



Università degli Studi Del Molise

Dipartimento di Medicina e Scienze della Salute  
“Vincenzo Tiberio”

*Tesi di Dottorato in Medicina Traslazionale e Clinica  
XXXI ciclo*

**Spondiloartriti assiali: dalla patogenesi della  
neoformazione ossea alla valutazione di  
possibili biomarcatori di attività di malattia e  
remissione clinica**

Relatore/ Tutor

Candidato

Prof. Ennio Lubrano di Scorpaniello

Dott. Fabio Massimo Perrotta

ANNO ACCADEMICO 2017-2018

# INDICE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Cap 1. La Spondilite Anchilosante ed il concetto di Spondiloartrite assiale radiografica e non radiografica</b> | <b>3</b>  |
| 1.1. Definizione   | 3         |
| 1.2. Epidemiologia   | 5         |
| 1.3. Patogenesi  | 7         |
| 1.4. Manifestazioni cliniche   | 12        |
| 1.5. Le entesi   | 15        |
| 1.6. Imaging   | 28        |
| 1.7. Esami di laboratorio  | 35        |
| 1.8. Diagnosi  | 36        |
| 1.9. Prognosi e Terapia  | 37        |
| 1.10. Clinimetria  | 41        |
| <br>   |           |
| <b>Cap 2. Fisiopatologia del rimodellamento osseo nelle Spondiloartriti assiali</b>                                | <b>45</b> |
| 2.1. Introduzione  | 45        |
| 2.2. Fattori genetici  | 46        |
| 2.3. La neoformazione ossea nelle SpA: aspetti molecolari  | 48        |
| <br>   |           |
| <b>Cap. 3. Contributo originale</b>  | <b>70</b> |
| 3.1. Introduzione  | 70        |
| 3.2. Materiali e Metodi  | 72        |
| 3.3. Analisi statistica  | 73        |
| 3.4. Risultati   | 74        |
| 3.5. Discussione   | 91        |
| <br>   |           |
| <b>BIBLIOGRAFIA</b>  | <b>94</b> |

# Cap 1. LA SPONDILITE ANCHILOSANTE E IL CONCETTO DI SPONDILOARTRITE ASSIALE RADIOGRAFICA E NON RADIOGRAFICA

## 1.1. Definizione

La Spondilite Anchilosante (SA) è una patologia infiammatoria cronica e sistemica che colpisce primariamente lo scheletro assile (articolazioni sacro-iliache e colonna vertebrale) e, meno frequentemente, le articolazioni periferiche degli arti, conducendo alla fibrosi progressiva ed, infine, all'ossificazione (anchilosi) delle strutture coinvolte (1).

La SA è classificata nel gruppo delle patologie reumatiche definite Spondiloartriti (SpA), caratterizzate dalla negatività per il fattore reumatoide (FR), dalla presenza di dolore infiammatorio cronico al rachide (*back pain*) e dal coinvolgimento di strutture articolari (entesopatia) ed extra-articolari: occhio (uveite anteriore), cute (psoriasi), intestino, parenchima polmonare (interstiziopatia), cuore e vasi (2).

Diversi criteri classificativi sono stati utilizzati per raggruppare patologie diverse ma con comuni caratteristiche. Recentemente l'*Assessment of Spondyloarthritis International Society* (ASAS) ha proposto una nuova classificazione, nell'ambito della quale è prevista la suddivisione fra spondiloartriti assiali (axSpA) con impegno prevalente della colonna e delle articolazioni sacro-iliache e spondiloartriti periferiche (3).

Le spondiloartriti assiali possono essere ulteriormente suddivise in spondiloartriti assiali non radiografiche (nr-axSpA) e spondiloartriti assiali radiografiche (**tabella 1.1.**). In particolare, la SA è classificata tra le spondiloartriti assiali radiografiche, nelle quali il processo

infiammatorio esita nella neo-apposizione ossea. Al contrario, la forma non radiografica può rappresentare una fase precoce, nella quale la patologia non ha ancora prodotto lesioni visibili alla radiografia convenzionale (3), o secondo altre evidenze, una nuova entità clinica con caratteristiche peculiari.

**Tabella 1.1.** Criteri classificativi ASAS per le spondiloartriti assiali

| <b>PAZIENTI &lt; 45 Anni e dolore lombare da più di 3 mesi</b>   |  |
|--|--|
| <b>EVIDENZA DI SACROILEITE ALL'IMAGING* +<br/>≥ 1 manifestazione clinica delle SpA **</b>  | <b>HLA-B27 positivo +<br/>≥ 2 manifestazioni clinica delle SpA</b> |
| <b>** Manifestazioni di SpA</b>  |  |
| <ul style="list-style-type: none"><li>• Dolore lombare infiammatorio</li><li>• Artrite</li><li>• Entesite (tallone)</li><li>• Uveite</li><li>• Dattilite</li><li>• Psoriasi</li><li>• Malattia di Crohn/colite</li><li>• Buona risposta ai FANS</li><li>• Familiarità per SpA</li><li>• HLA-B27</li><li>• Elevati livelli di PCR</li></ul> |  |
| <b>* Evidenza di sacroileite all'<i>imaging</i></b>  |  |
| <ul style="list-style-type: none"><li>➤ Infiammazione acuta attiva (EDEMA OSSEO) alla RM, fortemente indicativa di sacroileite associata a SpA</li><li>➤ Sacroileite definita radiograficamente secondo i criteri NY modificati</li></ul>  |  |

## ***1.2. Epidemiologia***

Le SpA assiali sono patologie che colpiscono una popolazione prevalentemente giovane: l'età media di insorgenza è, infatti, di circa 25 anni, con un range compreso tra 6 e 64 anni, mentre l'età media alla diagnosi è di circa 33 anni (range 14-71) (4)

La distribuzione della SA in base al sesso ha caratteristiche tipiche: la patologia colpisce prevalentemente i maschi, con un rapporto M/F di

circa 2:1 (1), mentre diversi studi hanno dimostrato come nell'ambito dell'intero gruppo delle SpA assiali il rapporto maschi femmine sia di circa 1:1 e vi sono report che confermano una lieve prevalenza del sesso femminile nelle nr-axSpA (5).

Diverse casistiche hanno messo in evidenza una incidenza della SA compresa tra 0,5 e 14 per 100,000 persone/anno, mentre la prevalenza risulta compresa tra 0,1% e 1,4%, come dimostrato dai vari studi pubblicati in letteratura (1).

In particolare, in uno studio condotto su una coorte finlandese, Julkunen ha riscontrato una prevalenza pari a 1,03% (6). Gran et al., valutando un ampio periodo di osservazione, compreso fra il 1960 e il 1993, in una coorte norvegese, ha identificato una prevalenza dello 0,26% (7). Una prevalenza più elevata, pari al 6,2%, è stata inoltre identificata negli indiani Haida del Canada (8), mentre Gömör ha rilevato nella popolazione ungherese una prevalenza pari allo 0,4% nei soggetti di sesso maschile e allo 0,08% in quelli di sesso femminile (9). I risultati degli studi suddetti suggeriscono una distribuzione differente della patologia nelle diverse popolazioni: questo potrebbe essere determinato da fattori genetici.

La SA ha inoltre una caratteristica peculiare rispetto alle altre spondiloartriti ed artriti infiammatorie: essa infatti risulta associata nel 90-95% dei casi con l'antigene leucocitario umano HLA-B27. Solo il 5-10% dei pazienti con SA presenta alplotipi del sistema HLA diversi dal B27.

La prevalenza dell'HLA-B27 è differente nelle varie popolazioni: il valore più alto è stato identificato in popolazioni arruolate in Canada, Stati Uniti e Russia, dove raggiunge il 50%, mentre risulta più bassa in Cina, Giappone e nel continente Africano (< 10%). Tuttora, il significato della distribuzione dell'allele B27 nelle differenti etnie è sconosciuto. Tuttavia, da ciò deriva che la prevalenza di SA è tanto

maggiore quanto maggiore è la prevalenza di HLA-B27 all'interno delle diverse popolazioni. (4)

L'HLA-B27 sembra associato anche all'età di insorgenza della malattia: uno studio condotto da Feldtkeller e al. su un campione di 1080 pazienti affetti da SA ha evidenziato un esordio più precoce (circa 3 anni) e manifestazioni cliniche più gravi nei soggetti HLA-B27+ rispetto ai soggetti B27 negativi (10). Recenti studi hanno inoltre dimostrato un simile prevalenza nella presenza dell'HLA-B27 tra pazienti affetti da SA e nr-axSPA.

### ***1.3. Patogenesi***

Allo stato attuale, l'esatto meccanismo patogenetico che porta allo sviluppo delle SpA assiali non è ancora completamente definito. Certamente, si tratta di patologie a patogenesi multifattoriale, che vede implicati fattori scatenanti di tipo ambientale e fattori predisponenti di tipo genetico e immunologico. L'interazione fra questi fattori determina lo sviluppo della malattia.

#### ***- Fattori genetici***

Il ruolo dell'HLA-B27 nella patogenesi delle Spondiloartriti e in particolare nella SA è riconosciuto da circa 30 anni. Diversi studi attribuiscono all'HLA-B27 una associazione con la SA che va dal 60 al 95%. Inoltre, numerosi studi epidemiologici hanno mostrato come la malattia sia più diffusa nelle popolazioni che presentano una maggiore prevalenza dell'HLA-B27 nel loro corredo genetico (12). Meno evidente, ma comunque consistente, è l'associazione con artrite psoriasica e artrite reattiva che in alcuni studi è stata dimostrata nel 20-40% dei pazienti in relazione all'impegno periferico o assiale (13). Il

diretto coinvolgimento dell'allele B27 è stato riscontrato anche in modelli murini: Hammer e collaboratori hanno rilevato una patologia simile alle SpA in ceppi di cavie transgeniche che esprimevano l'HLA-B27 umano associato alla  $\beta$ 2-microglobulina (14).

L' HLA-B27 è una proteina di classe I costituita da tre  $\alpha$ -domini legati, in modo non covalente, alla  $\beta$ 2-microglobulina. Vi sono circa 24 sottotipi del sistema HLA-B27, alcuni dei quali (B\*2705, il B\*2702, il B\*2704 e il B\*2707) risultano maggiormente associati con la SA (15). Il ruolo dell'allele B27 nella patogenesi della SA è determinato dalla capacità della molecola da esso codificata di presentare peptidi self ai linfociti. L'ipotesi patogenetica più accreditata è quella del cosiddetto "mimetismo molecolare": un agente batterico attiverebbe i linfociti T CD8+ citotossici (CTL) mediante il riconoscimento di peptidi esogeni; l'analogia di questi peptidi con peptidi "artritogeni" self presentati dal B27 determinerebbe la cross-reazione dei CTL contro i peptidi self, con conseguente sviluppo di uno stato infiammatorio e di danno tissutale (16,17).

A sostegno di questa ipotesi patogenetica vi è l'identificazione di CTL ristretti per HLA-B27 diretti contro epitopi self a livello del liquido sinoviale di pazienti affetti da SA. Inoltre, è stata dimostrata la diminuzione della prevalenza dell'artrite in topi transgenici esprimenti una proteina con alta affinità per il B27 (17), L'HLA-B27 sarebbe anche in grado di interagire con i linfociti T CD4+ e con molecole presenti sulla superficie di cellule Natural Killer e monociti, benché non sia ancora chiaro quale sia il significato di tale interazione (16).

Un ruolo importante nella patogenesi della SA potrebbe essere svolto da un alterato ripiegamento dell'HLA-B27, determinato da modificazioni post-traduzionali che avvengono a livello del reticolo endoplasmatico. Ciò determinerebbe l'accumulo di catene aberranti all'interno del reticolo stesso, con conseguente attivazione di fattori di



trascrizione, quali l'NF-kB, e successiva secrezione di citochine pro-infiammatorie, tra le quali il TNF (18,19). L'effettivo ruolo svolto da questa alterazione conformazionale dell'HLA-B27 nella patogenesi delle SpA, ed in particolare della SA, è ancora oggetto di numerosi studi (20).

Altre varianti genetiche, diversi dall' HLA-B27 sono state associate alla suscettibilità per SA.

Fra questi, altri alleli della regione HLA, in particolare DR1 e B60. Inoltre, sono in corso numerosi studi allo scopo di identificare altre varianti associate alla suscettibilità per la patologia: in particolare, sono in corso analisi su varianti dei geni codificanti per TNF, per il recettore dell'IL-23, IL-1 ed ERAP1 (21,22).

#### - *Fattori ambientali*

Come già precedentemente riportato, la teoria del mimetismo molecolare prevede una iniziale interazione con peptidi di origine esogena, probabilmente batterici, i quali indurrebbero una reazione di tipo autoimmune da parte di linfociti T. Studi effettuati su modelli murini di SpA (topi ANKLE) hanno dimostrato che la patologia non si sviluppa nelle cavie poste in ambiente asettico ("germ-free"), mentre si manifesta in cavie infettate con batteri appartenenti alla comune flora intestinale. Ciò confermerebbe la necessità di antigeni microbici per lo sviluppo della malattia (23).

Inoltre, dati epidemiologici sostengono questa ipotesi: la presenza di un'infezione batterica, precedente allo sviluppo della patologia, è descritta in circa il 60% dei casi. Gli agenti infettivi più frequentemente identificati sono risultati i batteri del genere Chlamydia, Shigella, Salmonella, Yersinia e Campilobacter. In particolare, la Chlamydia è stata identificata nel liquido sinoviale di pazienti affetti da SA, come dimostrato dalla presenza del DNA batterico individuato tramite

tecniche PCR. Questo batterio sarebbe in grado di modulare la risposta infiammatoria dell'ospite, riducendo l'espressione di molecole del complesso maggiore di istocompatibilità, ed aumentando l'espressione della *heat shock protein 60* (24). Nell'ambito del ruolo patogenetico svolto dal meccanismo di mimetismo molecolare, appare interessante l'omologia di sequenza fra antigeni della *Klebsiella Pneumoniae* ed il sottotipo \*2705 dell'HLA-B27 (24).

Fra le varie ipotesi proposte, è stato suggerito come l'intrappolamento a livello da parte di macrofagi intestinali, tonsillari o periodontali, di microorganismi resistenti alla fagocitosi possa essere il meccanismo responsabile della produzione di antigeni cross-reattivi (25).

Più recentemente è stato descritto il possibile ruolo esercitato da fattori di tipo traumatico, mediante l'attivazione di processi di flogosi cronica articolare. Difatti, in letteratura sono stati descritti diversi casi di monoartrite esordita successivamente ad un episodio traumatico; in alcuni di questi la malattia monoarticolare ha presentato un andamento cronico, con successivo sviluppo di poliartrite periferica (26,27).

