μL de cloreto de vanádio (VaCl_3) (0,8%) (p/v) e HCl (3%) (p/v). Nesta mesma cubeta foram adicionados 300 μL de solução de Griess: sulfanilamida (1%) (p/v), ácido fosfórico (5%) (v/v) e N-(1-naftil) etilenodiamina (0,1%) (p/v) e incubados durante 40 minutos, a 37°C. A reação de NO_2^- com esse reagente produz uma coloração rósea, que foi quantificada por meio da leitura das densidades ópticas em leitora de microplacas de ELISA (Organon - Tecknica, Roseland, New Jersey, E.U.A.) em 540 nm. Curvas-padrão com concentrações conhecidas de NO_2^- (0-150 μM) também tiveram suas densidades ópticas determinadas, permitindo desta forma, com auxílio da equação da reta, a quantificação das concentrações de nitrato/nitrito no lavado da bolsa de ar, em μM .

3.6.5 Determinação sérica do isotipo ósseo da fosfatase alcalina

As amostras séricas foram utilizadas para a quantificação das concentrações de fosfatase alcalina óssea pelo método de enzaimunoensaio (Mybiosource, San Diego, CA). As absorbâncias das amostras foram lidas em 620 nm, utilizando leitor de ELISA (TP-Reader, Thermo Plate, China). A quantificação dos valores desconhecidos foi expressa em U/L com auxílio da equação da reta.

Neste protocolo, utilizou-se uma curva padrão com concentrações conhecidas de fosfatase alcalina óssea humana. Inicialmente adicionou-se 100 µl de água destilada em cada escavação na placa de ELISA conforme as instruções do fabricante. A seguir, adicionou-se 50 µl de amostra sérica sérica dos pacientes, padrões ou a curva padrão em cada escavação na mesma placa. Agitou-se a mistura lentamente. Para a incubação da reação, a placa de ELISA foi tampada e a reação foi incubada por 3 horas a temperatura ambiente. Após esta etapa, a placa de ELISA foi lavada com solução tampão de lavagem por 5 vezes, sendo dispensado o tempo de 1 minuto para cada lavagem. A seguir, adicionou-se 100 µl de substrato denominado de TMB em cada escavação, agitou-se a placa novamente e mais uma incubação foi realizada durante 30 minutos. Após este procedimento, adicionou-se 50 µl de solução de parada enzimática denominada solução STOP, agitou-se a placa de ELISA. A leitura foi realizada após 30 min em 450 nm em leitora de placa de ELISA.

3.6.6 Determinação sérica de OP

Para avaliar as concentrações séricas de OP foi utilizado o método de Ensaio Imunoenzimático (ELISA) *Sandwich*. Neste protocolo experimental foram utilizados anticorpos monoclonais de rato anti-humano para específico para OP (Abcam Inc, Cambridge, UK) e para DKK-1 (Abcam Inc, Cambridge, UK). As absorbâncias das amostras foram lidas em 450 nm, utilizando Leitor de ELISA (TP-Reader, Thermo Plate, China). A quantificação dos valores desconhecidos foi expressa em pg/mL.

Neste protocolo, uma curva padrão com concentrações conhecidas de osteoprotegerina (250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,3 pg/ml, 15,6 pg/ml, and 7,8 pg/ml) foi utilizada na reação enzimática. Além disso, padrões com concentrações também definidas de 0 pg/ml e 500 pg/ml foram também

utilizados nesta reação. Inicialmente, adicionou-se 100 µl de água destilada em cada escavação na placa de ELISA conforme as instruções do fabricante. A seguir, adicionou-se 50 µl de amostra sérica dos pacientes, padrões ou a curva padrão em cada escavação na mesma placa. Agitou-se a mistura lentamente. Para a incubação da reação, a placa de ELISA foi tampada e a reação foi incubada por 3 horas a temperatura ambiente. Após esta etapa, a placa de ELISA foi lavada com solução tampão de lavagem por 5 vezes, sendo dispensado o tempo de 1 minuto para cada lavagem. A seguir, adicionou-se 100 µl de substrato denominado de TMB em cada escavação, agitou-se a placa novamente e mais uma incubação foi realizada durante 30 minutos. Após este procedimento, adicionou-se 50 µl de solução de parada enzimática denominada solução STOP, agitou-se a placa de ELISA. A leitura foi realizada após 30 min em 450 nm em leitora de placa de ELISA.

3.6.7 Determinação sérica de DKK-1

Para avaliar as concentrações séricas de DKK-1 foi utilizado o método de Ensaio Imunoenzimático (ELISA) *Sandwich*. Neste protocolo experimental foram utilizados anticorpos monoclonais de rato anti-humano para específico para OP (Abcam Inc, Cambridge, UK) e para DKK-1 (Abcam Inc, Cambridge, UK). As absorbâncias das amostras foram lidas em 450 nm, utilizando Leitor de ELISA (TP-Reader, Thermo Plate, China). A quantificação dos valores desconhecidos foi expressa em pg/mL.

Neste protocolo, foi utilizada uma curva padrão com concentrações conhecidas de DKK-1 humano (300ng/mL, 150ng/mL, 75 ng/mL, 18,75 ng/mL, 9,38ng/mL, 4,69ng/mL e 0ng/mL). Inicialmente adicionou-se 100 µl de amostra sérica dos pacientes, padrões ou a curva padrão em cada escavação na mesma placa. A mistura foi agitada lentamente (100rpm). Para a incubação da reação, a placa de ELISA foi tampada com adesivo e a reação foi incubada por 2,5 horas em temperatura ambiente. Após esta etapa, a placa de ELISA foi lavada com solução tampão de lavagem por 4 vezes, sendo dispensado o tempo de minuto para cada lavagem. A seguir, adicionou-se 100 µl de anticorpo primário e incubou-se a reação por 1 hora em temperatura ambiente. A seguir, adicionou-se 100 µl de substrato TMB em cada escavação no escuro, agitou-se a placa novamente e mais uma incubação foi realizada por 30 minutos. Após este procedimento,

adicionou-se a esta mistura 50 µl de solução parada da reação enzimática denominada STOP, agitou-se novamente a placa de ELISA. A leitura foi realizada após 30 minutos em 450nm em leitora de placa de ELISA.

3.7 Análise Estatística

As variáveis foram descritas em números absolutos (média e desvio padrão da média (DP)). Neste estudo foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov para avaliar a normalidade da distribuição das variáveis. As variáveis contínuas (sexo, idade, duração da doença, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-17, MPO, ADA, NO $_x$, FAO, OP, DKK-1, BASDAI, BASFI e BASMI) foram comparadas entre os grupos EA e controles por meio de testes de variância (ANOVA) complementados por teste post-Hoc Bonferroni e/ou teste T de Student, uma vez que obedeceram o teste de normalidade. Possíveis correlações foram avaliadas entre os questionários clínicos (BASDAI, BASFI, BASMI) e os parâmetros laboratoriais (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-17 MPO, ADA, NO $_x$, FAO, OP, DKK-1) e para este fim utilizou-se o teste de correlação de Pearson. Valores de P < 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Todos os testes utilizados foram executados pelo programa estatístico SPSS, versão 18.0 (Chicago, IL, EUA).

3.8 Considerações Éticas

Todos os pacientes e controles assinaram o termo de consentimento informado (anexo 4). O estudo foi realizado de acordo com as *Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos* (resolução 196/1996 do Conselho Nacional de Saúde), Declaração de Helsink de 2000 [71] (e foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFSC (protocolo CAAE-00883312.1.0000.0121-05/2012).

4. RESULTADOS

Dos pacientes EA total estudados, cinquenta e dois tinham média de idade \pm desvio padrão da média de $42,09 \pm 11,95$ anos, sendo que destes 75 % eram do sexo masculino e 25% do sexo feminino. Em relação aos controles foram estudados 26 indivíduos saudáveis com média de idade e DP de $37,35 \pm 12,73$ anos, sendo que destes 61% eram homens e 39% do sexo feminino (Tabela 2). Os pacientes com EA tinham tempo médio de diagnóstico da doença de $9,52 \pm 9,91$ anos (Tabela 2). Neste estudo, para a análise clínica observamos que apenas a média do questionário BASDAI foi significativamente diferente entre os grupos (sem medicação: $3,74 \pm 2,63$ vs EA+AINHs: $6,74 \pm 2,27$, $p = 0,0072$ e EA+AINHs: $6,74 \pm 2,27$, vs EA+Anti-TNF- $\alpha = 3,59 \pm 2,22$, $p = 0,0006$ (Tabela 2).

Neste estudo também foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos C e EA total em relação às concentrações séricas dos seguintes parâmetros estudados: NO_x (C: $23,82 \pm 14,41$ mM vs EA total: $38,53 \pm 17,67$ mM, $p = 0,0003$; TNF- α (C: $291,80 \pm 341,30$ pg/ml vs EA total: $683,90 \pm 637,40$ pg/ml, $p = 0,0147$),), FAO (C: $20,75 \pm 9,07$ U/l VS EA total: $34,24 \pm 10,98$ U/L, $p < 0,0001$), DKK-1 (C: $3088,0 \pm 2488,0$ μ g / mL vs EA total: $6418,0 \pm 5382,0$ μ g/ml, $p = 0,0037$) e OP (C: $134,40 \pm 62,36$ vs EA total: $203,30 \pm 86,80$ μ g/ml , $p = 0,0005$) (Tabela 3).

A análises de variância (ANOVA) entre os grupos controle, EA sem medicação, EA + AINHs e EA + anti- TNF- α demonstraram diferenças estatísticas para os seguintes parâmetros inflamatórios analisados: TNF- α ($p = 0,024$), NO_x ($p = 0,004$), FAO ($p < 0,0001$) , OP ($p < 0,0001$) e DKK-1 ($p = 0,026$). Não houve significância estatística para: IL-1 β ($p = 0,297$), IL-6 ($p = 0,400$), IL-17 ($p = 0,294$), MPO ($p = 0,205$) e ADA ($p = 0,194$) (Tabela 4).

O teste pós-hoc, com comparações múltiplas entre os grupos C e EA sem medicação, EA+AINHs e EA+ anti- TNF- α mostrou uma diferença estatisticamente significativa somente para análise entre os grupos C e EA sem medicação para os parâmetros: NO_x (C: $23,79 \pm 14,44$ mM vs EA sem medicação: $42,14 \pm 18,96$ mM , $p = 0,008$) , FAO (C: $20,75 \pm 9,07$ U/L vs EA sem medicação: $39,45 \pm 13,38$ U L ,

$p < 0,0001$) e OP (C: $134,44 \pm 62,36$ vs EA sem medicação: $247,27 \pm 94,42$, $p < 0,0001$) (Tabela 5). É importante salientar que para o parâmetro DKK-1 não observamos diferenças estatisticamente significativas nos grupos C vs EA sem medicação, EA sem medicação vs EA+AINHs, EA sem medicação vs EA+Anti- TNF- α e EA+AINHs vs EA+ anti- TNF- α ($p > 0,05$) (Tabela 5). Neste protocolo também não observou-se diferenças significativas para os seguintes parâmetros: MPO, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-17 e DKK -1 ($p > 0,05$) (Tabela 5).

Quando os pacientes foram comparados em relação ao seu tratamento, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos EA sem medicação, EA + AINHs e EA + anti- TNF- α ($p > 0,05$) (Tabela 5). Apesar de não ter havido significância estatística observou-se que os pacientes tratados com anti- TNF- α apresentavam concentrações menores de NO_x, FAO e OP quando comparados aqueles em uso de AINHs, e quando estes foram comparados ao grupo EA sem medicação. De forma análoga, apesar da análise estatística não ser significativa observou-se também que houve um aumento das concentrações de DKK-1 nos grupo EA + AINHs em relação ao grupo EA sem medicação e da mesma forma, no grupo EA + anti- TNF- α quando comparados ao grupo EA+ AINHs (Tabela 5).

As correlações entre os questionários clínicos e os parâmetros laboratoriais mostraram correlação positiva entre ADA e BASDAI ($r = 0.286$, $p = 0,044$) e correlação negativa entre OP e BASFI ($r = -0.323$, $p = 0.022$). As demais correlações não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) (Tabela 6).

Tabela 2 - Características clínicas e demográficas dos grupos controle (C), pacientes com espondilite anquilosante (EA) total, pacientes com EA sem medicação, pacientes com EA+anti-inflamatórios não hormonais (AINHs) e dos pacientes com EA+anti-TNF- α .

Marcadores	C (Média±DP) N= 26	EA Total (Média±DP) N= 52		p	EA+AINHs N= 12	p ^{II}	EA+ Anti-TNF- α N= 26	p ^{III}	p ^{III}
	EA sem medicação N= 14	Sem medicação N= 18							
Idade (anos)	37,35± 12,73	42,09±11,95	45,36 ±15,50	0,0867	37,77 ± 11,31	0,1613	42,50 ± 9,742	0,4779	0,1835
Sexo (M/F)	16/10	40/12	11/3		8/4		21/5		
Duração da doença (anos)		9,52±9,90	12,3±11,88		6,38±6,38	0,1147	11,0±7,51	0,6438	0,0645
BASMI		3,54±2,63	4,38 ± 3,12		3,58 ± 2,84	0,5103	3,19 ± 2,29	0,2084	0,6674
BASDAI		4,40±2,64	3,74 ± 2,63		6,74 ± 2,27	0,0072	3,59 ± 2,21	0,8647	0,0006
BASFI		4,78±2,89	4,79 ± 2,29		6,31 ± 2,80	0,1962	4,3 ± 2,79	0,6217	0,0527

C = grupo controle = pacientes saudáveis, EA = pacientes com espondilite anquilosante; EA+ AINHs = pacientes com EA em uso anti-inflamatórios não-hormonais há pelo menos 4 semanas; EA+ Anti- TNF- α = pacientes com EA em uso apenas de agentes anti-TNF- α há pelo menos 12 semanas, F = feminino, M = masculino, BASMI = Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index; BASFI = Bath Ankylosing Spondylitis Funcional Index; BASDAI = Bath

Ankylosing Spondylitis Activity Index. p = diferença estatística entre C e grupo EA sem medicação, p[¥] = diferença estatística entre os grupos EA sem medicação e EA + AINHS, p^{¥¥} = diferença estatística entre os grupos EA sem medicação e EA + anti- TNF- α , p^{¥¥¥} = diferença estatística entre os grupos EA + AINHS e EA + anti- TNF- α . Os dados são apresentados com média e DP = desvio padrão. Teste t de Student.

Tabela 3. Concentrações séricas de marcadores inflamatórios e de metabolismo ósseo do grupo controle e dos pacientes com espondilite anquilosante (EA) total.

	C (média ± DP)	EA total (média ± DP)	
Marcadores	N= 26	N= 52	p
MPO (U/L)	716,60 ± 119,10	714,60 ± 274,60	0,6350
ADA (U/L)	9,627 ± 4,4	9,776 ± 5,27	0,7782
NOx (mM)	23,82 ± 14,41	38,53 ± 17,67	0,0003
IL-1β (pg/mL)	12,40 ± 4,77	14,86 ± 15,69	0,4684
TNF-α (pg/mL)	291,80 ± 341,30	683,90 ± 637,40	0,0147
IL-17 (pg/mL)	394,30 ± 182,70	308,20 ± 205,80	0,0741
IL-6 (pg/mL)	16,35 ± 12,66	25,88 ± 30,64	0,1442
FAO	20,75 ± 9,07	34,24 ± 10,98	<0,0001
DKK-1 (pg/mL)	3088,0 ± 2488,0	6418,0 ± 5382,0	0,0037
OP (pg/mL)	134,40 ± 62,36	203,30 ± 86,80	0,0005

C = grupo controle = indivíduos saudáveis, EA total = todos os pacientes com Espondilite Anquilosante com ou sem medicações, TNF-α = fator de necrose tumoral alfa, IL-1β = interleucina 1beta, IL-6 = interleucina 6, IL-17 =

interleucina 17, MPO = mieloperoxidase, ADA = adenosina-desaminase, NO_x = nitrito / nitrato, FAO = fosfatase alcalina fração óssea, OP = osteoprotegerina, DKK-1 = proteína relacionada com Dickkopf 1. Os dados são expressos com média e desvio padrão (DP); usando teste T Student.

Tabela 4-Análises de variância(ANOVA) de marcadores inflamatórios e de metabolismo ósseo do grupo controle, pacientes com espondilite anquilosante (EA) sem medicação, pacientes com EA + anti-inflamatórios não hormonais (AINHs) e dos pacientes com EA + anti-TNF- α .