#### - ***Fattori immunologici***

I fattori immunologici giocano un ruolo importante nella patogenesi della SA. Le citochine di maggior interesse sono il TNF, l'Interleuchina (IL)-10 l'IL-12, l'IL-22, l'IL-23, l'IL-17 ed infine, l'interferon- $\gamma$ .

Molte esperienze hanno dimostrato una produzione citochinica aberrante nei pazienti con SA: nel corso dello sviluppo della patologia si registra un aumento della risposta Th1 e Th17 e un incremento della produzione di TNF e IL-17. Inoltre, nell'ambito della risposta infiammatoria all'infezione da parte di batteri endogeni del gruppo dei *Bacteroides*, è stata dimostrata una significativa diminuzione nella produzione di IL-10. Tale citochina, come ampiamente dimostrato, si caratterizza per una marcata azione anti-infiammatoria (28).

Recentemente, un impulso importante alla comprensione dei meccanismi patogenetici della SA è stato determinato dalla scoperta di una classe di linfociti CD3+/CD4-/CD8- presenti a livello delle entesi, responsabili della produzione di citochine pro-infiammatorie, tra le quali TNF, IL-22, IL-17 (29).

Inoltre, studi condotti su modelli murini hanno dimostrato come elevati livelli di IL-23 siano sufficienti ad indurre i classici segni della patologia; e l'inibizione dell'IL-23, attuata attraverso l'utilizzo di anticorpi monoclonali, migliora i segni dell'infiammazione a livello delle articolazioni e delle entesi (29).

Le SpA e come altre patologie immuno-mediate (IMID) sono caratterizzate da un continuum che vanno dall'autoimmunità all'autoinfiammazione dove la risposta immunitaria innata è attivata da specifici trigger tissutali, come microrganismi o microtraumi (30). Le SpA non sono associate ad autoanticorpi specifici della malattia e non mostrano predominanza femminile, così da discostarsi dalle caratteristiche classiche delle malattie autoimmuni.

In passato, alcuni studi hanno considerato la patogenesi della SpA (SA in particolare) come un coinvolgimento adattivo della risposta immunitaria; tuttavia in una recente visione le SpA sono classificate come una malattia autoimmune in cui il sistema immunitario innato svolge un ruolo importante (31).

Sperimentazioni cliniche con terapie mirate alle cellule B e T (abatacept, alefacept, efalizumab e rituximab) hanno mostrato un'efficacia terapeutica molto modesta nelle SpA sottolineando che la mancanza di le caratteristiche autoimmuni classiche spiegherebbe l'ipotesi che la risposta immunitaria adattativa sia non primaria nelle SpA (32).

#### ***1.4. Manifestazioni cliniche***

In accordo con il gruppo di patologie alle quali appartengono, la manifestazione clinica più importante, e anche più precoce, delle SpA assiali è il dolore lombare di tipo infiammatorio o *inflammatory back pain* (IBP), associato a rigidità mattutina e, in una elevata percentuale di pazienti, a stanchezza cronica e facile affaticabilità. La definizione di IBP elaborata da Calin è stata successivamente utilizzata nei criteri dell'European Spondyloarthritis Study Group (ESSG) e, con alcune modifiche, nei criteri di Amor per le SpA, nei criteri modificati di New York e nei criteri ASAS (3,32,33). Recentemente sono stati individuati, in accordo con gli esperti ASAS, cinque parametri che contribuiscono alla definizione di IBP:

- 1) età all'esordio minore dei 40 anni;
- 2) esordio insidioso;
- 3) miglioramento del dolore con l'esercizio fisico;
- 4) nessun miglioramento con il riposo;
- 5) dolore notturno (34).

L'interessamento delle articolazioni sacro-iliache rappresenta la manifestazione principale della SpA e si presenta tipicamente con dolore lombare, spesso coinvolgente la regione glutea, con irradiazione fino al ginocchio. La limitazione funzionale dei movimenti del bacino e dell'arto inferiore si associa frequentemente alla sintomatologia dolorosa. Particolari manovre possono essere utili per rivelare i segni e i sintomi dell'interessamento sacro-iliaco.

Infine, il dolore tende a scomparire quando il processo infiammatorio esita nell'anchilosi articolare. A differenza dell'anchilosi del rachide, l'anchilosi a carico delle articolazioni sacroiliache non limita la capacità di movimento del cingolo pelvico e della colonna lombare.

Da un punto di vista esclusivamente clinico, la manifestazione più evidente e invalidante delle SpA è l'interessamento rachideo,

caratterizzato dalla infiammazione delle articolazioni intersomatiche, interapofisarie e interspinose. Nella maggior parte dei casi la regione lombare risulta essere quella più frequentemente coinvolta. Tale coinvolgimento si manifesta con dolore e limitazione della motilità e perdita della fisiologica lordosi lombare sul piano sagittale. Il test di Schober è utile nell'identificazione della riduzione della motilità: esso viene eseguito mediante la misurazione dell'escursione nella lunghezza del tratto lombare in estensione ed in flessione. Una escursione inferiore ai 4 cm è indice di ridotta motilità. Più recentemente, è stata validata una versione modificata (test di Shober modificato), risultata più sensibile: in particolare l'escursione del tratto lombare viene misurata su una distanza di 15 cm (10 cm superiormente e 5 cm inferiormente al processo spinoso di L5). Una escursione inferiore ai 4 cm è indice di ridotta motilità. In fase attiva di malattia, la pressione sui processi spinosi può risvegliare vivo dolore. Nonostante la maggior parte dei pazienti si presenti all'esordio con interessamento della regione lombare, è possibile all'esordio un coinvolgimento del tratto cervicale, dorsale o delle articolazioni condro-sternali, con un dolore toracico in grado di mimare un'angina atipica o una pericardite.

Segni dell'interessamento di queste sedi sono, oltre al dolore di tipo infiammatorio, la difficoltà nella flesso-estensione, nella lateroflessione e nella rotazione della colonna cervicale. Infine, si può riscontrare la diminuzione dell'escursione del torace tra massima espirazione ed inspirazione, dovuta all'interessamento delle articolazioni condro-sternali e costo-vertebrali.

Nelle fasi più avanzate della patologia si registrano delle modificazioni caratteristiche del rachide: in particolare, l'aumento della cifosi dorsale e l'irrigidimento della colonna cervicale possono provocare un atteggiamento in flessione della testa e del dorso. Indici utili per la valutazione clinica sono la misura della distanza occipite – muro e della

distanza trago – muro, che si ottiene ponendo il soggetto in piedi appoggiato ad una parete verticale. Tali misurazioni risulteranno aumentate nei pazienti affetti da SpA assiali, in particolare quando le lesioni di tipo neoappositivo si estendono al rachide. (1,35).

Accanto all'interessamento della colonna, è possibile lo sviluppo di un'artrite periferica nel 30-50% dei casi (3)

Tale manifestazione è di solito mono o oligo-articolare: il coinvolgimento dei cingoli (anche e spalle) risulta essere quello più frequente (20% dei casi); più raro è l'interessamento delle caviglie, dei gomiti e dei polsi (1).

Una percentuale di soggetti variabile fra il 10 e il 20% può presentare una dattilite o “dito a salsicciotto”, che si caratterizza per una tumefazione dell'intero dito, dovuta a una tenosinovite dei tendini flessori.

Le manifestazioni extra-articolari rappresentano un aspetto rilevante. Esse possono manifestarsi a carico della cute, dell'occhio, della mucosa intestinale e più raramente dell'apparato cardio-polmonare.

In particolare, la manifestazione extra-articolare più frequente nei soggetti affetti da SpA assiale è rappresentata dall'uveite, soprattutto di tipo anteriore: essa è descritta nel 25-30% dei pazienti durante il decorso della malattia (4). Uno studio condotto su una popolazione Nord-Americana ha riportato una prevalenza pari al 50% dell'allele HLA-B27 nei soggetti con uveite; questo suggerirebbe l'associazione di questo specifico fattore genetico anche con il fenotipo di malattia, oltre che con la suscettibilità (36). Di solito, l'uveite associata a SA regredisce senza lasciare esiti (37).

Fra le altre possibili manifestazioni extra-articolari ricordiamo la psoriasi, lo sviluppo di una sindrome restrittiva secondaria a fibrosi polmonare e, più raramente, l'amiloidosi.

## ***1.5. Le Entesi***

La principale caratteristica della SpA assiali, come discusso, è la progressiva calcificazione a livello delle entesi che conduce ad una anchilosi articolare; tale alterazione risulta evidente soprattutto a livello delle articolazioni del rachide e alle sacro-iliache. Tuttavia, recenti studi hanno dimostrato una notevole variabilità nel tasso di progressione radiografica dei pazienti affetti da SpA assiali (38) ed inoltre, circa il 20% dei pazienti affetti da nr-axSpA non progredirà verso una forma manifesta di SA (38).

Per comprendere le basi anatomiche e i meccanismi fisiopatologici che conducono allo sviluppo delle alterazioni tipiche delle SpA, negli ultimi anni l'attenzione dei ricercatori si è rivolta verso l'entesi.

Secondo la definizione classica, le entesi sono le sedi anatomiche ove tendini, legamenti, fasce e capsule articolari, si ancorano all'osso (39). La valutazione di tali strutture risulta essere particolarmente complessa, non solo per l'elevato numero di entesi presenti nel corpo, ma anche per la loro particolare morfologia (40). Nonostante ciò, la presenza di un processo infiammatorio localizzato a livello di tale sedi (*entesite*) è la caratteristica che accomuna le spondiloartriti assiali e periferiche. Alla luce di queste considerazioni, lo studio delle entesi è fondamentale per comprendere la patogenesi ed in particolare i meccanismi che portano alla produzione ossea.

### ***- Anatomia dell'entesi***

Da un punto di vista istologico, i fasci di fibre collagene, costituenti il corpo dei tendini e dei legamenti, in prossimità dell'osso esitano in una zona di transizione, costituita da elementi cellulari cartilaginei che sostituiscono gli elementi fibrotici nelle sedi adiacenti alla giunzione.

Lo spessore di questa zona è variabile, tuttavia le cellule di tipo cartilagineo sono distinguibili per la maggiore dimensione e per l'accumulo di matrice al loro interno (46).

In base alla loro struttura, alla composizione e alla localizzazione nel corpo, le entesi presentano alcune differenze. Vengono identificati essenzialmente due tipi (40):

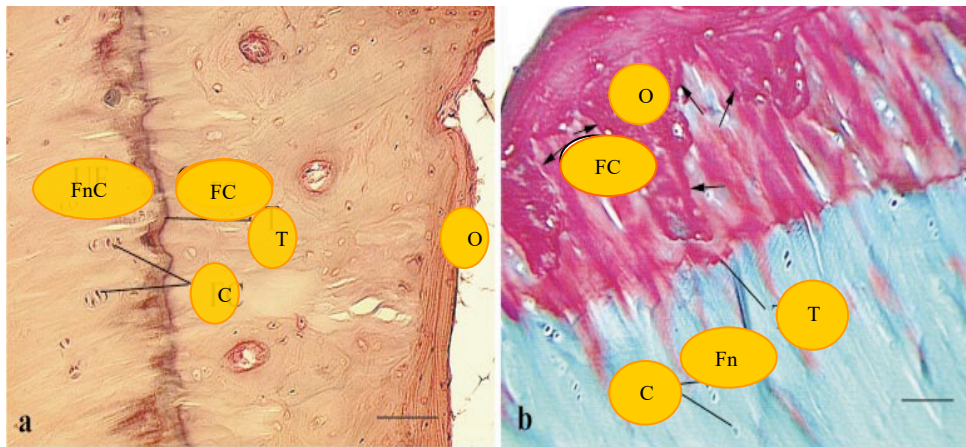
- Entesi di tipo fibrocartilagineo
- Entesi di tipo fibroso.

Le entesi di tipo fibrocartilagineo sono tipiche dell'inserzione di tendini e legamenti sulle epifisi o sulle apofisi ossee, e si riscontrano al livello delle piccole ossa della mano e del piede ed in numerosi legamenti delle vertebre spinali. Sono entesi di tipo indiretto in quanto istologicamente sono costituite da una zona di connettivo denso, simile al connettivo presente nel corpo del tendine, da una zona di fibrocartilagine non calcificata, da una zona di fibrocartilagine calcificata ed infine, dal piatto osseo sottocondrale. Tra la zona di fibrocartilagine non calcificata e quella di cartilagine calcificata si apprezza una linea continua, la *tidemark* o fronte di calcificazione, che compare durante l'adolescenza (40) (**figura 1.5.1**).

Le entesi di tipo fibroso, o di tipo diretto, sono caratteristiche delle inserzioni tendinee o legamentose sulla superficie diafisaria delle ossa, come ad esempio l'inserzione del tendine del muscolo deltoide sulla diafisi omerale. In questo caso, le fibre collagene del tendine si continuano direttamente con quelle ossee.

Nonostante questa classificazione, studi approfonditi hanno dimostrato come una singola entesi possa presentare entrambe le caratteristiche suddette e quindi essere sia di natura fibrosa che cartilaginea. In particolare, la porzione più superficiale può presentare una struttura fibrosa, mentre quella più profonda fibrocartilaginea (40).





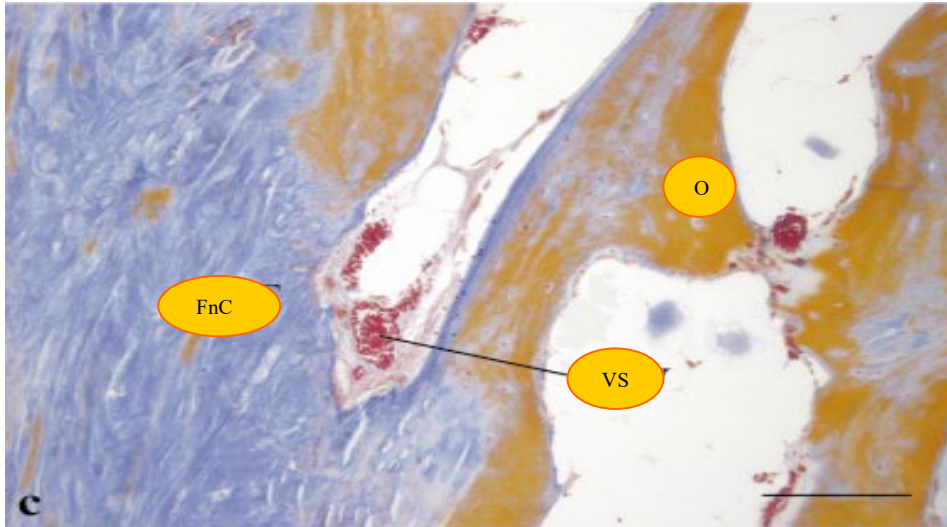
**Figura 1.5.1** Microfotografia di preparato istologico di entesi. **a.** Ematossilina-eosina. Si distinguono la fibrocartilagine non calcificata (FnC), la fibrocartilagine calcificata (FC), la linea di calcificazione *tidemark* (T), le cellule cartilaginee (C), l'osso subcondrale (O). **b.** Colorazione tricromica di Masson, si nota come la linea che separa l'osso dalla fibrocartilagine calcificata sia molto più irregolare rispetto alla *tidemark*.

Il fronte di calcificazione, nelle entesi fibrocartilaginee, ha un aspetto regolare e decorre in modo lineare, dividendo nettamente la zona calcificata dalla zona non calcificata; al contrario, il confine tra osso sottocondrale e cartilagine calcificata ha un aspetto più sfumato e irregolare. Le quattro zone creano, inoltre, cambiamenti delle proprietà meccaniche dell'interfaccia tendine/legamento – osso. Studi eseguiti per la rilevazione della densità tissutale hanno dimostrato, infatti, una maggiore densità per la fibrocartilagine calcificata rispetto all'osso sottocondrale (42).

Tra le entesi fibrocartilaginee vi sono: le inserzioni del tendine di Achille e della fascia plantare sul calcagno, l'inserzione del tendine quadricipitale sulla rotula e del tendine rotuleo sulla tuberosità tibiale, le inserzioni muscolari al livello della cresta iliaca, del pube e della

tuberosità ischiatica, le inserzioni sui condili femorali, tibiali, omerali e sulla testa della fibula, oltre alle inserzioni dei tendini dei muscoli estensori e flessori delle dita sia a livello delle mani che dei piedi (43). Inoltre, l'articolazione sacroiliaca è sede di numerose entesi formate dai legamenti che uniscono i due segmenti ossei.

Una delle peculiarità della fibrocartilagine entesale è l'assenza di vascolarizzazione (40). Come avviene anche in altre parti del corpo, nelle quali è presente tessuto cartilagineo, anche a livello dell'entesi il supporto nutrizionale è garantito dalla capacità di diffusione delle macromolecole all'interno della matrice fibrocartilaginea. L'assenza di vasi è spiegata dall'evidenza che le forze di trazione, che agiscono a questo livello, tenderebbero ad obliterare il lume vasale. Nonostante ciò, vi possono essere comunicazioni vascolari tra osso midollare e porzione fibrosa del tendine o del legamento, in quanto, anche nelle entesi fibrocartilaginee "pure", sono presenti aree di attacco fibroso diretto all'osso, probabilmente per migliorare l'apporto di nutrienti e macromolecole al tessuto cartilagineo (40). Inoltre, osservazioni istologiche hanno documentato la presenza di vasi anche all'interno della fibrocartilagine calcificata (**figura 1.5.2**). Questi ultimi giocano un ruolo chiave nella formazione ossea nel periodo della crescita, durante il quale, le entesi sono sede di ossificazione endondrale: tale fenomeno avviene per la progressiva invasione, da parte di vasi provenienti dall'osso spugnoso, della fibrocartilagine entesale. Questo fenomeno sarebbe determinato dall'apoptosi delle cellule cartilaginee, che determinerebbe la formazione di lacune, occupate successivamente dai vasi. La fibrocartilagine si forma, poi, più a monte, in seguito a metaplasia dei fibroblasti presenti nel corpo del tendine o legamento. Lo sviluppo dei vasi è controllato da una serie di fattori pro-angiogenetici e anti-angiogenetici, tra i quali il Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) e l'endostatina (43).

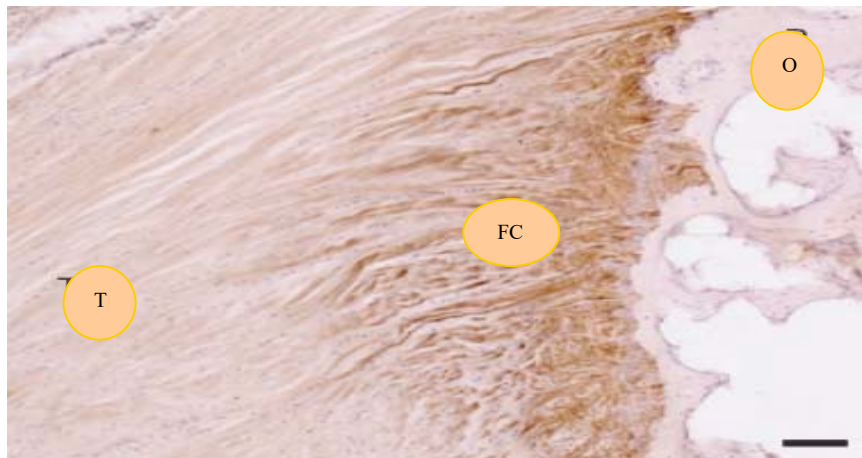


**Figura 1.5.2.** Campione colorato con Azan. Vasi sanguigni (VS) al confine tra osso (O) e fibrocartilagine non calcificata (FnC).

A livello delle entesi sono, invece, molto rappresentate le fibre nervose, in particolare terminazioni libere delle fibre di tipo A e C che conducono la sensibilità dolorifica: questo giustifica la sintomatologia dolorosa avvertita in corso di coinvolgimento patologico (40).

Dal punto di vista istochimico, le entesi sono molto difficili da studiare a causa della loro anatomia e dell'arduo campionamento. Le difficoltà derivano essenzialmente dall'assenza di un limite netto tra tessuto fibroso e fibrocartilagine non calcifica, dalla distribuzione non uniforme dei condrociti e dalla frequente localizzazione in sede profonda delle strutture tipicamente cartilaginee (43). I dati più attendibili derivano soprattutto dallo studio dell'entesi del tendine d'Achille: a questo livello è stata rilevata la presenza di collagene di tipo I, II, III, V, VI e di vari proteoglicani quali aggrecano, versicano, lumicano (**figura 1.5.3**). La presenza di collagene di tipo II e di aggrecano è stata individuata solo a livello della zona fibrocartilaginea, rendendo queste molecole un marcatore di fibrocartilagine entesale

(40). Fra le altre molecole, individuate tramite metodiche immunoistochimiche, ricordiamo la tenascina C, la cui espressione è stata messa in relazione con le modifiche del carico meccanico che si verifica a livello entesale, e il collagene di tipo XI, (40).



**Figura 1.5.3.** Preparato immunoistochimico per il collagene di tipo II. Inserzione del tendine estensore sulla falange del 2° dito. La fibrocartilagine entesale (FC) si colora molto più intensamente rispetto all'osso (O) e al tendine (T)

#### - *Funzioni delle entesi*

Il ruolo principale dell'entesi è quindi quello di creare un solido legame tra due tessuti a consistenza differente, il tessuto fibroso e il tessuto osseo.

La proprietà fondamentale che un'inserzione deve possedere è, dunque, una notevole forza coesiva, che conferisca resistenza alla trazione meccanica. Il sito critico di ancoraggio è rappresentato dall'interfaccia tra fibrocartilagine calcificata e osso subcondrale, area molto complessa in cui tralci di tessuto fibroso, cartilagineo e osseo si intersecano irregolarmente, formando un “*mosaico*” istologico altamente coesivo.

Grande importanza riveste tuttavia anche l'apertura a ventaglio delle fibre collagene che amplia notevolmente il sito di inserzione (40).

Mentre la fibrocartilagine calcificata esplica prevalentemente la funzione di ancoraggio, la fibrocartilagine non calcificata ha invece un ruolo diverso, ovvero di disperdere lo stress meccanico che si genera durante le modificazioni di ampiezza dell'angolo inserzionale. Questa proprietà è dovuta alla capacità della fibrocartilagine non calcificata di resistere alla compressione. L'elevata concentrazione di aggregato, in virtù della sua capacità di attrarre acqua dai capillari, sarebbe alla base della resistenza di questa struttura. Per altro, in tal sede, la presenza della fibrocartilagine non calcificata svolge anche funzione di cuscinetto, attenuando il brusco restringimento del tendine che si verifica durante la contrazione muscolare. In questa fase il tendine al contempo va incontro ad allungamento e restringimento, diventando una possibile fonte di traumatismo per l'inserzione (40).

L'entesi fibrocartilaginea da questo punto di vista non è un tessuto statico bensì dinamico, in quanto si è dimostrato che la quantità di fibrocartilagine aumenta o diminuisce in maniera direttamente proporzionale ai livelli di stress meccanico: per esempio, è aumentata nel ginocchio del saltatore ed è ridotta nei tendini estensori delle dita dei pazienti con artrite reumatoide, per la ridotta motilità articolare dovuta alla patologia di base (40). L'aumento della tensione meccanica dà origine ad una vera e propria ipertrofia della fibrocartilagine.

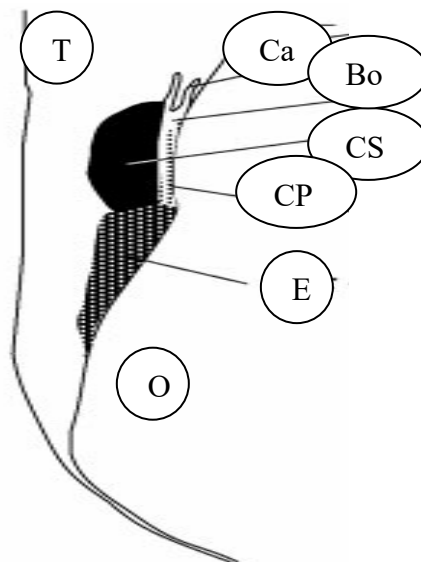
Le funzioni principali dell'entesi, ancoraggio all'osso e dissipazione dello stress, hanno bisogno di essere supportate da una complessa struttura anatomica, più estesa dell'entesi stessa, che coinvolge vari tessuti.

#### - *L' "organo" entesi*

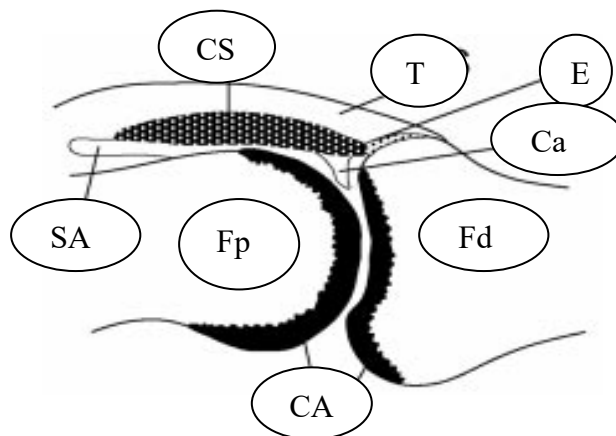
Il concetto classico di entesi, inteso come sede dell'inserzione di un tendine, un legamento o una capsula sull'osso, è stato attualmente rivisto, grazie alla dimostrazione che alcuni dei tessuti adiacenti all'entesi sono funzionalmente correlati ad essa, così da poter essere definiti nell'insieme "organo entesi" (**figure 1.5.4 e 1.5.5**).

La sede anatomica ove l'interazione di questi è più evidente è senza dubbio il tendine d' Achille, definito infatti come *premiere enthesis* (41). A questo livello è possibile evidenziare le differenti componenti dell'*organo entesi*:

- L'entesi propriamente detta
- La fibrocartilagine periostea
- La fibrocartilagine sesamoide
- La borsa
- Un cuscinetto adiposo



**Figura 1.5.4** Rappresentazione schematica dell'*organo* entesi al livello dell'inserzione del tendine d'Achille. Rapporti tra entesi propriamente detta (E), fibrocartilagine periosteale (CP), fibrocartilagine sesamoide (CS), borsa retrocalcaneale (Bo) e cuscinetto adiposo (Ca). (O) osso, (T) tendine.



**Figura 1.5.5.** Rappresentazione schematica dell'*organo* entesi. (CA) cartilagine articolare, (SA) spazio articolare, (Fp e Fd) falange prossimale e distale.

La fibrocartilagine sesamoide è adesa alla porzione terminale del tendine e, insieme alla fibrocartilagine periosteale che ricopre l'osso, avvolge la membrana sinoviale della borsa. Questa peculiare disposizione anatomica consente di proteggere l'osso e il tendine dagli insulti meccanici. In altre sedi, ad esempio nelle zone in cui tendini e legamenti sopravanzano una articolazione, per inserirsi su un'epifisi o un'apofisi ossea adiacente, la cartilagine articolare prende il posto della fibrocartilagine periostale, e la cavità articolare il ruolo della borsa. Questo garantisce che una adeguata protezione dall'attrito delle strutture che entrano in contatto durante i movimenti di flessione-estensione (40). Proprio a questo livello si ha, quindi, un'integrazione funzionale tra tendine e/o legamento, entesi propriamente detta, e membrana sinoviale (44).

È interessante constatare la presenza di analogie tra l'*organo* entesi e tutte quelle sedi in cui tendini, legamenti o capsule cambiano bruscamente la loro direzione, facendo leva intorno ad una superficie ossea. In queste sedi infatti tendini o legamenti stringono intimi contatti con l'osso, senza però inserirsi su di esso. Nel punto di contatto è possibile riconoscere aree di fibrocartilagine del tutto affini alle fibrocartilagini sesamoide e periosteale, così che queste regioni sono state denominate *entesi funzionali* (40). Numerosi sono gli esempi di questi punti di contatto: fra questi il tendine del muscolo tibiale posteriore, il quale dal terzo inferiore di gamba raggiunge il piede, svoltando intorno al malleolo laterale; il tendine peroniero, che raggiunge le ossa del piede ruotando intorno al malleolo mediale; il tendine del bicipite brachiale, che a livello del gomito, prende stretto contatto con la tuberosità radiale (40).

La particolare anatomia dell'*organo* entesi spiega come alterazioni patologiche, interessanti primitivamente le entesi, possono estendersi



alle strutture contigue, coinvolgendo le guaine tendinee, la sinovia articolare, la borsa e l'osso sottocondrale.

- *Correlazioni anatomo-cliniche e patogenesi*

Nella SA come nelle SpA in generale, l'impegno entesitico è alla base della maggior parte delle manifestazioni cliniche: comprendere gli esatti meccanismi patogenetici dell'infiammazione entesale è, quindi, di fondamentale importanza per la gestione e per i risvolti terapeutici dei pazienti.

Abbiamo già considerato che l'entesi non è semplicemente la sede di attacco di tendini, legamenti e fasce all'osso; essa è da considerarsi un *organo* complesso che comprende strutture diverse, la cui funzione primaria è dissipare lo stress trazionale e quindi proteggere osso e tendine dall'attrito (40). La stessa funzione però, espone la fibrocartilagine entesale a microtraumi ripetuti con successivi fenomeni riparativi. La sede più frequentemente interessata dai traumatismi è il piatto osseo sottocondrale: questo potrebbe giustificare il frequente riscontro di osteite in corso di SpA.