		Variância	P
TNF- α	Entre os grupos	999440,49	0,024
	Dentro dos grupos	298845,23	
IL-1 β	Entre os grupos	216,86	0,297
	Dentro dos grupos	172,98	
IL-6	Entre os grupos	1428,16	0,400
	Dentro dos grupos	1434,63	
IL-17	Entre os grupos	51296,16	0,294
	Dentro dos grupos	40717,39	
MPO	Entre os grupos	87567,42	0,205
	Dentro dos grupos	56002,93	
ADA	Entre os grupos	41,59	0,194
	Dentro dos grupos	25,78	
NOx	Entre os grupos	1323,69	0,004
	Dentro dos grupos	276,99	
FAO	Entre os grupos	1240,69	< 0,0001
	Dentro dos grupos	105,06	
OP	Entre os grupos	41427,27	< 0,0001
	Dentro dos grupos	6006,75	
DKK-1	Entre os grupos	72138824,30	0,026
	Dentro dos grupos	22100209,42	

EA + AINHs = pacientes com espondilite anquilosante tratados apenas com medicação anti-inflamatória não-hormonal, há pelo menos 4 semanas, EA + anti-TNF- α = pacientes tratados apenas com medicação anti-TNF- α há pelo menos 12 semanas, TNF- α = fator de necrose tumoral alfa, IL-1 β = interleucina 1beta, IL-6 = interleucina 6, IL-17 = interleucina 17, MPO = mieloperoxidase, ADA = adenosina-desaminase, NOx = nitrito / nitrato, OP = osteoprotegerina, DKK-1 = proteína relacionada com Dickkopf 1, FAO = fosfatase alcalina fração óssea. A diferença entre todos os grupos foi expressa em média, utilizando-se a análise de variância (ANOVA).

Tabela 5- Concentrações séricas de marcadores inflamatórios e de metabolismo ósseo do grupo controle, pacientes com espondilite anquilosante (EA) sem medicação, pacientes com EA + anti-inflamatórios não hormonais (AINHs) e dos pacientes com EA + anti- TNF- α .

Marcadores	C (média±DP) N= 26		EA total (media±DP) N= 52					
		EA Sem medicação N= 14	p	EA + AINHs N= 12	p	EA + Anti- TNF- α N= 26	p ^{***}	p ^{****}
IL-1 β (pg/mL)	12,40 \pm 4,77	14,27 \pm 13,97	1	9,77 \pm 4,05	1	17,77 \pm 19,51	1	0,514
TNF- α (pg/mL)	291,82 \pm 341,35	609,06 \pm 495,14	0,5	510,39 \pm 756,49	1	765,29 \pm 623,52	1	1
IL-17(pg/mL)	394,29 \pm 182,70	272,69 \pm 191,96	0,439	329,74 \pm 213,52	1	317,37 \pm 218,94	1	1
IL-6 (pg/mL)	16,35 \pm 12,66	35,83 \pm 66,48	0,751	24,88 \pm 14,15	1	30,38 \pm 41,23	1	1
MPO (U/L)	716,58 \pm 119,10	631,97 \pm 316,23	1,0	827,96 \pm 316,76	0,232	691,02 \pm 235,43	1	0,609
ADA (U/L)	9,63 \pm 4,55	9,94 \pm 4,21	1,0	12,58 \pm 8,01	1	8,70 \pm 4,26	1	0,192
NO _x (mM)	23,79 \pm 14,44	42,14 \pm 18,96	0,008	38,48 \pm 19,40	1	36,11 \pm 16,08	1	1
FAO (U/L)	20,75 \pm 9,07	39,45 \pm 13,38	<0,0001	33,30 \pm 13,82	1	32,11 \pm 7,59	1	1
OP (pg/mL)	134,44 \pm 62,36	247,27 \pm 94,42	<0,0001	204,06 \pm 74,86	0,963	182,37 \pm 82,39	0,082	1
DKK-1 (pg/mL)	3088,35 \pm 2487,69	5798,79 \pm 5270,06	0,517	5959,50 \pm 4811,14	1	7061,0 \pm 5882,0	1	1

C = grupo controle = pacientes saudáveis, EA total = todos os pacientes com espondilite anquilosante com ou sem medicação, EA+AINHs = pacientes tratados somente com medicamentos anti-inflamatórios não-esteróides, há pelo

menos 4 semanas, EA + Anti-TNF- α = pacientes tratados apenas com medicação anti- TNF- α por há 12 semanas, TNF- α = fator de necrose tumoral alfa, IL-1 β = interleucina 1beta, IL-6 = interleucina 6, IL-17 = interleucina 17, MPO = mieloperoxidase, ADA = adenosina-desaminase, NO $_x$ = nitrito / nitrato, FAO = fosfatase alcalina fração óssea, OP = osteoprotegerina, DKK-1 = proteína relacionada com Dickkopf 1, p = diferença estatística entre C e grupo EA sem medicação, p \neq = diferença estatística entre os grupos EA sem medicação e EA+ AINHS, p $\neq \neq$ = diferenças estatísticas entre os grupos EA sem medicação e EA + anti- TNF- α , p $\neq \neq \neq$ = diferença estatística entre os grupos EA + AINHS e EA + anti- TNF- α . DP = desvio padrão da média. Análise pos Hoc, Teste de Bonferroni.

Tabela 6 - Correlação entre os marcadores de inflamação e do metabolismo ósseo e os parâmetros clínicos no grupo espondilite anquilosante (EA) total.

Marcadores	r	p
BASDAI x IL-6	0,012	0,932
BASDAI x TNF- α	-0,004	0,979
BASDAI x IL-1 β	0,228	0,111
BASDAI x IL-17	-0,013	0,928
BASDAI x FAO	0,067	0,642
BASDAI x OP	- 0,234	0,102
BASDAI x DKK-1	-0,179	0,214
BASDAI x ADA	0,286	0,044
BASDAI x MPO	0,155	0,283
BASDAI x NO _x	-0,049	0,783
BASMI X IL-6	-0,056	0,704
BASMI x IL-1 β	0,27	0,855
BASMI x TNF- α	0,085	0,560
BASMI x IL-17	-0,186	0,200
BASMI x FAO	0,120	0,412
BASMI x OP	0,002	0,989
BASMI x DKK-1	0,010	0,947
BASMI x ADA	-0,028	0,847
BASMI x MPO	0,074	0,613
BASMI x NO _x	-0,06	0,679
BASFI x IL-6	-0,13	0,929
BASFI x IL-1 β	0,078	0,590
BASFI x IL-17	-0,129	0,373
BASFI x TNF- α	-0,125	0,389
BASFI x MPO	0,239	0,094
BASFI x ADA	0,140	0,331
BASFI x NO _x	-0,018	0,868
BASFI x DKK-1	-0,078	0,592
BASFI x OP	-0,323	0,022
BASFI x FAO	0,187	0,192

EA = grupo espondilite anquilosante total, BASDAI = Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index, BASFI = Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index, BASMI = Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index, TNF- α = fator de necrose tumoral alfa, IL-1 β = interleucina 1 beta, IL-6 = interleucina 6, IL-17 = interleucina 17, MPO = mieloperoxidase, ADA = adenosina-desaminase, NO_x = nitrito / nitrato, FAO = fosfatase alcalina fração óssea, OP = osteoprotegerina, DKK-1 = proteína relacionada com Dickkopf 1. r = coeficiente de correlação de Pearson.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo evidenciou que os pacientes com EA apresentavam concentrações mais elevadas de TNF- α , NO $_x$, FAO, OP e DKK-1 quando comparados aos indivíduos saudáveis. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os pacientes com EA e os controles em relação às concentrações séricas de: IL-1 β , IL-6, IL-17, MPO e ADA.

A patogênese da EA, uma doença inflamatória crônica, ainda não está totalmente elucidada. O mecanismo de ação dos medicamentos utilizados no tratamento da EA ainda não estão totalmente esclarecidos. Sendo assim, informações sobre marcadores inflamatórios e de metabolismo ósseo ainda são controversos na literatura.

Estudos mostram aumento significativo de citocinas inflamatórias em pacientes com EA. O TNF- α apresenta papel importante na patogênese da doença, que foi ainda mais esclarecido após a comprovação que o uso de medicações que antagonizam o efeito desta citocina determina melhora clínica, de exames laboratoriais como PCR e VHS, redução do edema ósseo em exames de ressonância magnética destes pacientes. Porém, a falta de resposta em alguns casos ou a possível ineligibilidade para o uso de tais medicações traz a necessidade de mais estudos que possam demonstrar o efeito de outros medicamentos como o tocilizumabe (anticorpo monoclonal humanizado que bloqueia especificamente receptores IL-6 solúveis e de membrana), o anankira (antagonista do receptor humano da IL-1) e o secukinumabe (anticorpo monoclonal totalmente humano que neutraliza seletivamente a IL-17A).

No presente estudo, apenas a citocina TNF- α mostrou-se em concentrações elevadas no grupo com EA. Não houve diferença estatística entre os pacientes com EA e indivíduos saudáveis para os parâmetros de IL-1 β , IL-6 e IL-17. Estudos evidenciam controvérsias em relação a IL-1 β [27-29]. Bal e col., em 2007, avaliaram as concentrações de TNF- α , IL-1 β , IL-6, e do receptor solúvel da interleucina-2 (sIL-2R), e observaram diferença estatística entre pacientes com EA e indivíduos normais para TNF- α , IL-6 e sIL-2R, mas não para IL-1 β [28]. O mesmo achado também esteve presente em outros estudos [72-73]. Em contraste com este achado, Vazquez-Del Mecardo [26], constataram que pacientes com EA apresentavam concentrações elevadas de IL-1 β em comparação com indivíduos saudáveis. A maioria dos estudos não consegue relacionar esta citocina

com os parâmetros laboratoriais, tais como PCR e VHS, nem com os parâmetros clínicos (índices de BASDAI, BASFI, BASMI). Gratacos e col. [74], assim como Bal e col. [28] encontraram concentrações elevadas de IL-6 em EA e uma relação positiva deste achado com as concentrações de PCR e VHS. Porém, não conseguiram relacionar estes achados com os critérios de atividade clínica, como BASDAI. Todavia, o uso da medicação que antagoniza a IL-6, até o momento, não se mostrou efetiva para o controle dos sintomas e de atividade clínica nos pacientes com EA [75].

Estudos recentes têm mostrado o papel das linfócitos Th17 na patogênese de várias doenças inflamatórias crônicas, como AR [76], psoríase [77] e das espondiloartrites [78]. Taylan et al [79] avaliaram a participação de Th17 nos pacientes com EA e encontraram um aumento das concentrações séricas de IL-17 nos pacientes com EA, da mesma forma para a IL-23, que é citocina responsável pela sobrevivência das células Th17. Porém, outros estudos falharam ao demonstrar tal efeito [80]. Appel et al [29] em 2011, analisaram o fenótipo de células - IL-17 em pacientes com EA, comparando com pacientes com AR, osteoartrite (OA) e com indivíduos saudáveis. A análise foi realizada no sangue periférico, líquido sinovial e na interface articular. Neste estudo foi encontrado resultados similares em relação à frequência de células CD4 -IL17 no sangue periférico e no líquido sinovial nos pacientes com AR, OA e indivíduos saudáveis. Além disso, observou-se também aumento das células CD4 -IL17 no líquido sinovial em relação ao sangue periférico nos pacientes com espondiloartrite e com AR.

Em relação às enzimas pró-inflamatórias, não conseguimos demonstrar diferença entre pacientes com EA e controles para ADA e MPO. Porém, observamos que os pacientes com EA apresentavam concentrações séricas elevadas de NO_x, sugerindo que importante participação deste marcador no processo inflamatório da EA, corroborando com os dados já descritos na literatura [45, 81-82]. Ersoy e col. [81] compararam, pela primeira vez, as concentrações séricas de nitrato e nitrito nos pacientes com AR, EA, osteoartrose e controles saudáveis. Neste estudo, os autores demonstraram que os pacientes com AR e EA apresentavam concentrações séricas mais elevadas de NO_x quando comparados aos pacientes com osteoartrose e aos controles, e ainda estes mesmos autores observaram correlação positiva entre as concentrações de NO_x e atividade de AR e EA. Yazici e col. [45], pela primeira vez na literatura, avaliaram a importância da ativação neutrofílica no processo de estresse oxidativo em pacientes com EA e demonstraram que este fato estava relacionado com atividade de doença.

Na EA é fundamental o entendimento de marcadores que possam regular o mecanismo de neoformação óssea e de inflamação para que seja possível esclarecer aspectos ainda obscuros em relação à patogênese da doença, bem como a determinação de marcadores prognósticos e de resposta terapêutica. Os estudos ainda são controversos em relação aos marcadores que possam representar o metabolismo ósseo nesta doença. A literatura mostra que o uso de medicação anti- TNF- α não previne a formação de sindesmófitos apesar da melhora nos parâmetros clínicos e laboratoriais, além da melhora do edema ósseo em exames de ressonância magnética, sugerindo que a neoformação ocorre apesar da melhora da inflamação [61]. Porém, alguns estudos mais recentes demonstram que o uso precoce de anti-TNF- α pacientes com EA espondiloartrite axial não radiográfica pode prevenir a neoformação óssea nestes pacientes, sugerindo que uma vez iniciado o processo, este não regride, apesar do tratamento específico [83-84]. Por outro lado, apesar dos AINHS mostrarem-se eficazes em reduzir a progressão radiográfica por meio de mecanismos ainda não totalmente esclarecidos, estes não parecem ser capazes de reduzir a inflamação assim como os sintomas clínicos destes pacientes [62].

No nosso estudo observamos que os pacientes com EA apresentaram aumento de FAO, OP e DKK em relação ao grupo controle e o uso dos medicamentos, anti-TNF- α e AINHS não alteraram este perfil. Kwon e col. em 2012 [85], encontraram que os pacientes com EA apresentavam concentrações elevadas de OP e reduzidas de DKK-1 quando comparados com indivíduos saudáveis e que não houve alteração destes parâmetros após o uso de medicação anti- TNF- α .

A OP, produzida pelos osteoblastos, tem a função de inibir RANKL, inibindo, portanto, a osteoclastogênese, exercendo um importante papel na neoformação óssea. Vários estudos evidenciam discrepância em relação à OP nos pacientes com EA, alguns evidenciam um aumento nas concentrações da OP nos pacientes com EA. Outros, contudo, evidenciam redução ou ausência de diferenças estatísticas entre os pacientes com EA e controles [86-88]. Essas discrepâncias na literatura em relação aos estudos de metabolismo ósseo em pacientes em EA podem ser explicadas pela diversidade da situação em que se encontra o eixo RANK/RANKL/OP, e toda a interação de outras citocinas, como a IL-1, IL-6, IL-17, TNF- α , que também tem relação com a osteoclastogênese. Sabe-se que estas citocinas podem expressar-se de forma diferente, dependendo do grau de atividade da doença e da medicação em uso.

Da mesma forma, ainda há muito o que esclarecer em relação aos

marcadores de metabolismo ósseo na EA. As proteínas da Wnt apresentam importantes funções celulares, tais como crescimento, diferenciação, apoptose e morte celular. A via da Wnt é caracterizada pela ligação das proteínas com seus receptores localizados nas membranas celulares, que são receptores de lipoproteínas relacionado com a proteína 5 ou 6 (LRP 5/6), ou membros da família Frizzled. Após esta ligação, há um aumento da β -catenina intracelular que promove a osteoblastogênese, diferenciação celular etc [89]. A DKK-1 é um importante inibidor da via Wnt que promove a osteoblastogênese, exercendo, assim, um estímulo a osteoclastogênese. Estudos em modelos animais têm evidenciado a participação da DKK-1 na destruição articular em modelos de artrite, estando sua concentração elevada na reabsorção óssea e reduzida nos casos de neoformação. Daoussis e cols. [90] analisaram a DKK-1 em pacientes com EA e indivíduos saudáveis usando dois diferentes métodos de dosagem e observaram discrepância entre os resultados na mesma amostra: O primeiro foi realizado por ELISA sanduíche que analisou a DKK-1 circulante, e evidenciou valores maiores nos pacientes com EA quando comparados aos controles. O segundo foi realizado por meio um método de ELISA funcional, pelo qual foi realizada a dosagem de DKK-1 ligada ao seu receptor (LRP 5/6), evidenciando que pacientes com EA apresentavam concentrações reduzidas de DKK-1. Esta pode ser uma explicação para o fato de haver tantos resultados discrepantes na literatura, tendo em vista que a maioria dos estudos é realizada utilizando o método convencional (Elisa sanduíche para medida de DKK-1 circulante).