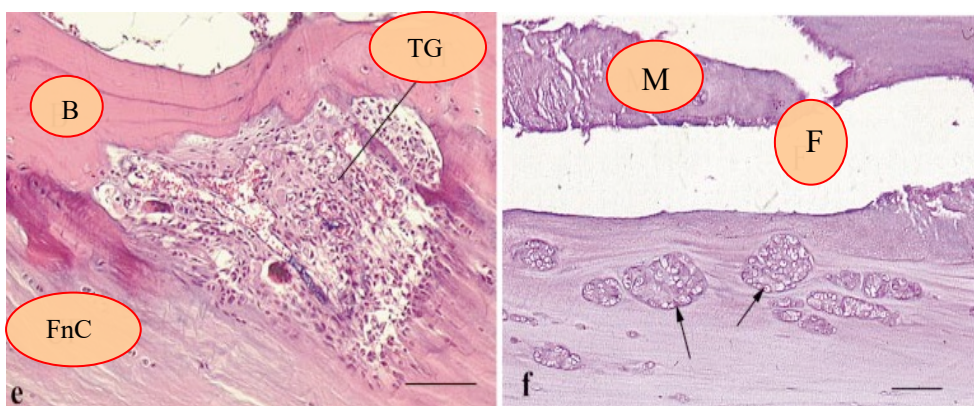
Da un punto di vista istologico, è possibile identificare diverse modificazioni: in particolare, fessurazioni contenenti materiale amorfo, tessuto di granulazione, speroni ossei (entesofiti), degenerazione ialina e calcificazioni (**figura 1.5.6**). Le fessurazioni e le lesioni longitudinali sono molto simili alle fessurazioni che si ritrovano nella cartilagine articolare dei pazienti con osteoartrosi (40). E' inoltre possibile riscontrare aumento della vascolarizzazione, infiltrato infiammatorio, fenomeni di distruzione ossea.

Lo studio condotto da Benjamin e collaboratori ha inoltre dimostrato come le entesi possano andare incontro a processi di tipo degenerativo, e che il loro substrato anatomo-patologico è costituito dalla presenza di

calcificazioni, ipo-ipercellularità, ipertrofia delle cellule fibrocartilaginee e fessurazioni (44).

Per quanto riguarda le entesiti infiammatorie, nei pazienti affetti da SA è stato riscontrato un aumento di linfociti T CD4+ e T CD8+ associato ad uno stato di infiammazione cronica.

Un recente lavoro ha però messo in evidenza che le cellule più rappresentate all'interno di un'entesi infiammata sono i macrofagi, mentre appare più rara la presenza di linfociti T (45). Questo suggerirebbe un ruolo per l'immunità innata nella patogenesi dell'entesite ed in generale delle SpA. Recettori Toll – Like sono stati infatti identificati a livello delle entesi e oltre ad interagire con peptidi batterici, possono interagire con molecole provenienti dal tessuto danneggiato, inoltre nuove evidenze stanno suggerendo un ruolo sempre più importante dei microtraumi e della conseguente risposta infiammatoria con produzione di IL-23 ed IL-17 nonché di prostaglandine nello sviluppo del danno erosivo e della successiva neoformazione ossea (45).



**Figura 1.5.6 e:** tessuto di granulazione (TG) che si estende dalla fibrocartilagine non calcificata (FnC) fino al piatto osseo sub condrale (O). **f:** fessurazione (F) della fibrocartilagine con materiale metacromatico di riparazione (M).

## ***1.6. Imaging***

Le tecniche radiologiche più frequentemente utilizzate per la diagnosi ed il monitoraggio dei pazienti affetti da SpA assiale sono la radiografia convenzionale e la risonanza magnetica. L' esame radiografico dello scheletro assiale e delle articolazioni sacro-iliache è stato per molti anni usato per valutare la presenza di alterazioni morfologiche delle vertebre, erosioni, neoformazione ossea o anchilosi.

La presenza di una sacroileite è la prima manifestazione radiologica della malattia. Le articolazioni sacro-iliache ed in particolare la superficie articolare, si presentano inizialmente indistinte, irregolari e slargate; nelle fasi successive sono visibili erosioni dell'osso sub-condrale e sclerosi dei margini. Le lesioni sono generalmente bilaterali e simmetriche ed il versante iliaco è generalmente interessato prima di quello sacrale. Con il progredire della patologia si giunge alla totale anchilosi dei due segmenti ossei: radiologicamente, non è più visibile lo spazio articolare e vi è fusione del versante sacrale con quello iliaco. **(figura 1.6.1 e 1.6.2).**

Sebbene la presenza di sacroileite sia uno dei criteri diagnostici di New York (33), questa manifestazione non tuttavia è specifica per la SA, come dimostrato dal suo riscontro anche nel 60% dei casi di sindrome di Reiter e nei pazienti con artrite psoriasica. In queste patologie però è spesso monolaterale e l'anchilosi si verifica più raramente (46).

Allo scopo di valutare la presenza del danno a livello sacro-iliaco, nell'ambito dei criteri di New York è stato proposto uno score per la sacroileite radiografica, da applicare soprattutto nella pratica clinica.

Questo score prevede 5 gradi, di seguito riportati:

**Grado 0** - normale.

**Grado 1** - alterazioni sospette

**Grado 2** - minime anomalie: piccole aree localizzate con erosione o sclerosi, senza alterazione della larghezza dell'articolazione

**Grado 3** – alterazioni inequivocabili: moderate o avanzata sacro-ileite con erosioni, sclerosi evidente, slargamento, restringimento, o anchilosi parziale

**Grado 4:** anchilosi totale.



**Figura 1.6.1** Rx delle articolazioni sacro-iliache in paziente con SA. Si noti l'interessamento bilaterale con la presenza di erosioni, mal definizione dello spazio articolare, sclerosi del versante iliaco.

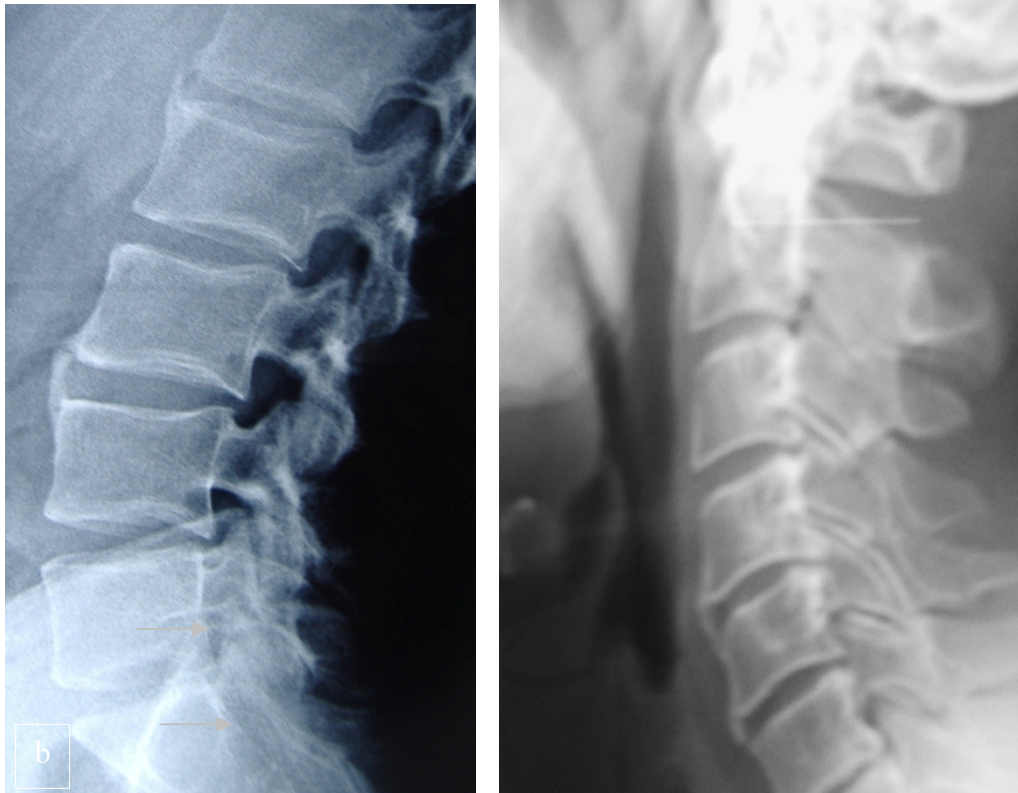


**Figura 1.6.2** Rx delle articolazioni sacro-iliache. Totale anchilosi dei segmenti ossei.

Le alterazioni radiologiche a livello del rachide rappresentano il segno distintivo delle SpA assiali ed in particolare della forma radiografica. Le erosioni degli angoli anteriori dei corpi vertebrali e la sclerosi con perdita della normale concavità vertebrale (segno di Romanus e squaring vertebrale), visibili soprattutto in proiezione latero-laterale rappresentano dei segni precoci del coinvolgimento infiammatorio della colonna (50). Il processo infiammatorio cronico conduce alla ossificazione delle inserzioni degli anelli fibrosi e delle inserzioni di diversi legamenti a livello delle articolazioni interapofisarie, con la formazione dei classici sindesmofiti definiti come ponti di tessuto osseo tra una vertebra e l'altra. Queste alterazioni iniziano soprattutto a livello lombare, ma non è raro coinvolgimento della regione dorsale e cervicale nelle fasi iniziali di malattia. L'interessamento di tutto il rachide conduce alla formazione di bande "a triplo binario" che corrono lungo le vertebre, visualizzabili in proiezione antero-posteriore e responsabili dell'anchilosi della colonna (50).

Nella SA i sindesmofiti sono protrusioni marginali, che originano cioè dalla porzione più periferica dell'anulus fibroso, e sono distribuiti simmetricamente (**figura 1.6.3**). Nell'Artrite Psoriasica con impegno assiale, patologia che è possibile classificare tra le Spondiloartriti assiali in presenza dei segni e sintomi clinici i sindesmofiti sono invece *paramarginali*, originano dallo strato fibroso al di fuori dell'anulus, e sono poi distribuiti in maniera *asimmetrica* e *discontinua*, non

presentandosi in vertebre consecutive. Inoltre, sono più larghi ed hanno un aspetto più grossolano rispetto ai precedenti (51).



**Figura 1.6.3. a.** Sindesmofiti presenti a livello della IV e della II vertebra lombare (freccie). **b.** Sindesmofiti presenti tra la IV e la V e tra la V e la VI vertebra cervicale (freccie).

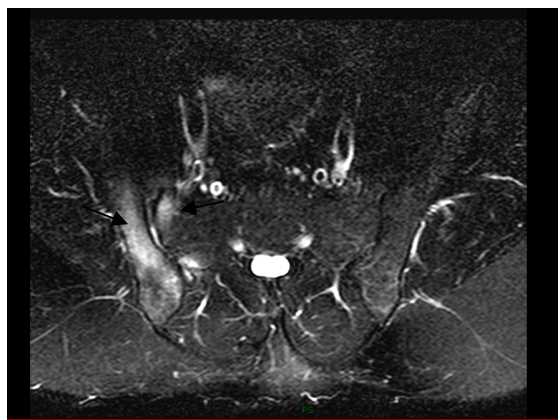
La radiologia tradizionale è utile anche nello studio delle entesi periferiche: esse infatti possono andare incontro a fenomeni di calcificazione e/o ossificazione e divenire visibili radiologicamente come “spine” ossee che emergono dalla superficie ossea, anche conosciute come *entesofiti*.

Il limite della radiologia tradizionale è la sua ridotta sensibilità: solo il 5-10% dei pazienti con malattia di lunga durata presenta almeno una erosione a livello vertebrale, inoltre l’esame radiografico presenta una ridotta sensibilità nella valutazione della sacroileite, anche in termini di valore predittivo. Uno studio condotto su una coorte di 88 pazienti con

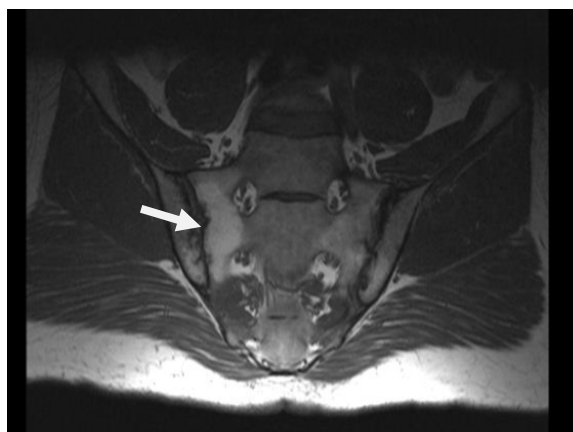
dolore infiammatorio lombare, con radiografia delle articolazioni sacro-iliache che risultava normale al basale, ha messo in evidenza lo sviluppo di una sacro-ileite radiografica dopo 5 anni di follow-up nel 36% dei soggetti (52).

La risonanza magnetica (RM) rappresenta una delle tecniche di imaging più importanti nella diagnosi e gestione dei pazienti con SpA assiali ed, in particolare, nei pazienti con SpA assiale non radiografica, nella quali le alterazioni radiologiche possono essere rappresentate unicamente dalla presenza di infiammazione (edema osseo) a livello delle articolazioni sacro-iliache. Grazie alla maggiore sensibilità rispetto alla radiografia tradizionale ed alla capacità di individuare l'infiammazione a livello dei tessuti molli e dell'osso rappresenta ad oggi una indagine di primo livello specialmente nei pazienti giovani e con breve durata dei sintomi. Diverse esperienze hanno riscontrato una elevata sensibilità della RM nell'identificazione della sacroileite: in presenza di dolore lombare cronico; essa infatti presenta una sensibilità del 66% ed una specificità del 97% per la diagnosi di spondiloartrite assiale (3).

La prima alterazione valutabile con la RM è l'edema dell'osso midollare, indice di osteite, ed evidenziabile come area iperintensa nelle sequenze con soppressione del segnale del grasso (STIR) (**figura 1.6.4**). Questa specifica alterazione si localizza prevalentemente sul versante iliaco dell'articolazione sacro-iliaca, mentre a livello vertebrale, è presente a livello degli angoli anteriori e posteriori dei corpi vertebrali (*segno di Romanus*) (52). L'edema osseo presente a livello delle articolazioni sacro-iliache rappresenta uno dei criteri fondamentali per la diagnosi di SpA assiale, mostrando una specificità del 90%. Altre lesioni strutturali quali erosioni, sclerosi, *fat lesion* o anchilosi possono essere presenti sia a livello delle sacro-iliache che della colonna (**figura 1.6.5, 1.6.6**) (52).

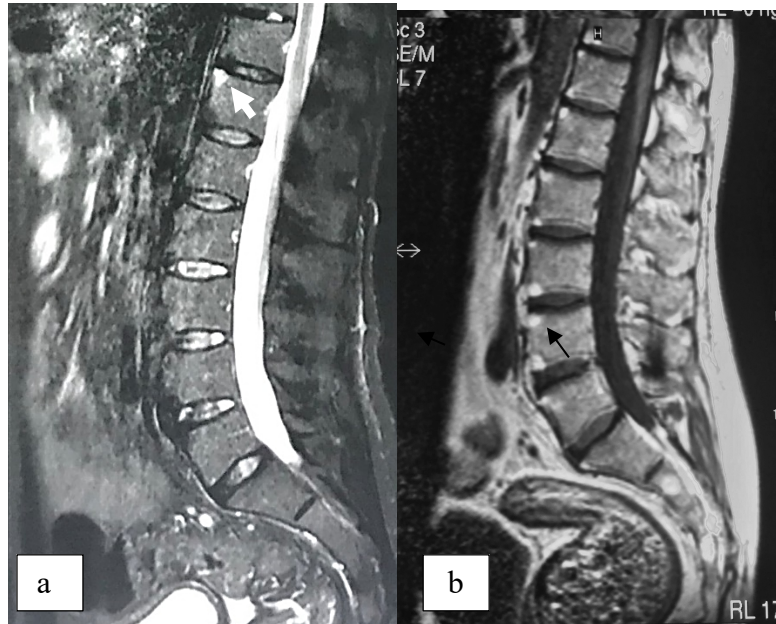


**Figura 1.6.4.** Immagine RM T2 pesata con soppressione del segnale del grasso (sequenze STIR) delle articolazioni sacro-iliache che mostra la presenza di segnale iperintenso, espressione di notevole edema osseo monolaterale (freccie) in entrambi i versanti, sacrale ed iliaco (personal data).



**Figura 1.6.5.** Immagine RM T1 pesata delle articolazioni sacro-iliache che mostra la presenza di segnale iperintenso, espressione di "fat lesion" (freccia bianca) prevalentemente sul versante sacrale della articolazione sacro-iliaca. Si nota inoltre la presenza di grossolane erosioni (personal data).





**Figura 1.6.6.** Immagine RM T2 pesata (a) con soppressione del segnale del grasso (sequenze STIR) che dimostra la presenza di edema osseo a livello degli angoli vertebrali (freccia bianca). Immagine RM T1 (b) pesata della colonna toracolumbare che dimostra la presenza di segnale iperintenso, espressione di “fat lesion” a livello degli angoli vertebrali (freccia nera) (personal data).

Il ruolo dell’ultrasonografia nella gestione della SpA assiali è prevalentemente orientato nell’individuazione della entesite e dell’artrite periferica. L’esame in B-mode, associato al power Doppler è molto sensibile nel rivelare la presenza di alterazioni a livello della giunzione tendine-osso, in particolare la presenza di lesioni erosive, osteo-produttive o strutturali di tendini e legamenti. Attraverso l’utilizzo del power Doppler è possibile valutare la presenza di alterata vascolarizzazione delle entesi, indice di infiammazione (53).

### ***1.7. Esami di Laboratorio***

Non esistono indagini biumorali specifiche per la diagnosi ed il follow-up della SpA assiale.

Nel 75% dei casi è presente un aumento della VES, ma la correlazione con l’attività di malattia, è scarsa (1). La Proteina c reattiva (PCR)

sembra presentare una migliore correlazione. Occorre considerare che comunque, entrambi questi indici di flogosi, presentano una correlazione più forte con l'artropatia periferica piuttosto che con il coinvolgimento assiale.

Sebbene il 30-40% dei pazienti con SpA assiale presenti normali valori di PCR, essa rappresenta un utile parametro diagnostico e prognostico soprattutto nei pazienti con forma non radiografica (54,55). Altre alterazioni osservabili, ma di utilità limitata, sono una lieve anemia normocitica normocromica, l'aumento delle IgA sieriche e dell'isoenzima osseo della fosfatasi alcalina.

Infine, la tipizzazione dell'HLA-B27 è molto utile da un punto di vista diagnostico e deve essere valutato in tutti i pazienti in cui vi sia il sospetto di spondiloartrite sieronegativa. Inoltre, in presenza di dolore lombare infiammatorio cronico, il B27 presenta una specificità vicina al 90% per la diagnosi di SpA assiale (3).

### ***1.8. Diagnosi***

Allo stato attuale, non sono disponibili criteri diagnostici per le SpA assiali. Nel corso degli anni sono stati proposti diversi criteri per la classificazione delle Spondiloartriti grazie a nuove acquisizioni scientifiche ed alla disponibilità di tecniche radiologiche più sensibili.

I primi criteri classificativi proposti per i pazienti affetti da SA sono i criteri di Roma, elaborati nel 1961, sostituiti dai criteri di New York nel 1966 successivamente modificati nel 1984 (**tabella 1.8.1**)(33). Questi ultimi si fondano sulle principali manifestazioni cliniche e radiologiche della patologia e si caratterizzano per una elevata sensibilità (87%) e specificità (97%) nella SA definita. Tuttavia, risultano inadeguati nelle

fasi precoci di malattia, nelle quali i segni clinici e radiografici possono non essere presenti.

**Criteri clinici:**

- Dolore lombare e rigidità con durata superiore a tre mesi che migliora con l'esercizio ma non con il riposo
- Diminuzione della mobilità del rachide sul piano sagittale e frontale
- Diminuzione dell'espansione toracica relativa ai normali valori correlati all'età ed al sesso

**Criterio radiologico:**

- Sacroileite > del 2° bilateralmente o di 3°-4° grado unilateralmente

La diagnosi di SA è definita se al criterio radiologico si associa almeno un criterio clinico

**Tabella 1.8.1.** Criteri di New York modificati nel 1984

La recente disponibilità di nuove tecniche diagnostiche, quali la Risonanza Magnetica, ha permesso la valutazione dei pazienti con dolore infiammatorio lombare in una fase precoce e pre-radiografica. Di conseguenza, il concetto di spondiloartrite indifferenziata, attribuibile ai pazienti con impegno assiale che non soddisfacevano i criteri di New York, ha lasciato spazio al concetto di spondiloartrite assiale (3). I criteri ASAS hanno quindi permesso la distinzione fra due forme di spondiloartrite assiale:

*-radiografica*, caratterizzate dalla presenza di sacroileite radiograficamente evidente, sinonimo di SA;

*-non radiografica*, nelle quale è possibile riscontrare la presenza di una sacroileite mediante RM, definita dalla presenza di edema osseo, oppure, in assenza di reperti di imaging, dalla presenza dell'allele B27 in associazione ad almeno due caratteristiche cliniche di SpA (3) **(tabella 1.1.2).**

Recenti studi hanno inoltre dimostrato come la spondiloartrite assiale nella forma non-radiografica, possa presentare caratteristiche diverse, quali un differente rapporto maschi/femmine, una minore frequenza dell'HLA-B27 ed più bassi livelli di PCR. Circa il 30-80% dei pazienti con forma *non radiografica* progredisce verso una SA, in funzione della durata di malattia (56,57,58).

### ***1.9. Prognosi e terapia***

La SpA assiale è una patologia cronica che può condurre, in assenza di adeguato trattamento, ad una limitazione significativa della funzione articolare e della qualità della vita. La progressione della malattia è maggiore nei primi dieci anni, ma la patologia può mantenersi attiva anche per decenni.

I fattori prognostici negativi sono ancora oggetto di studio, ma è stato verificato che un coinvolgimento precoce dell'anca, la persistenza di elevata attività di malattia (incremento di VES e PCR, riscontro di ipergammaglobulinemia) e la presenza di artrite periferica e dattilite, la presenza di una infiammazione attiva (edema osseo alla risonanza) rappresentano dei fattori prognostici negativi.

Il trattamento della SpA assiale si basa sull'utilizzo di diversi farmaci in associazione al trattamento riabilitativo; lo scopo è quello di ridurre l'attività di malattia e possibilmente prevenire la progressione della patologia.

Gli anti-infiammatori non steroidei (FANS) sono utilizzati sin dagli anni 50' e numerosi studi ne hanno dimostrato la efficacia nel confronto con il placebo. Mediamente, circa il 70 – 80% dei pazienti trattati con FANS riferisce miglioramento della sintomatologia. Alla luce di questa elevata percentuale, la risposta al trattamento con FANS può essere di

ausilio nella diagnosi differenziale tra SpA assiale e altre cause di dolore lombare cronico (59).

Accanto ai FANS tradizionali, più recentemente si sono dimostrati efficaci anche i COXib, inibitori selettivi della ciclo-ossigenasi di tipo II, over-espressa nelle articolazioni dei pazienti con SA. I COXib sembrano presentare la stessa efficacia dei FANS tradizionali, ma presentano un migliore profilo di sicurezza per quanto concerne gli effetti collaterali a livello gastrointestinale. Sulla base di queste evidenze, i FANS ed i COXib sono attualmente considerati come farmaci di prima linea nel trattamento della SpA assiali come previsto dalle recenti raccomandazioni sulla gestione dei pazienti pubblicate dall'ASAS (60).

Oltre all'efficacia nel ridurre i sintomi legati al coinvolgimento assiale, i FANS sono considerati farmaci di prima scelta anche nel trattamento dell'entesite periferica. In casi selezionati oltre al FANS si può ricorrere all' utilizzo di infiltrazioni di corticosteroidi, in particolare in presenza di mono o oligoartrite periferica (60).

A differenza dei dati disponibili per l'artrite reumatoide, i classici DMARDs si sono generalmente rivelati poco efficaci nel trattamento dei pazienti affetti da SpA con impegno assiale. Alcuni studi hanno dimostrato una moderata efficacia della Salazopirina sulle forme di spondiloartrite assiale associate ad artrite periferica, in particolare nel ridurre i segni ed i sintomi della sinovite, senza tuttavia evidenza di una efficacia significativa nel ridurre il dolore lombare, la durata e l'intensità della rigidità mattutina. Analogamente, il farmaco non si è dimostrato efficace nel trattamento dell'entesite periferica (61).

Recentemente la terapia farmacologia della SA si è avvalsa dell'impiego dei farmaci biologici anti TNF (Infiximab, Etanercept, Adalimumab, Certolizumab pegol e Golimumab).

I dati derivanti da numerosi trial clinici randomizzati hanno dimostrato l'efficacia dei farmaci antagonisti del TNF, rispetto al placebo, in termini di riduzione dei parametri infiammatori VES e PCR, miglioramento significativo della rigidità mattutina, del dolore a livello della colonna, della funzionalità articolare e della qualità di vita dei pazienti. Tali farmaci si sono dimostrati efficaci nel trattamento dei sintomi e dei segni della SA e diversi trial clinici ne hanno dimostrato l'efficacia sia nelle forme radiografiche che nelle forme non radiografiche.

L'efficacia dei farmaci anti-TNF è stata dimostrata anche per le altre manifestazioni della SA, come la psoriasi, l'uveite, l'entesite e le malattie infiammatorie intestinali. Inoltre, è stata documentata una riduzione dell'infiammazione al rachide e alle articolazioni sacroiliache mediante valutazione con RMN.

Le più recenti linee guida per il trattamento delle spondiloartriti assiali in generale prevedono come prima linea terapeutica l'utilizzo di almeno due diversi FANS per un periodo totale di 1 mese; in caso di persistenza di elevata attività di malattia è indicato il trattamento con farmaci anti-TNF (60).

Sebbene l'introduzione dei farmaci antagonisti del TNF abbia rappresentato una svolta nel trattamento dei sintomi clinici della SA, è ancora dibattuta l'efficacia di tali farmaci nella riduzione della progressione radiografica della patologia. Una recente revisione della letteratura ha dimostrato come i farmaci biologici siano in grado di ridurre il danno radiografico nella SA, in particolare a lungo termine (62). Recentemente, le nuove acquisizioni in campo patogenetico hanno permesso lo sviluppo di nuovi farmaci con meccanismo d'azione diverso dagli anti-TNF, come l'anti IL-17A secukinumab. Negli studi MEASURE 1 E 2 la somministrazione sottocutanea dell'anti-IL-17 ha dimostrato efficacia nel ridurre l'attività di malattia ed, inoltre, circa

l'80% dei pazienti trattati non presentava una significativa progressione radiografica dopo 4 anni di follow-up (63). Diversi farmaci biotecnologici che inibiscono l'IL-17 come l'Ixekizumab, attualmente indicato per l'artrite psoriasica, e piccole molecole con azione intracellulare (JAK inibitori) sono attualmente in fase avanzata di sperimentazione clinica.

### ***1.10. Clinimetria***

Allo scopo di valutare in modo più specifico i pazienti affetti da tali patologie sono stati sviluppati diversi indici compositi, che includono i principali domini coinvolti dalla patologia. Recentemente l'ASAS ha definito un *core-set* di indici clinimetrici utili nella pratica clinica e nell'attività di ricerca per definire l'attività di malattia, la qualità di vita e l'impegno radiografico. Di seguito sono riportati gli indici inseriti in questo specifico *core-set*:

- *Health Assessment Questionnaire* (HAQ): valutazione selettiva della disabilità funzionale; composto da venti quesiti riguardanti atti della vita quotidiana, suddivisi in otto differenti categorie (lavarsi e vestirsi, alzarsi, camminare, igiene, attività fisica, mangiare, raggiungere ed afferrare oggetti). Ad ogni quesito è possibile rispondere scegliendo tra quattro risposte, corrispondenti al grado di difficoltà che l'azione richiesta comporta (0=senza alcuna difficoltà; 1=con qualche difficoltà; 2=con molta difficoltà; 3=impossibile). Per la valutazione dello *score* finale, si considera il punteggio più alto di ogni categoria; sommando i punteggi (da 0 a 24) e dividendo per le otto categorie

(valore minimo 0, valore massimo 3), si otterrà il punteggio finale dell'HAQ (64).