Apesar de ser um marcador de formação óssea, o aumento das concentrações de FAO nos pacientes com EA observados neste nosso estudo é bastante novo na literatura, sugerindo uma relação deste marcador com a neoformação óssea.

Por anos, os AINhs foram os únicos medicamentos úteis para a melhora dos sintomas nos pacientes com EA, exercendo papel crucial no tratamento dos pacientes com EA, com eficácia comprovada na redução da dor lombar, da rigidez matinal, função e até mesmo das concentrações de PCR [9, 91]. Os estudos evidenciam que o uso de AINhs na EA tem uma ação não somente analgésica, mas também anti-inflamatória e de inibição na osteoproliferação. Porém, muitos pacientes não apresentavam melhora completa e continuavam com progressão da doença [92]. Wanders e cols. [62] demonstraram que o uso contínuo dos AINhs está relacionado com a melhor resposta quanto aos danos estruturais da doença, em comparação ao uso intermitente dos mesmos.

O uso de fármacos modificadores de doenças (DMARDs), como o metotrexate, sulfassalazina, leflunomida, que são comprovadamente eficazes em pacientes com outras doenças inflamatórias, como AR, tem eficácia reduzida na EA, principalmente nos pacientes que apresentam doença predominantemente axial. Alguns estudos, porém, evidenciaram uma melhora nos sintomas periféricos em pacientes com uso de sulfassalazina [93].

Após a identificação da presença de TNF- α na biópsia das articulações sacroilíacas em pacientes com EA, os estudos direcionaram-se para testar o efeito do uso de medicações anti-TNF- α nestes pacientes [29]. Após o uso desta medicação, observou-se melhora clínica, laboratorial, dos parâmetros de atividade, da qualidade de vida, bem como das imagens de edema ósseo nos exames de ressonância magnética destes pacientes [60-61, 94]. Todavia, observa-se que estas medicações não são eficazes para reduzir ou prevenir o dano estrutural, pois a progressão radiológica continua com a formação dos sindesmófitos [61].

Quando separados por grupos de acordo com os medicamentos em uso, no presente estudo observou-se diferenças significativas em relação ao tratamento para TNF- α , NO_x, FAO, OP e DKK-1, mas na análise estatística *post hoc* esta diferença manteve-se apenas entre os grupos controle e EA sem medicação para os marcadores de NO_x, FAO e OP. Esta diferença observada deixa bastante claro a importância do anti-TNF- α e do AINHS, já que os pacientes estavam sem medicação alguma.

Surpreendentemente, não se observou redução nas concentrações de TNF- α nos pacientes em uso de anti-TNF- α . Uma explicação plausível seria que a antagonização causada pela medicação não seria contra o TNF- α circulante, que foi o dosado no presente estudo, e sim no TNF- α *in situ*. Deve-se destacar que não houve controle em relação ao tipo de medicação anti-TNF- α utilizada e o período da meia vida da medicação em que foi feita a coleta laboratorial. Isto pode ter contribuído para este achado. Além disto, deve-se considerar também o fato de ter sido um estudo transversal e observacional, e a própria heterogeneidade da doença, que faz com que a individualidade seja um importante fator na avaliação dos parâmetros laboratoriais, podendo inclusive ter influenciado os elevados desvios padrões encontrados.

O fato de não conseguirmos demonstrar diferença em relação ao uso de AINHS e de anti-TNF- α quanto aos parâmetros inflamatórios e de metabolismo ósseo não esclarece o motivo pelo qual se observa progressão radiográfica nos pacientes em uso de anti-TNF- α e não se

observa o mesmo nos pacientes com AINHS. Isto contribui ainda mais para a existência de tantas dúvidas em relação à patogênese da doença.

Em relação aos parâmetros clínicos, observamos tal como na literatura, que os pacientes com EA em uso de anti-TNF- α , quando comparados ao grupo EA+AINHS apresentaram melhora do BASDAI, um questionário que funciona como bom indicativo de atividade clínica e resposta terapêutica. Também observamos que o grupo EA+AINHS apresentou maiores índices de BASDAI quando comparados ao grupo sem medicamento, isto pode indicar que o grupo EA+AINHS estava mais ativo do que o grupo EA sem medicação e potencialmente elegíveis para o uso futuro de anti-TNF- α . Não houve diferença em relação aos outros índices (BASMI e BASFI), o que pode ser explicado pelo fato de que estes questionários levam em conta o dano estrutural, que por vezes é irreversível, principalmente nos casos de doença de longa evolução, mesmo com tratamento eficaz.

Observou-se, também, correlação positiva entre as concentrações séricas de ADA e o índice de atividade BASDAI. Muitos estudos demonstram a correlação entre a atividade da doença e níveis séricos inflamatórios da ADA [38, 95]. Hitoglou e col. [95] demonstraram que concentrações séricas elevadas de ADA tinham uma correlação com a atividade da artrite reumatóide juvenil e lúpus eritematoso sistêmico. Da mesma forma, Sari e col. [38] encontraram o mesmo achado em pacientes com AR. Foi detectada uma correlação negativa entre BASFI e OP. Os estudos sobre este tema são controversos. Em 2009, Chen e col. [87] encontraram uma correlação entre OP e mobilidade física e o estado inflamatório. Taylan e col. [79] encontraram níveis mais baixos de OP em doentes tratados com anti-TNF- α em comparação com pacientes que receberam o tratamento convencional.

6. CONCLUSÕES

1. NO_x , FAO e OP parecem estar relacionados com a patogênese da EA, podendo funcionar com possíveis alvos terapêuticos futuros.
2. Neste estudo, os medicamentos parecem não influenciar na inflamação e na neoformação óssea.
3. ADA parece estar relacionada com atividade da EA.
4. OP parece estar inversamente relacionada com a funcionalidade dos pacientes com EA.

REFERÊNCIAS

1. Hockberg MC, Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH. *Rheumatology*. 2007. 4 ed. P. 1109-1113.
2. Sampaio-Barros P, Azevedo VF, Bonfiglioli R, Campos WR, Carneiro SCS, Carvalho MAP, Gonçalves CR, Hilário MOE, Keiserman MW, Leite NH, Mallmann K, Meirelles ES, Vieira WP, Ximenes AC. Consenso Brasileiro de Espondiloartropatias: Espondilite Anquilosante e Artrite Psoriásica Diagnóstico e Tratamento – Primeira Revisão. *Rev Bras Reumatol*. 2007; 47: 233-242.
3. Gladman DD. Clinical aspects of the spondyloarthropathies. *Am J Med Sci*. 1998; 316: 234-238.
4. Gran Jt, Hiusby G. Clinical, epidemiologic and therapeutic aspects of ankylosing spondylitis. *Curr Opin Rheumatol*. 1998; 10: 292-298.
5. Van Der Linden S, Van Der Heijde D. Ankylosing spondylitis. Clinical features. *Rheum Dis Clin Norh Am*. 1998; 24: 663-676, vii.
6. Sieper J, Brauns J, Ruweit M, Boonen A, Zink A. Ankylosing spondylitis: an Overview. *Ann Rheum Dis*. 2002; 61 (Suppl 3): iii8-18.
7. Rudwaleit M, Van Der Heijde D, Khan MA, Braun J, Sieper J. How to diagnose axial spondyloarthritis early. *Ann Rheum Dis*. 2004; 63: 535-543.
8. Gran Jt, Skomsvoll JF. The outcome of ankylosing spondylitis: a study of 100 pacientes. *Br J Rheumatol*. 1997; 36: 766-771.
9. Sieper J, Appel H, Braun J, Rudwaleit M. Critical Appraisal of Assessment of Structural Damage in Ankylosing Spondylitis: Implications for Treatment Outcomes. *Arthritis Rheum*. 2008; 58: 649-656.
10. Zambrano-Zaragoza JF, Agrz-Cibrian JM, González-Reyes C, Durán-Avelar MJ, Vibanco-Pérez N. Ankylosin Spondylitis: From cell to genes. *Int J Inflam*. 2013; 2013: 1-16.