- *Valutazione del Dolore da parte del paziente*: impiego di scala analogica visiva (*Visual Analog Scale - VAS*, 0-100 mm) in grado di fornire una misura su scala continua, caratterizzata da elevata sensibilità. Tale parametro risulta affidabile e riproducibile per il monitoraggio dell'andamento del dolore nel singolo paziente. La scala visiva consiste in una linea orizzontale di 100 mm, dove lo 0 corrisponde alla dicitura “nessun dolore” e il 100 a “dolore molto severo” (65).
- *Valutazione dello stato di salute globale da parte del paziente* mediante VAS (0-100 mm): misura immediata dello stato di salute globale percepito dal paziente. Allo 0 corrisponde la dicitura “ottimo”, al 100 la dicitura “pessimo” (66).
- *Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index*: strumento di autovalutazione per quantificare l'impatto della patologia nello svolgimento di movimenti e funzioni motorie. E' costituito da 10 VAS che esplorano differenti movimenti o azioni motorie. Ad ogni aspetto esplorato può essere assegnato un punteggio variabile fra 0 (facile) a 100 (impossibile). Il punteggio finale può essere interpretato come una stima delle capacità funzionali del paziente.
- *Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI)*: strumento di autovalutazione dell'attività di malattia, costituito da 6 VAS che analizzano i sintomi più rilevanti della SA (fatica,



dolore alla colonna, dolore articolare, dolore alla compressione e rigidità mattutina). Ad ogni item può essere assegnato un punteggio variabile fra 0 (nessun sintomo) a 100 (sintomo molto severo). Il punteggio finale del BASDAI è espressione dell'attività di malattia. Un punteggio superiore a 4 indica una elevata attività di malattia (67).

- *Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index (BASMI)*: misura della mobilità della colonna vertebrale e delle anche in soggetti con interessamento assiale. Include cinque valutazioni cliniche sulla colonna e sulla articolazione sacroiliaca (distanza trago – parete, flessione lombare e laterale, rotazione cervicale e distanza intermalleolare). Ad ogni item è possibile dare un punteggio che varia da 0 a 2, (0=mobilità normale, 1=mobilità parzialmente compromessa, 2=mobilità molto compromessa). Il punteggio totale è dato dalla somma dei valori dei 5 items, e può variare da 0 a 10 (68).
- *Ankylosing Spondylitis Disease activity index (ASDAS)*: strumento per la valutazione dell'attività di malattia, si basa su 4 VAS che esplorano il dolore lombare, la rigidità mattutina, lo stato di salute globale e l'artrite periferica; a queste si aggiunge il valore di un indice di flogosi (VES o PCR). Un punteggio < 1.3 definisce una malattia inattiva. Un punteggio compreso tra 1.3 e 2.1 una attività di malattia moderata, tra 2.1 e 3.5 una attività di malattia elevata e > 3.5 una attività di malattia severa (69).
- *Maastricht Ankylosing Spondylitis Enthesitis Score (MASES)*: valutazione di 13 siti enteseali (I e VII articolazione costo-

condrale, spina iliaca anteriore superiore, spina iliaca postero-superiore, cresta iliaca, processo spinoso della V vertebra lombare, inserzione del tendine d'Achille sul calcagno), alle quali si assegna un punteggio pari a 1 in presenza di dolorabilità. Lo score totale è rappresentato dalla somma dei punteggi registrati nelle varie sedi (70).

- *Modified Stoke Ankylosing Spondylitis Spinal Score (mSASSS)*: valutazione dell'impegno radiografico del tratto lombare (dal margine inferiore di T12 al margine superiore di S1) e cervicale della colonna vertebrale (dal margine inferiore di C2 al margine superiore di T1). L'mSASSS valuta le alterazioni erosive ed osteoproduttive, alle quali viene assegnato un punteggio (normale=0, squaring o presenza di erosioni=1, sindesmofiti=2, sindesmofiti a ponte=3). La somma dei punteggi identifica lo score totale (71).

Altri strumenti come l'Ankylosing Spondylitis Quality of Life (ASQoL) o più recentemente l'ASDAS health index (ASDAS-HI) possono essere utilizzati per valutare la qualità di vita nei pazienti con SpA assiale.

## **Cap 2. FISIOPATOLOGIA DEL RIMODELLAMENTO OSSEO NELLE SPONDILOARTRITI ASSIALI**

### ***2.1. Introduzione***

Come discusso precedentemente, l'entesi rappresenta il sito anatomico fondamentale nel quale avvengono i principali cambiamenti patologici correlati alla neoformazione ossea. Tale processo sembra essere legato da un lato alla flogosi cronica, e dall'altro alla presenza di forze biomeccaniche che vengono trasdotte attraverso queste strutture.

La forma e la localizzazione degli entesofiti a livello della colonna vertebrale, delle articolazioni periferiche e dei siti extra-articolari suggerisce uno stretto collegamento con meccanismi patogenetici che avvengono a livello dell'entesi stessa. Alcuni studi hanno infatti dimostrato come cellule progenitrici mesenchimali provenienti dal periostio e dalla sinovia abbiano capacità proliferative e di differenziazione. In particolare, le cellule mesenchimali del periostio sembrano possedere un forte potenziale di differenziazione osteogenico

e condrogenico (72,73,74). Inoltre, l'esistenza di piccoli canali tra entesi, sinovia e midollo osseo sottostante indica che la migrazione di cellule progenitrici del midollo osseo potrebbe contribuire all'insorgenza ed alla progressione dell'anchilosi, contribuendo alla neoformazione ossea dopo stimoli biomeccanici e citochinici (74).

A livello tissutale, sono stati proposti tre diversi processi di neoformazione ossea che svolgono un ruolo importante nel fisiologico sviluppo del tessuto scheletrico umano ed in alcune condizioni patologiche: ossificazione encondrale, membranosa e metaplasia cartilaginea. In particolare, studi su modelli animali suggeriscono che l'ossificazione encondrale svolge un ruolo fondamentale nella patogenesi delle SpA (75). In questo processo la formazione di tessuto, essenziale durante lo sviluppo e la crescita, si attua su un modello di cartilagine, in cui i condrociti vengono progressivamente sostituiti da precursori degli osteoblasti. Un esempio di ossificazione encondrale è dato dalla guarigione di una frattura.

Un secondo processo di neoformazione ossea è invece quello diretto o membranoso, nel quale la formazione di tessuto osseo si ha direttamente per apposizione di nuova matrice ossea in un tessuto fibroso (76). Studi istologici sembrano suggerire un ruolo nella anchilosi della SA, ma il contributo specifico non è chiaro.

Un terzo processo è basato sulla metaplasia cartilaginea, che determina la formazione di foci di calcificazione che circondano i condrociti. Il meccanismo molecolare e il suo contributo relativo alla anchilosi rimangono tuttavia sconosciuti.

La patogenesi del rimodellamento osseo nella SA è quindi molto complessa e coinvolge fattori genetici, immunologici ed, in generale, diverse citochine e pathway cellulari che legano le alterazioni infiammatorie alla progressiva formazione ossea.

## ***2.2. Fattori genetici***

Come noto, l'allele maggiormente associato alle SpA, ed in particolare alla SA, è l'HLA-B27, sebbene il ruolo patogenetico non sia ancora noto e l'associazione con la progressione radiografica della patologia resta ancora controversa. In un recente studio su 95 pazienti affetti da SA, il B27, insieme alla PCR, risultava essere un fattore di rischio per la progressione radiografica. Tuttavia, tale dato non è stato replicato in altri studi (57,58).

Recentemente, studi Genome Wide hanno identificato due geni, l'*anthrax toxin receptor 2 (ANTXR2)* ed il *Prostaglandin E receptor 4 (PTGER4)*, che sono risultati fortemente associati con la neoproliferazione ossea in corso di SA.

*ANTXR2* codifica per una proteina recettoriale implicata nello sviluppo dei capillari e nel mantenimento dell'integrità delle membrane basali. Questa molecola sembrerebbe avere un ruolo importante nello sviluppo scheletrico e del sistema ematopoietico, sebbene non sia stato ancora identificato il collegamento diretto tra *ANTXR2* ed i meccanismi che conducono alla neoproliferazione ossea (72). *ANTXR2* è inoltre associata alla proteina recettoriale low density lipoprotein receptor (LRP6) coinvolta nella pathway Wnt/beta-catenina che verrà discussa in seguito.

*PTGER4* è uno dei quattro recettori per la prostaglandina E2 (PGE2) e recenti studi ne hanno dimostrato l'associazione con la SA. E' stato dimostrato su modelli murini che l'attività delle prostaglandine ed in particolare della PGE2 può indurre effetti anabolici sulle cellule osteoblastiche promuovendo foci di neoformazione ossea attraverso i recettori EP2 e EP4. Tali recettori attivano vie cellulari che coinvolgono

le chinasi, in grado di attivare fattori di trascrizione per geni implicati nella formazione ossea (77).

Inoltre, è stato riscontrato che l'attivazione di PTGER4 coadiuva la formazione ossea mediata dalle Bone Morphogenic protein (78,79). In particolare, la produzione di PGE2 da parte delle cellule infiammatorie localizzate a livello delle entesi potrebbe essere un importante mediatore della neoapposizione ossea nella SA. L'associazione di PTGER4 con la SA appare ancora più interessante alla luce delle recenti evidenze che identificano un'azione *disease-modifying* dei FANS.

Più recentemente è stata identificata un'associazione tra i polimorfismi di geni LMP2 ed ERAP1 e la progressione della malattia.

In particolare, polimorfismi del gene *LMP2* sono stati associati alla presenza di uveite e malattia extra-spinale mentre ERAP1 ha dimostrato di influenzare l'espressione di HLA-B27 nei pazienti affetti da SA (72). L'esatto meccanismo d'azione delle proteine codificate dai due geni nel promuovere la neoformazione ossea non è tuttavia completamente definito. In un recente studio nel quale sono stati arruolati oltre 2000 pazienti, sono stati individuati 498 polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs). In particolare, due SNPs sono stati considerati significativamente associati con la gravità del danno radiografico. Il primo SNP è stato identificato nel gene *RANK (Receptor Activator of Nuclear Factor kB)*. Come ampiamente dimostrato, RANK è un recettore essenziale per la maturazione degli osteoclasti ed è coinvolto direttamente nella omeostasi del metabolismo osseo mediando la differenziazione, lo sviluppo e l'attivazione degli osteoclasti. Il secondo SNP è stato identificato nel gene che codifica per la Ciclossigenasi 1, corroborando l'ipotesi che le prostaglandine giochino un ruolo fondamentale nella patogenesi del danno radiografico (80).

### ***2.3. La neoformazione ossea nelle SpA: aspetti molecolari***

In generale, il rimodellamento osseo è un processo fisiologico che necessita di una regolazione in termini temporali e spaziali, al fine di garantire la sostituzione del tessuto osseo danneggiato o invecchiato con una quantità sostanzialmente equivalente di tessuto osseo neoformato.

Il rimodellamento avviene ad opera di strutture anatomiche temporanee, definite unità multicellulare di base (BMU), formate da un gruppo di osteoclasti che attaccano la superficie ossea ed un gruppo di osteoblasti che procedono alla ricostruzione di nuovo osso, apportando contemporaneamente una serie di modifiche necessarie per la vascolarizzazione e l'innervazione.

Il rimodellamento osseo è un ciclo costituito da tre fasi:

- **apertura**, che prevede il coinvolgimento di cellule osteoclastiche che riassorbono matrice ossea;
- **transizione**, costituita da una fase di riassorbimento e di formazione di nuovo osso;
- **formazione**, che prevede l'attivazione delle cellule osteoblastiche.

L'intero processo è coordinato dall'azione di osteoclasti, osteoblasti, cellule del rivestimento osseo ed osteociti.

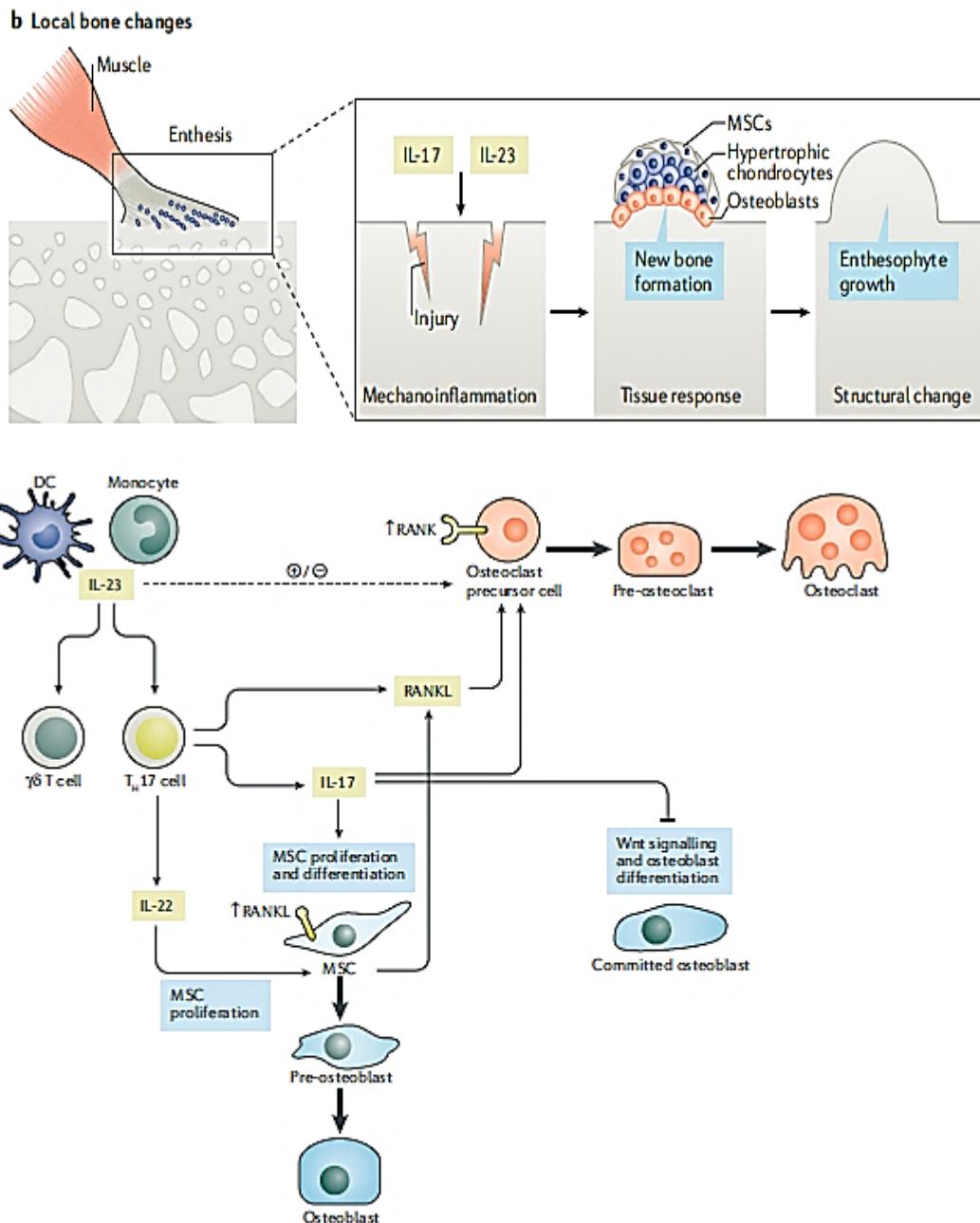
Diversi studi hanno identificato il possibile ruolo di biomarcatori correlati al turnover osseo nell'ambito della patogenesi della SA. In generale, l'attivazione degli osteoclasti gioca un importante ruolo nella perdita ossea e nello sviluppo di erosioni, così come dimostrato in altre patologie, mentre l'attività osteoblastica favorisce l'apposizione di tessuto osseo neoformato. Le cellule osteocitarie svolgono invece diversi ruoli quali la ricezione del carico e dello stress e la secrezione di proteine regolatorie. Le attività di queste cellule sono finemente regolate da diversi *pathway* con una complessa interazione.

### - Il ruolo delle citochine.

L'attivazione patologica della pathway IL-23-IL-17, nel contesto di background genetici, può portare allo sviluppo di malattie infiammatorie croniche tra cui psoriasi e SpA. Le malattie reumatiche associate all'attivazione della via IL-23-IL-17 hanno un fenotipo scheletrico distinto, caratterizzato dalla presenza concomitante di perdita ossea e formazione patologica di nuovo osso. L'effetto diretto di tali citochine sull'osso è ancora oggetto di studio attivo, tuttavia sembra che possano comportarsi da induttori del riassorbimento e della neoformazione a in base agli stimoli e alle cellule coinvolte (81). La famiglia dell'IL-17 comprende sei membri (IL-17A-F). Diversi studi hanno dimostrato il ruolo rilevante dell'IL-17A nella patogenesi della SpA: i dati sui modelli murini hanno mostrato il ruolo di IL-17A nell'infiammazione sinoviale e distruzione articolare durante l'artrite indotta da collagene (82). L'IL-17 è prodotta principalmente da un subset di linfociti attivati (Th17) ed è presente nel siero in concentrazioni più elevate nei pazienti affetti da SpA rispetto ai controlli IL-17 ed, inoltre, diverse evidenze hanno riportato la sua relazione con l'attività di malattia. Riguardo l'azione dell'IL-17 sull'osso, alcune evidenze mostrano che essa promuove l'osteoclastogenesi direttamente, così come indirettamente, attraverso la produzione o l'induzione dell'attivatore del recettore dell'espressione di ligando del fattore  $\kappa$ B (RANKL). Tuttavia, l'IL-17A mostra effetti differenziali sulla maturazione delle cellule dei precursori degli osteoblasti a seconda dello stadio di differenziazione del precursore cellulare. L'IL-17, insieme al TNF ed altre citochine è principalmente una proteina che promuove l'attivazione osteoclastica con conseguente perdita focale e generalizzata di osso. Differenti studi hanno infatti dimostrato che nella SA vi sia un importante rischio di osteoporosi e



fratture vertebrali dovuto solo in parte alla ridotta motilità articolare, ma anche alla presenza di elevati livelli di citochine pro-infiammatorie come la IL-17. Questo effetto è causato da un bilancio netto negativo del rimodellamento osseo in cui si verifica un maggiore riassorbimento osseo mediato dagli osteoclasti e una diminuzione della formazione ossea mediata da osteoblasti. A livello locale, in particolare nei siti enteseali, IL-23 e / o IL-17 mediano una risposta infiammatoria nelle aree periostee, che porta a un'apposizione ossea simile ad una riparazione di frattura e alla formazione di entesofiti (**figura 2.3.1**). IL-17 ha anche un effetto sulle cellule staminali mesenchimali, potenzialmente inducendo la proliferazione delle stesse e promuovendo la loro differenziazione negli osteoblasti (81).



**Figura 2.3.1:** Patogenesi del rimodellamento osseo nella SpA. Interazioni tra le cellule del sistema immunitario, le citochine prodotte e le cellule responsabili del metabolismo osseo

- ***Sistema RANK/RANKL/osteoprotegerina***

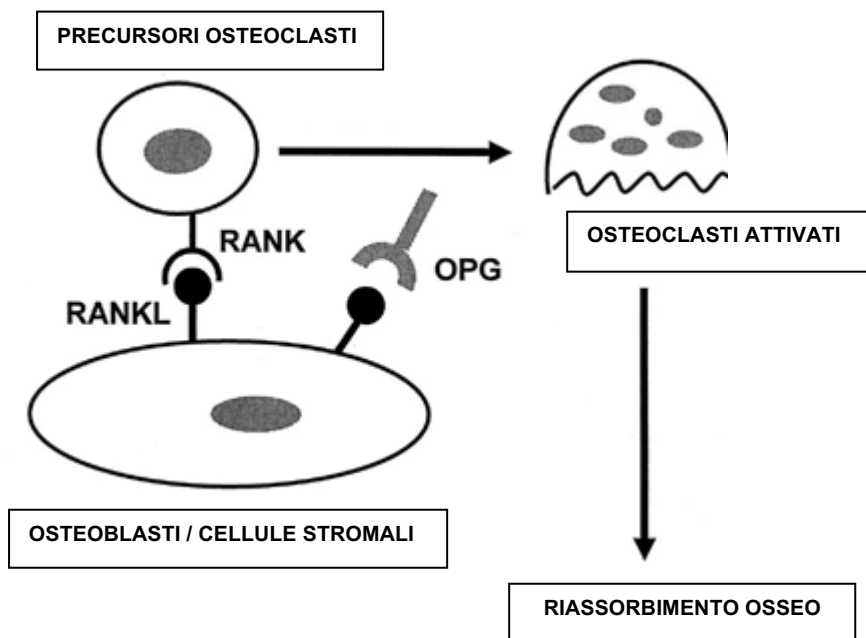
L'attivatore del recettore del fattore nucleare- $\kappa$ B ligando (RANKL) e l'osteoprotegerina (OPG) appartengono ai membri della superfamiglia del TNF. RANKL è un potente

stimolatore del riassorbimento osseo in quanto prodotto dagli osteoblasti in risposta a stimoli di diversa natura. RANKL lega l'attivatore del recettore del fattore nucleare- $\kappa$ B (RANK) localizzato a livello dei precursori degli osteoclasti e ne induce la maturazione e l'attivazione. OPG è il recettore decoy solubile di RANKL, che blocca l'interazione RANK/RANKL ed inibisce quindi l'attivazione degli osteoclasti (83). RANKL è prodotto principalmente dagli osteoblasti ma può essere espresso anche da cellule T attivate, mentre l'OPG è prevalentemente secreta dagli osteoblasti. L'omeostasi tra RANKL e OPG regola finemente il rimodellamento e la perdita ossea, consentendo il rinnovamento e l'adattamento al carico del tessuto osseo (**figura 2.3.2**). Un disequilibrio tra i due sistemi può essere tuttavia riscontrato in numerose patologie, come l'osteoporosi, l'osteopetrosi, le lesioni osteolitiche metastatiche e nell'artrite cronica. Il sistema RANK/RANKL/OPG è stato ampiamente studiato nell'artrite reumatoide nella quale l'aumentata produzione di RANKL da parte delle cellule T attivate, secondaria all'azione di citochine pro-infiammatorie quali TNF ed IL-6, contribuisce alla distruzione dell'osso e della cartilagine (84).

Nella SA, il sistema RANK/RANKL può essere responsabile anche della presenza di osteoporosi, spesso associata paradossalmente alla neoformazione ossea: un recente studio ha dimostrato l'incremento del rapporto fra i livelli sierici di RANKL e di OPG. Tale alterazione potrebbe contribuire alla patogenesi dell'osteopenia in corso di SA (85). Inoltre, livelli significativamente più elevati di RANKL e OPG rispetto ai controlli sani sono stati identificati nei pazienti con SA. Nello stesso studio, si evidenziava una correlazione positiva fra i livelli di OPG e gli indici di infiammazione (VES e PCR) e di disabilità: tale risultato suggeriva un possibile ruolo di queste molecole nei processi di neoapposizione ossea, legato in particolare, alla presenza di

infiammazione (86). Tuttavia, tali risultati non sono stati confermati da altri studi, che non hanno evidenziato differenze significative rispetto ai controlli sani o hanno evidenziato addirittura livelli più bassi nei pazienti (87, 88).

Alla luce di questi contrastanti risultati, il ruolo del sistema RANK/RANKL/OPG nella patogenesi del metabolismo osseo in corso di SA è ancora dibattuto.



**Figura 2.3.2.** Rappresentazione schematica dell'attivazione osteoclastica tramite il sistema RANK/RANKL

- ***Bone Morphogenic proteins***

Le bone Morphogenic Proteins (BMPs) sono proteine appartenenti alla superfamiglia del *Transforming Growth Factor Beta* (TGF $\beta$ ) e svolgono un ruolo primario nei processi di formazione ossea.

Ad oggi, circa 20 membri della famiglia BMP sono stati identificati e caratterizzati (**tabella 2.3.3**). Le BMPs sono prodotte principalmente dalle cellule mesenchimali e sono ormai considerate proteine fondamentali per l'organizzazione, la differenziazione e la crescita dei tessuti nel corso dell'embriogenesi. Le BMPs svolgono le loro funzioni legandosi a due tipi di recettori: tipo I e tipo II, espressi in modo differenziale in vari tessuti. Dopo il legame, i recettori formano un complesso etero-tetramericco costituito da due coppie di tipo I e II. Le proteine Smad, associate al complesso recettoriale delle BMPs svolgono un ruolo centrale nella trasmissione del segnale dal recettore al nucleo, differenziandosi tra i vari tessuti in relazione ai geni da attivare. Dopo il rilascio dal recettore, le proteine Smad fosforilate si associano a Smad4, che agisce come partner condiviso; il complesso trasloca quindi nel nucleo e partecipa alla trascrizione genica legandosi al fattore Runx2 ed altri fattori di trascrizione (**figura 2.3.4**). In particolare, Smad5 è una molecola chiave nella mediazione della differenziazione osteoblastica da precursori mesenchimali indotta dal legame di BMP-2 (89). Il sistema di trasduzione del segnale delle BMPs è altamente regolato da inibitori solubili (per esempio la noggina) e inibitori intracellulari (proteine Smurf) che permettono il bilanciamento tra attivazione ed inibizione.

Il potenziale ruolo interpretato dalle BMPs nel processo di neoformazione ossea in corso di SA è stato recentemente studiato in

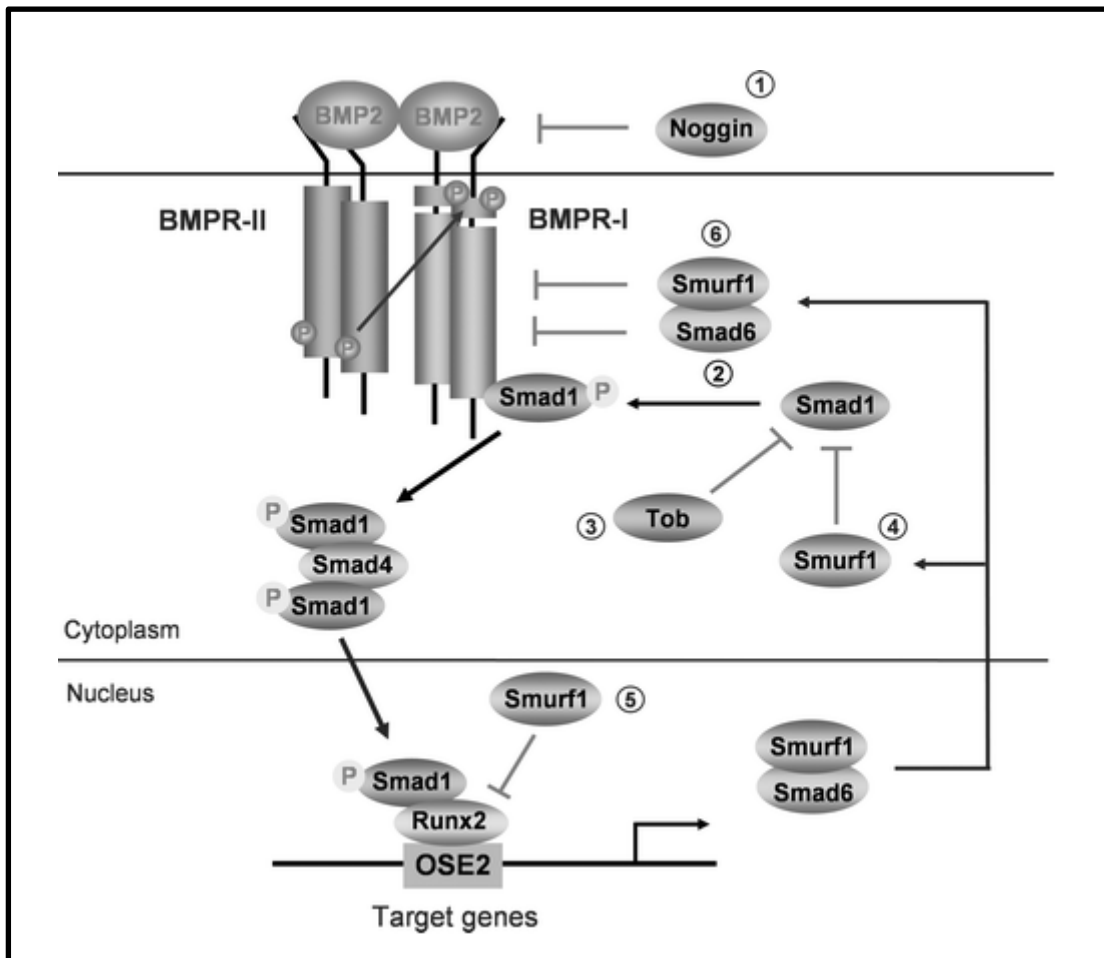
modelli murini DBA/1 di artrite spontanea. In particolare, in questo ceppo il processo patologico è caratterizzato da entesite, dattilite, proliferazione ossea encondrale ed anchilosi.

L'espressione di diverse BMPs è stata dimostrata in questi modelli: in particolare, BMP-2 è stata riscontrata nelle cellule proliferanti e nelle cellule enteseali, mentre BMP-6 e BMP-7 nei condrociti ipertrofici (90). Inoltre, nei modelli murini di entesite e spondilite è stato dimostrato come l'iperespressione della noggina, un antagonista delle BMPs con elevata affinità di legame, sia in grado di ridurre la severità dell'artrite da un punto di vista clinico ed istologico (90).