11. Reveille JD, Arnett FC. Spondyloarthritis: update on pathogenesis and management. *Am J Med.* 2005; 118: 592-603.
12. Rudwaleit M, van der Heijde D, Landewé R, Listing J, Akkoc N, Brandt J, et al. The development of Assessment of Spondyloarthritis International Society (ASAS) classification criteria for axial Spondyloarthritis: validation and final selection. *Ann Rheum Dis.* 2009; 68: 777-783.
13. 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: 361-368.
14. Garrett 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: 2286–2291.
15. Calin A, Garrett S, Whitelock H, Kennedy LG, O’Hea J, Mallorie P, Jenkinson T. A new approach to defining functional ability in ankylosing spondylitis: the development of the Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index. *J Rheumatol.* 1994; 21: 2281–2285.
16. Jenkinson TR, Mallorie PA, Whitelock HC, Kennedy LG, Garrett SL, Calin A. Defining spinal mobility in ankylosing spondylitis (The Bath AS Metrology Index). *J Rheumatol.* 1994; 21: 1694-1698.
17. Cusmanich KG: Validação para a língua portuguesa dos instrumentos de avaliação de índice funcional e índice de atividade de doença em pacientes com espondilite anquilosante. Dissertação de Mestrado em Ciências, Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo. Banco de Tese Capes, 2006.
18. Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *Journal of Pathology.* 2008: 149 – 160.
19. François RJ, Neure L, Sieper J, Braun J. Immunohistological examination of open sacroiliac biopsies of patients with ankylosing spondylitis: detection of tumor necrosis factor α in two patients with early disease and transforming growth factor β in three more advanced cases. *Ann Rheum Dis.* 2006; 65: 713-720.
20. Appel H, Maier R, Wu P, Scheer R, Hempfing A, Kayser R, Thiel A, Radbruch A, Lodenkemper C and Sieper J. Analysis of IL-17+ cells in facet joints of patients with spondyloarthritis suggests that the innate

- immune pathway might be of greater relevance than the Th17-mediated adaptive immune Response. *Arthritis Res Ther.* 2011; 13: R95.
21. Yeremenko and Baeten. IL-17 in spondyloarthritis: is the T-party over? *Arthritis Res Ther.* 2011; 13: 115.
 22. Miossec P, Kolls JK. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. *Nat Rev Drug Discov.* 2012; 11: 763-776.
 23. Rahman P, Inman RD, Gladman DD, Reeve JP, Peddle L, Maksymowych WP. Association of interleukin-23 receptor variants with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 2008;58: 1020-1025.
 24. Shen H, Goodall JC, Hill Gaston JS. Frequency and phenotype of peripheral blood Th17 cells in ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheum.* 2009; 60: 1647-1656.
 25. Martin MU, Wesche H. Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin 1 receptor family. *Biochim Biophys Acta.* 2002; 592: 265-280.
 26. Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood.* 2011; 117: 3720-3732.
 27. Vazquez-Del Mercado M, Garcia-Gonzalez A, Muñoz-Valle JF, Garcia-Iglesias T, Martinez-Bonilla G, Bernard-Medina G, Sanchez-Ortiz A, Ornelas-Aguirre JM, Salazar-Paramo M, Gamez-Nava JI, Gonzalez-Lopez L. Interleukin 1 β (IL-1 β), IL-10, tumor necrosis factor- α and cellular proliferation index in peripheral blood mononuclear cells in patient with ankylosing spondylitis. *J Rheumatol.* 2002; 29: 522-526.
 28. Bal A, Unlu E, Bahar G, Aydog E, Eksioglu E, Yorgancioglu R. Comparison of serum IL-1 β , sIL-2R, IL-6, and TNF- α levels with disease activity parameters in ankylosing spondylitis. *Clin Rheumatol.* 2007; 26: 211-215.
 29. Braun J, Bollow M, Neure L, Seipelt E, Seyrekbasan F, Herbst H, Eggens U, Distler A, Sieper J. Use of immunohistologic and in-situ hybridisation techniques in the examination of sacroiliac joint biopsy specimens from patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 1995; 38: 449-505.
 30. Schoels MM, van der Heijde D, Breedveld FC, Burmester GR, Dougados M, Emery P, Ferraccioli G, Gabay C, Gibofsky A, Gomez-Reino JJ, Jones G, Kvien TK, Murakami M, Nishimoto N, Smolen JS. Blocking the effects of interleukin-6 in rheumatoid arthritis and other inflammatory rheumatic diseases: systematic

- literature review and meta-analysis informing a consensus statement. *Ann Rheum Dis.* 2013; 72: 583-589.
31. Rose-John S, Scheller J, Elson G, Jones SA. Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. *J Leukoc Biol.* 2006; 80: 227-236.
 32. Navarro-Millán I, Singh JA, Curtis JR. Systematic review of tocilizumab for rheumatoid arthritis: a new biologic agent targeting the interleukin-6 receptor. *Clin Ther.* 2012; 34: 788-802.
 33. Fröde TS, Medeiros YS. Myeloperoxidase and adenosine-deaminase levels in the pleural fluid leakage induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. *Mediators of Inflammation.* 2001; 10: 223-227.
 34. Karakoc M, Altindag O, Keles H, Soran N, Selek S. Serum oxidative–antioxidative status in patients with ankylosing spondylitis. *Rheumatol Int.* 2007; 27:1131–1134.
 35. Stamp LK, Khalilova I, Tarr JM, Senthilmohan R, Turner R, Haigh RC, Winyard PG and Kettle AJ. Myeloperoxidase and oxidative stress in rheumatoid arthritis. *Rheumatology.* 2012; 51:1796-1803.
 36. Desrosiers M.D et al. Adenosine deamination sustains dendritic cell activation in inflammation. *Journal of Immunology.* 2007: 1884-1892.
 37. Van Ede AE, Laan RF, De Abreu RA, Stegeman AB, van de Putte LB. Purine enzymes in patients with rheumatoid arthritis treated with methotrexate. *Ann Rheum Dis.* 2002; 61: 1060-1064.
 38. Sari RA, Taysi S, Yilmaz O, Bakan N. Correlation of serum levels of adenosine deaminase activity and its isoenzymes with disease activity in rheumatoid arthritis. *Clin Exp rheumatol.* 2003; 21: 87-90.
 39. Zakeri Z, Izadi S, Niazi A, Bari Z, Zendeboodi S, Shakiba M, Mashhadi M, Narouie B, Ghasemi-Rad M. Comparison of adenosine deaminase levels in serum and synovial fluid between patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Int J Clin Exp Med.* 2012; 5: 195-200.
 40. Camargo U, Toledo RA, Cintra JR, Nunes DP, Acayaba de Toledo R, Brandão de Mattos CC, Mattos LC. Lack of association of the G22A polymorphism of the ADA gene in patients with ankylosing spondylitis. *Genet Mol Res.* 2012 May 7;11: 1178-1184.
 41. Babior BM. NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol.* 2004; 16: 42-47.

42. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol.* 2005; 77: 598-625.
43. Prokopowicz Z, Marcinkiewicz J, Katz DR, Chain BM. Neutrophil myeloperoxidase: soldier and statesman. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2012; 60: 43-54. doi: 10.1007/s00005-011-0156-8.
44. Metzler KD, Fuchs TA, Nauseef WM, Reumaux D, Roesler J, Schulze I, Wahn V, Papayannopoulos V, Zychlinsky A. Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. *Blood.* 2011; 117:953-9.
45. Yazici C, Köse K, Calis M, Kuzugüden, Kirnap M. Protein oxidation status in patients with ankylosing spondylitis. *Rheumatology.* 2004; 43: 1235-1239.
46. Lotz M. The role of nitric oxide in articular cartilage damage. *Rheum Dis Clin North Am.* 1999; 25: 269-282.
47. Ho KJ, Chen PQ, Chang CY, Lu FJ. The oxidative metabolism of circulating phagocytes in ankylosing spondylitis: determination by whole blood chemiluminescence. *Ann Rheum Dis.* 2000; 59: 338-341.
48. Goodstone NJ, Hardingham TE. Tumour necrosis factor alpha stimulates nitric oxide production more potently than interleukin-1beta in porcine articular chondrocytes. *Rheumatology (Oxford).* 2002; 41: 883-891.
49. Karkucak M, Capkin E, Alver A, Akyuz A, Kiris A, Ak E, Topbas M, Tosun M.. The effect of anti-TNF agent on oxidation status in patients with ankylosing spondylitis. *Clin Rheumatol.* 2010; 29: 303-307.
50. Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med.* 2006;12:17-25.
51. Boyce BF, Xing L. The RANKL/ RANK/ OPG pathway. *Curr Osteoporos Rep.* 2007; 5: 98-104.

52. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 1997; 89: 309-19.
53. Burgess TL, Qian Y, Kaufman S, Ring BD, Van G, Capparelli C, Kelley M, Hsu H, Boyle WJ, Dunstan CR, Hu S, Lacey DL. The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J Cell Biol*. 1999; 145:527-538.
54. Xing L, Schwarz EM, Boyce BF. Osteoclast precursors, RANKL/RANK, and immunology. *Immunol Rev*. 2005; 208:19-29.
55. Maruotti N, Corrado A, Neve A, Cantatore FP. Systemic effects of Wnt signaling. *J Cell Physiol*. 2013; 228:1428-1432.
56. Diarra D, Stolina M, Polzer K, Zwerina J, Ominsky MS, Dwyer D, Korb A, Smolen J, Hoffmann M, Scheinecker C, van der Heide D, Landewe R, Lacey D, Richards WG, Schett G. Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat Med*. 2007; 13:156-163.
57. Orimo H. The Mechanism of Mineralization and the Role of Alkaline Phosphatase in Health and Disease. *J Nippon Med Sch*. 2010; 77: 4-12.
58. Braun J, Brandt J, Listing J, Zink A, Alten R, Golder W, et al. Treatment of active ankylosing spondylitis with infliximab: a randomised controlled multicentre trial. *Lancet*. 2002; 359:1187–1193.
59. Davis JC Jr, Van Der Heijde D, Braun J, Dougados M, Cush J, Clegg DO, Kivitz A, Fleischmann R, Inman R, Tsuji W; Enbrel Ankylosing Spondylitis Study Group. Recombinant human tumor necrosis factor receptor (etanercept) for treating ankylosing spondylitis: a randomized, controlled trial. *Arthritis Rheum*. 2003; 48: 3230–3236.
60. Van der Heijde D, Kivitz A, Schiff MH, Sieper J, Dijkmans BA, Braun J, et al for the ATLAS Study Group. Efficacy and safety of adalimumab in patients with ankylosing spondylitis: results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum*. 2006; 54: 2136–2146.
61. Van der Heijde D, Landewe R, Ory P, Vosse D, Zhou L, Tsuji W et al. Two-year etanercept therapy does not inhibit radiographic progression in patients with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis*. 2006; 65 Suppl II: 81.
62. Wanders A, van der Heijde D, Landewe R, Behier JM, Calin A, Olivieri I et al. Nonsteroidal antiinflammatory drugs reduce

- radiographic progression in patients with ankylosing spondylitis: a randomized clinical trial. *Arthritis Rheum.* 2005; 52:1756–1765.
63. Van der Heijde D, Landewe R, Deodadar A, Baker D, Han J, Xu W, et al. Radiographic progression in patients with ankylosing spondylitis after 2 years of treatment not inhibited with infliximab. *Ann Rheum Dis.* 2007; 66 Suppl II: 85–86.
 64. Pedersen SJ, Hetland ML, Sørensen IJ, Ostergaard M, Nielsen HJ, Johansen JS. Circulating levels of interleukin-6, vascular endothelial growth factor, YKL-40, matrix metalloproteinase-3, and total aggrecan in spondyloarthritis patients during 3 years of treatment with TNF α inhibitors. *Clin Rheumatol.* 2010; 29:1301-1309.
 65. Appel H, Janssen L, Listing J, Heydrich R, Rudwaleit M, Sieper J. Serum levels of biomarkers of bone and cartilage destruction and new bone formation in different cohorts of patients with axial spondyloarthritis with and without tumor necrosis factor-alpha blocker treatment. *Arthritis Res Ther.* 2008; 10: R125.
 66. Song IH, Poddubnyy DA, Rudwaleit M, Sieper J. Benefits and risks of ankylosing spondylitis treatment with nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Arthritis and Rheum.* 2008; 58: 928-930.
 67. Sarzi-Puttini P, Santandrea S, Boccassini L, Panni B, Caruso I. The role of NSAIDs in psoriatic arthritis: evidence from a controlled study with nimesulide. *Clin Exp Rheumatol.* 2001; 19 (1 Suppl 22): S17-20.
 68. Rao TS, Currie, JL Shaffer AL, Isakson PC. Comparative evaluation of arachidonic acid (aa)- and tetradecanoylphorbol acetate (tpa)-induced dermal inflammation. *Inflammation.* 1993; 17: 723–741.
 69. Giusti G, Galanti B. Adenosine deaminase: colourimetric method. *Methods of enzymatic analysis.* Verlag Chemie. 1984, Weinheim, p. 315-323.
 70. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry.* 1982; 126:131-138.
 71. WMA Declaration of Helsinki - Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects (2008). <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>. Accessed 6 september 2012.
 69. Toussiro E, Lafforgue P, Boucraut J, Despieds P, Schiano A, Bernard D, Acquaviva PC. Serum levels of interleukin 1-beta, tumor necrosis

- factor-alpha, soluble interleukin 2 receptor and soluble CD8 in seronegative spondylarthropathies. *Rheumatol Int.* 1994; 13: 175-180.
70. Sonel B, Tutkak H, Düzgün N. Serum levels of IL-1 beta, TNF-alpha, IL-8, and acute phase proteins in seronegative spondyloarthropathies. *Joint Bone Spine.* 2002; 69: 463-467.
71. Gratacós J, Collado A, Filella X, Sanmartí R, Cañete J, Llena J, Molina R, Ballesta A, Muñoz-Gómez J. Serum cytokines (IL-6, TNF-alpha, IL-1 beta and IFN-gamma) in ankylosing spondylitis: a close correlation between serum IL-6 and disease activity and severity. *Br J Rheumatol.* 1994; 33: 927-931.
72. Sieper J, Porter-Brown B, Thompson L, Harari O, Dougados M. *Ann Rheum Dis.* Assessment of short-term symptomatic efficacy of tocilizumab in ankylosing spondylitis: results of randomised, placebo-controlled trials. 2014; 73: 95-100.
73. Shahara S, Huang Q, Mandelin AM 2nd, Pope RM. *Arthritis Res Ther.* TH-17 cells in rheumatoid arthritis. 2008; 10: R93.
74. Fitch E, Harper E, Skorcheva I, Kurtz SE, Blauvelt A. Pathophysiology of psoriasis: recent advances on IL-23 and Th17 cytokines. *Curr Rheumatol Rep.* 2007; 9: 461-467.
75. Singh R, Aggarwal A, Misra R. Th1/Th17 cytokine profiles in patients with reactive arthritis/undifferentiated spondyloarthropathy. *J Rheumatol.* 2007; 34: 2285-2290.
76. Taylan A, Sari I, Kozaci DL, Yuksel A, Bilge S, Yildiz Y, Sop G, Coker I, Gunay N, Akkoc N. Evaluation of the T helper 17 axis in ankylosing spondylitis. *Rheumatol Int.* 2012; 32: 2511-2515.
77. 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: 618-623.
78. Ersoy Y, Ozerol E, Baysal O, Temel I, MacWalter RS, Meral U, Altay ZE. Serum nitrate and nitrite levels in patients with rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, and osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2002; 61: 76-78.
79. Ozgocmen S, Sogut S, Ardicoglu O, Fadillioglu E, Pekkutucu I, Akyol O. Serum nitric oxide, catalase, superoxide dismutase, and malondialdehyde status in patients with ankylosing spondylitis. *Rheumatol Int.* 2004; 24: 80-83.

80. Baraliakos X, Haibel H, Listing J, Sieper J, Braun J. Continuous long-term anti-TNF therapy does not lead to an increase in the rate of new bone formation over 8 years in patients with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis*. 2013 / doi:10.1136/annrheumdis-2012-202698.
81. Braun J, Baraliakos X, Hermann KG, Deodhar A, van der Heijde D, Inman R, Beutler A, Zhou Y, Xu S, Hsu B. The effect of two golimumab doses on radiographic progression in ankylosing spondylitis: results through 4 years of the GO-RAISE trial. *Ann Rheum dis*. 2013/ doi:10.1136/annrheumdis-2012-203075.
82. Kown SR, Lim MJ, Suh CH, Park SG, Hong YS, Yoon BY, Kim HA, Choi HJ, Park W. Dickkopf-1 level is lower in patients with ankylosing spondylitis than in healthy people and is not influenced by anti-tumor necrosis factor therapy. *Rheumatol Int*. 2012; 32: 2523-2527.
83. Kim HR, Lee SH, Kim HY. Elevated serum levels of soluble receptor activator of nuclear factors-kappa B ligand (sRANKL) and reduced bone mineral density in patients with ankylosing spondylitis (AS). *Rheumatology (Oxford)*. 2006; 45:1197-1200.
84. Chen CH, Chen HA, Liao HT, Liu CH, Tsai CY, Chou CT. Soluble receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin in ankylosing spondylitis: OPG is associated with poor physical mobility and reflects systemic inflammation. *Clin Rheumatol*. 2010; 29: 1155-1161.
85. Taylan A, Sari I, Akinci B, Bilge S, Kozaci D, Akar S, Colak A, Yalcin H, Gunay N, Akkoc N. Biomarkers and cytokines of bone turnover: extensive evaluation in a cohort of patients with ankylosing spondylitis. *BMC Musculoskelet Disord*. 2012; 13:191.
86. Daoussis D, Andonopoulos AP, Liossis SN. Wnt pathway and IL-17: novel regulators of joint remodeling in rheumatic diseases. Looking beyond the RANK-RANKL-OPG axis. *Semin Arthritis Rheum*. 2010; 39: 369-383.
87. Daoussis D, Liossis SN, Solomou EE, Tsanakti A, Bounia K, Karampetsou M, Yiannopoulos G, Andonopoulos AP. Evidence that DKK-1 is dysfunctional in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum*. 2010; 62: 150-158.

88. Song IH, Poddubny DA, Rudwaleit M, Sieper J. Benefits and risks of ankylosing spondylitis treatment with nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Arthritis Rheum.* 2008; 58: 929-938.
89. Henderson C, Davis JC. Drug insight: anti-tumor-necrosis-factor therapy for ankylosing spondylitis. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2006; 2:211-218.
90. Dougados M, van der Linden S, Leirisalo-Repo M, Huitfeldt B, Juhlin R, Veys E, et al. Sulfasalazine in the treatment of spondylarthropathy: a randomized multicenter, double-blind, placebo-controlled study. *Arthritis Rheum.* 1995; 38: 618-627.
91. Senabre-Gallego JM, Santos-Ramírez C, Santos-Soler G, Salas-Heredia E, Sánchez-Barrioluengo M, Barber X, Rosas J. Long-term safety and efficacy of etanercept in the treatment of ankylosing spondylitis. *Patient Prefer Adherence.* 2013; 7: 961-972.
92. Hitoglou S, Hatzistilianou M, Gougoustamou D, Athanassiadou K, Kotsis A, Catriu D. Adenosine deaminase activity and its isoenzymes pattern in patients with juvenile rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol.* 2001; 20: 411-416.

ANEXOS

Anexo 1 - Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI)

BASDAI, VALIDADO PARA O PORTUGUÊS

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 cm
Nenhum		Intenso

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

0		10 cm
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 cm
Nenhum		Intenso

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

0		10 cm
Nenhum		Intenso

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

0		10 cm
Nenhum		Intenso

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

0	30 min	1h	1h30	2h
---	--------	----	------	----

BASDAI: soma dos valores das questões 1, 2, 3, 4 e a média dos valores da 5 e 6, dividindo este total por 5.

Anexo 2 - Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index (BASFI)

BASFI, VALIDADO PARA O PORTUGUÊS

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 cm
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 cm
Fácil	Impossível

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

0	10 cm
Fácil	Impossível

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

0	10 cm
Fácil	Impossível

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

0	10 cm
Fácil	Impossível

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

0	10 cm
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 cm
Fácil	Impossível

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

0	10 cm
Fácil	Impossível

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

0	10 cm
Fácil	Impossível

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

0	10 cm
Fácil	Impossível

BASFI: Somatório dos valores em cm anotados nas EVA é dividido por 10 e dado o valor final.

Índice Metrológico de Espondilite Anquilosante
(The Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index)

	Pontuação (<i>Score</i>)		
	0	1	2
Distância parede-trago <i>Wall-tragus distance</i>	<15 cm	15~30 cm	>30 cm
Flexão lombar <i>Lumbar flexion</i>	>4 cm	2~4 cm	< 2 cm
Rotação cervical <i>Cervical rotation</i>	> 70°	20~70°	< 20°
Flexão lombar lateral <i>Lumbar side flexion</i>	> 10cm	5~10 cm	< 5 cm
Distância intermaleolar <i>Intermalleolar distance</i>	> 100 cm	70~100 cm	< 70 cm

Anexo 4 – Termo de Consentimento livre e esclarecido

CONSENTIMENTO INFORMADO: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Consentimento pós informação

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

A Espondilite Anquilosante é uma doença crônica, que não possui cura, que acomete principalmente a coluna e quadris, causando dor importante nestes locais além de dificuldade de mobilização. Se não tratada, pode evoluir com deformidade severas e irreversíveis, o que pode trazer sérios problemas socio-econômicos ao portador. Tendo em vista esta possível gravidade, é importante que pesquisas ocorram para descobrir e aperfeiçoar medicamentos que possam tornar esta doença mais amena.

Termos de Participação e assinatura

Pesquisa: Avaliação de marcadores inflamatórios e de metabolismo ósseo em pacientes com Espondilite Anquilosante

Responsáveis: Kenia Rodrigues de Andrade, Profa. Dra. Tânia Silvia Fröde

Dados do paciente

Nome do paciente:.....

Data de nascimento:.....RG:.....CPF:.....

End:.....

Fone:

Eu, abaixo assinado, aceito participar voluntariamente de uma pesquisa para estudar os parâmetros de inflamação nos pacientes com espondilite anquilosante. A pesquisa será feita por um questionário e por coleta de sangue de veia periférica. Por tratar-se de procedimento invasivo, a coleta de sangue apresenta alguns riscos , incluindo dor local, tromboflebite, formação de ecimoses e alergia ao curativo. Sei que os riscos serão minimizados pelo emprego de métodos adequados que terei suporte adequado em caso de intercorrências. O material coletado servirá para análise de citocinas. Sei que posso sair do estudo em qualquer momento e que isso não irá prejudicar o meu tratamento no ambulatório de Reumatologia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina.

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

Data Assinatura do
paciente ou responsável

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

Kenia Rodrigues de Andrade

Telefones:

Kenia Rodrigues de Andrade —(48) 91585001

Profa. Dra. Tânia Silvia Fröde – (48) 9961-4846

Anexo 5 - Protocolo de coleta de dados

Protocolo de coleta de dados - Avaliação de marcadores inflamatórios e metabolismo em pacientes com Espondilite Anquilosante

Número do registro da pesquisa _____ Número do questionário _____

Médico assistente _____ Data da coleta ____/____/2012

Nome: _____

Idade: _____ Sexo: _____ Cor: _____

Prontuário: _____

Data de nascimento: _____ Naturalidade: _____

Estado civil: _____ Profissão: _____

Endereço: _____

Bairro: _____ Nº: _____

Complemento: _____

Cidade/estado: _____

Telefone residencial _____ Telefone celular: _____

Email: _____

Tabagista: () Sim () Não Etilista: () sim () Não

Ano diagnóstico: _____

Tempo doença em anos: _____

Peso: _____ Altura: _____

Critério modificado de Nova York

1) Critérios Clínicos

S() N() Lombalgia e rigidez com duração superior a 3 meses, que melhora com o exercício, mas não alivia com o repouso.

S() N() Limitação da mobilidade da coluna lombar nos planos sagital e frontal

S() N() Limitação da expansão torácica relacionada aos valores normais de acordo com a idade e sexo

2) Critério Radiológico

S() N() Sacroilíte: bilateral grau maior ou igual a 2, ou unilateral graus 3 ou 4

EA é diagnosticada: Critério radiológico associado a pelo menos 1 critério clínico.

- Forma acometimento: () Periférico () Axial () Periférico+axial

Questionário sobre medicamentos

	sim	Não	Dose	Data início	Descrição
AINHs (≥ 4 semanas)					
Prednisona					
SSZ					
MTX					
anti-TNF- α					
Leflunomida					
Outros:					

Anexo 6
Artigo submetido a revista