Analisi su colture cellulari hanno dimostrato come il principale bersaglio delle BMPs sia costituito da cellule progenitrici con potenziale condrogenico; un recente studio ha messo in evidenza la presenza di tali cellule anche nel tessuto enteseale di tendine d'Achille umano (90). Tra le diverse BMPs, la BMP-2 sembra essere quella maggiormente associata ai processi patologici nell'uomo: nei pazienti affetti da SA, i livelli di BMP-2 correlano infatti con l'attività di malattia definita mediante BASDAI e risultano significativamente più elevati nei pazienti con anchilosi totale del rachide rispetto ai pazienti che non presentano sindesmofiti (91).

| BMPs         | FUNZIONI  | Gene Locus   |
|--------------|---|--|
| <u>BMP1</u>  | <i>*BMP1 (non appartiene alla famiglia del TGF-beta. E' una metalloprotease che agisce sul procollagene di tipo I, II e III. E' coinvolta nello sviluppo della cartilagine</i>                    | <u>Cromosoma: 8;</u><br><u>Localizzazione:</u><br>8p21       |
| <u>BMP2</u>  | Agisce come omodimero e induce la formazione ossea e cartilaginea. Ricopre un ruolo fondamentale come fattore di differenziazione per gli osteoblasti.  | <u>Cromosoma: 20;</u><br><u>Localizzazione:</u><br>20p12     |
| <u>BMP3</u>  | Induce la formazione ossea  | <u>Cromosoma: 14;</u><br><u>Localizzazione:</u><br>14p22     |
| <u>BMP4</u>  | Regola la formazione dei denti e dell'osso a partire dal mesoderma. Gioca un ruolo fondamentale nella riparazione delle fratture ossee, nella formazione dell'epidermide e del follicolo ovarico. | <u>Cromosoma: 14;</u><br><u>Localizzazione:</u><br>14q22-q23 |
| <u>BMP5</u>  | Implicata nello sviluppo cartilagineo   | <u>Cromosoma: 6;</u><br><u>Localizzazione:</u><br>6p12.1     |
| <u>BMP6</u>  | Controllo dell'omeostasi del ferro attraverso la via dell'epcidina. Implicata nel controllo dell'integrità delle articolazioni  | <u>Cromosoma: 6;</u><br><u>Localizzazione:</u><br>6p12.1     |
| <u>BMP7</u>  | Regola la differenziazione degli osteoblasti e del tessuto renale   | <u>Cromosoma: 20;</u><br><u>Localizzazione:</u><br>20q13     |
| <u>BMP8a</u> | Implicata nello sviluppo osseo e cartilagineo   | <u>Cromosoma: 1;</u><br><u>Localizzazione:</u><br>1p35-p32   |
| <u>BMP8b</u> | Espressa nell'ippocampo   | <u>Cromosoma: 1;</u><br><u>Localizzazione:</u><br>1p35-p32   |
| <u>BMP10</u> | Implicata nello sviluppo delle trabecole all'interno del tessuto cardiaca   | <u>Cromosoma: 2;</u><br><u>Localizzazione:</u><br>2p14       |
| <u>BMP15</u> | Implicate nello sviluppo del follicolo ovarico  | <u>Cromosoma: X;</u><br><u>Localizzazione:</u><br>Xp11.2     |

**Tabella 2.3.3.** Funzioni e localizzazione cromosomica delle BMPs



**Fig. 2.3.4** Schema degli eventi intracellulari che intervengono in seguito al legame della BMP-2 al proprio recettore (vedi testo).

- ***Sistema Wnt/ $\beta$ -catenina***

Le proteine del sistema Wnt (da *wingless*, originariamente scoperte nella *Drosophila*) sono glicoproteine ricche di cisteina secrete da diverse linee cellulari, in grado di attivare diverse *pathway* cellulari coinvolte nei processi di embriogenesi e carcinogenesi e nello sviluppo del sistema scheletrico. Nell'uomo sono state identificate 19 proteine



appartenenti alla famiglia delle Wnt in grado di indurre una risposta cellulare mediante l'attivazione di specifici geni target attraverso tre vie cellulari: la via canonica, la via non canonica della polarità cellulare e la via non canonica coinvolgente il calcio. Di queste, la via canonica è quella maggiormente studiata e coinvolge la proteina intracellulare  $\beta$ -catenina (92).

In assenza delle proteine Wnt, la  $\beta$ -catenina presenta una isoforma fosforilata localizzata a livello citoplasmatico e viene avviata alla degradazione. Wnt si lega ad un recettore transmembrana della famiglia *Frizzled* associato al corecettore LRP5/6 determinando la defosforilazione della  $\beta$ -catenina attraverso l'inibizione della kinasi GSK3beta. Questa modifica causa l'accumulo nel nucleo della  $\beta$ -catenina con successiva attivazione della trascrizione genetica mediante legame con i fattori di trascrizione *T cell factor* (TCF) e *lymfoid enhancer factor* (LEF) (92) (**figura 2.3.4**).

Il legame tra il sistema Wnt/ $\beta$ -catenina ed il metabolismo osseo è stato suggerito dal riscontro di osteoporosi precoce in modelli murini portatori di mutazioni *loss of function* del gene LRP5. Inoltre, modelli murini *knock out* per il gene LRP5 (LRP5<sup>-/-</sup>) presentano una diminuzione nella massa ossea e deficit di sviluppo e funzione degli osteoblasti. Recenti studi *genome-wide* hanno in seguito dimostrato un'associazione tra alcuni polimorfismi di LRP5 e la riduzione della massa ossea ed il rischio di frattura negli uomini (92).

Wnt7 e Wnt10 svolgono inoltre un ruolo essenziale nell'ambito dei fenomeni di condrogenesi ed osteoblastogenesi. Studi condotti su ceppi murini hanno infatti dimostrato un aumento della massa ossea in seguito ad over-espressione di Wnt10.

Il sistema Wnt/  $\beta$ -catenina può essere attivato direttamente anche da altre vie metaboliche ed in particolare, tramite le *G protein* associate al recettore delle prostaglandine (92). Tale evidenza ha maggior rilievo

per ciò che riguarda la SA in quanto la produzione di prostaglandine da parte di cellule infiammatorie porterebbe ad una attivazione indiretta della pathway Wnt/ $\beta$ -catenina con conseguente attivazione dei geni osteoblastici che controllano la neoformazione ossea.

Il ruolo delle proteine Wnt nella SA ed in generale nelle Spondiloartriti è ancora oggetto di studio, sebbene vi sia un numero crescente di evidenze che ne dimostrano l'implicazione. In un recente studio condotto da Kingberg e collaboratori, sono state valutate le concentrazioni sieriche di diversi biomarcatori nella SA, dimostrando una maggior concentrazione di Wnt-3a nei pazienti rispetto ai controlli, oltre ad una correlazione fra questa stessa molecola ed il danno radiografico, valutato attraverso l'mSASSS (93).

La via canonica Wnt/ $\beta$ -catenina è inoltre regolata dalle proteine inibitorie *Dkkopf* (Dkk) e sclerostina, espresse prevalentemente a livello delle cellule osteocitarie. Tali molecole agiscono come regolatori negativi del metabolismo osseo inibendo l'osteoblastogenesi. Dkk1, Dkk2 e Dkk4 interagiscono con i co-recettori LRP5 ed LRP6 inibendo il legame tra Wnt ed il suo recettore. Ceppi murini che overesprimono Dkk1 sviluppano severa osteopenia dovuta alla presenza di un ridotto numero di osteoblasti.

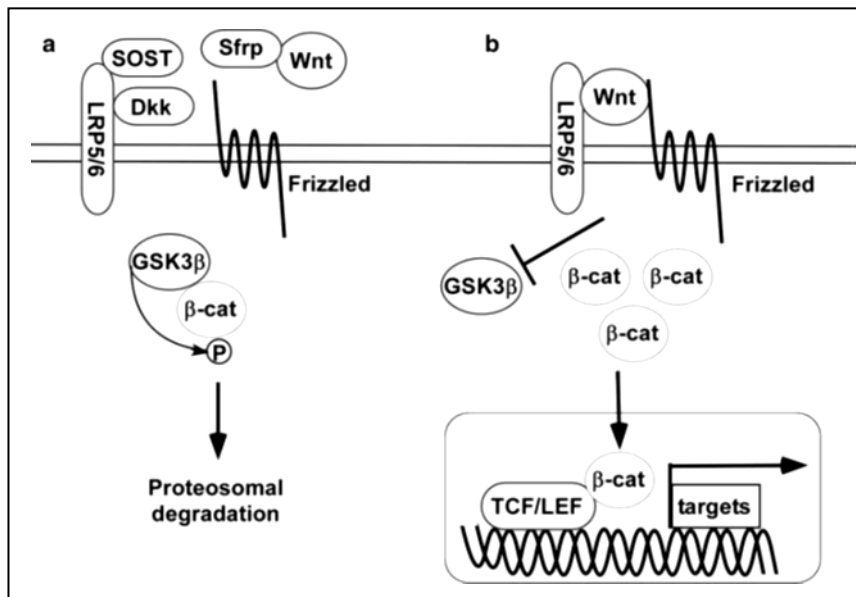
La proteina sclerostina, codificata dal gene *SOST*, e secreta esclusivamente dagli osteociti, è un antagonista della via Wnt/ $\beta$ -catenina. La sclerostina svolgerebbe la sua attività inibitoria mediante il legame con LRP5 e LRP6; è stata inoltre dimostrata anche una attività inibitoria rivolta verso le *bone morphogenic protein* (92). Il coinvolgimento della sclerostina nel metabolismo osseo, ed in particolare nella formazione degli entesofiti in corso di SA, è stato ipotizzato alla luce dell'associazione fra mutazioni del gene *SOST* e la presenza di sclerostosi e malattia di van Buchem. Come noto, tali patologie si caratterizzano per una aberrante produzione ossea. E' stato

inoltre dimostrato un aumento della massa ossea in donne in menopausa trattate con anticorpi monoclonali anti-sclerostina.

Una ridotta espressione tissutale di sclerostina a livello delle articolazioni zigo-apofisarie è stata evidenziata in pazienti affetti da SA rispetto a pazienti affetti da artrite reumatoide e a controlli sani. Inoltre la concentrazione sierica di sclerostina nei pazienti con SA era significativamente inferiore a quella dei controlli sani e correlava negativamente con la presenza di sindesmofiti (94). Tali dati sono stati confermati in un recente studio condotto su pazienti in terapia con farmaci anti-TNF, il quale ha dimostrato che i bassi valori sierici di sclerostina erano associati alla persistenza dell'infiammazione sistemica, correlando con i livelli di PCR (95).

Tuttavia, lo studio di Korkosz e collaboratori non ha evidenziato differenze significative fra i livelli sierici di sclerostina dei pazienti ed i livelli riscontrati nel gruppo di controlli sani; né analogamente, si è evidenziata un'associazione con il danno radiografico. Al contrario, l'espressione di Dkk-1 risultava significativamente ridotta nei pazienti con SA, evidenziando inoltre l'associazione con la progressione radiografica (95).

Recentemente è stato ipotizzato che i bassi livelli di sclerostina riscontrati nei pazienti affetti da SA potrebbero essere secondari alla presenza di anticorpi neutralizzanti: in un recente lavoro è stata infatti dimostrata la presenza di immunocomplessi contenenti sclerostina nei pazienti affetti da SA (96).



**Figura 2.3.4.** Rappresentazione schematica degli eventi intracellulari legati all'attivazione della Pathway Wnt/beta-catenina. (vedi testo)

Alla luce della sua esclusiva produzione da parte delle cellule osteocitarie, la sclerostina potrebbe rappresentare un ottimo biomarcatore clinico oltre che un possibile bersaglio terapeutico da impiegare in alcune specifiche condizioni quali l'osteoporosi.

### ***2.3.4 Le semaforine***

Le semaforine rappresentano un gruppo eterogeneo di proteine accomunate dalla presenza di un dominio ricco in cisteina. Esse rivestono un ruolo fondamentale a livello di diversi tessuti, in particolare nel tessuto nervoso ove svolgono funzione regolatoria per lo sviluppo del sistema nervoso centrale e dei nervi periferici, dirigendo la crescita assonale e dendritica. Finora sono state identificate nell'uomo

20 proteine diverse che possono essere riscontrate nella forma solubile o legate alla membrana cellulare. La semaforina 3 A (Sema3A), una delle prime proteine appartenenti a questa famiglia ad essere identificata, appare coinvolta nello sviluppo del sistema nervoso, in particolare nella sua funzione di fattore di inibizione per la formazione assonale. Come dimostrato dalla sua espressione ubiquitaria, la Sema3A svolge numerose funzioni: essa risulta infatti coinvolta nei processi di formazione ossea e cartilaginea, chemotassi delle cellule neoplastiche, proliferazione cellulare, vasculogenesi. Inoltre, la Sema3A è coinvolta nei processi di organizzazione della formazione di diversi organi, fra i quali cuore, polmoni e fegato (97). Recentemente è stato evidenziato il ruolo delle semaforine nell'ambito della comunicazione intercellulare. In particolare, le semaforine svolgerebbero il ruolo di fattori paracrini in grado di regolare l'attività delle cellule coinvolte nei processi di formazione e riassorbimento osseo. Modelli murini che over-esprimono la Sema3B a livello osteoblastico esibiscono un fenotipo osteoporotico, determinato da una maggiore osteoclastogenesi (97). Inoltre, polimorfismi a singolo nucleotide a livello del gene codificante per Sema7a sono stati associati ad una bassa densità minerale ossea ed ad un alto rischio di fratture vertebrali nelle donne in postmenopausa (97, 98). La Sema4D, una delle prime semaforine identificate, è nota soprattutto per il suo ruolo di regolatore della sopravvivenza dei linfociti B.

A livello del tessuto osseo, la Sema4D è espressa dagli osteoclasti, mentre il suo recettore, la Plexina-B1 è presente sulla membrana cellulare degli osteoblasti e potenzialmente ne inibisce la differenziazione in cellule formanti osso. Tali evidenze sono confermate da modelli sperimentali murini Sema4D<sup>-/-</sup> che esibiscono un'aumentata massa ossea secondaria ad un incremento nella formazione ossea, senza evidenti anomalie nel riassorbimento. Il

meccanismo d'azione della Sema4D non è tutt'ora completamente noto ma coinvolge diversi effettori: durante la fase del riassorbimento osseo, la Sema4D inibisce la differenziazione degli osteoblasti ed effettua un'azione respingente sugli osteoblasti periferici, aumentando la loro motilità (98).

Recenti evidenze hanno suggerito l'implicazione della Sema3A nella patogenesi di alcune malattie autoimmuni, in particolare, Artrite Reumatoide (AR) e Lupus Eritematoso Sistemico (LES), e neoplastiche, quali mieloma multiplo (99). Essa appare comunque implicata anche nell'omeostasi ossea. E' stato infatti evidenziato che ceppi murini Sema3A<sup>-/-</sup> presentano uno sviluppo anormale dell'osso e della cartilagine, con fusioni vertebrali e duplicazione parziali delle costole, suggerendo che Sema3A possa contribuire al modellamento scheletrico nella fase embrionale. Inoltre, gli stessi ceppi mostrano un fenotipo caratterizzato da severa osteopenia.

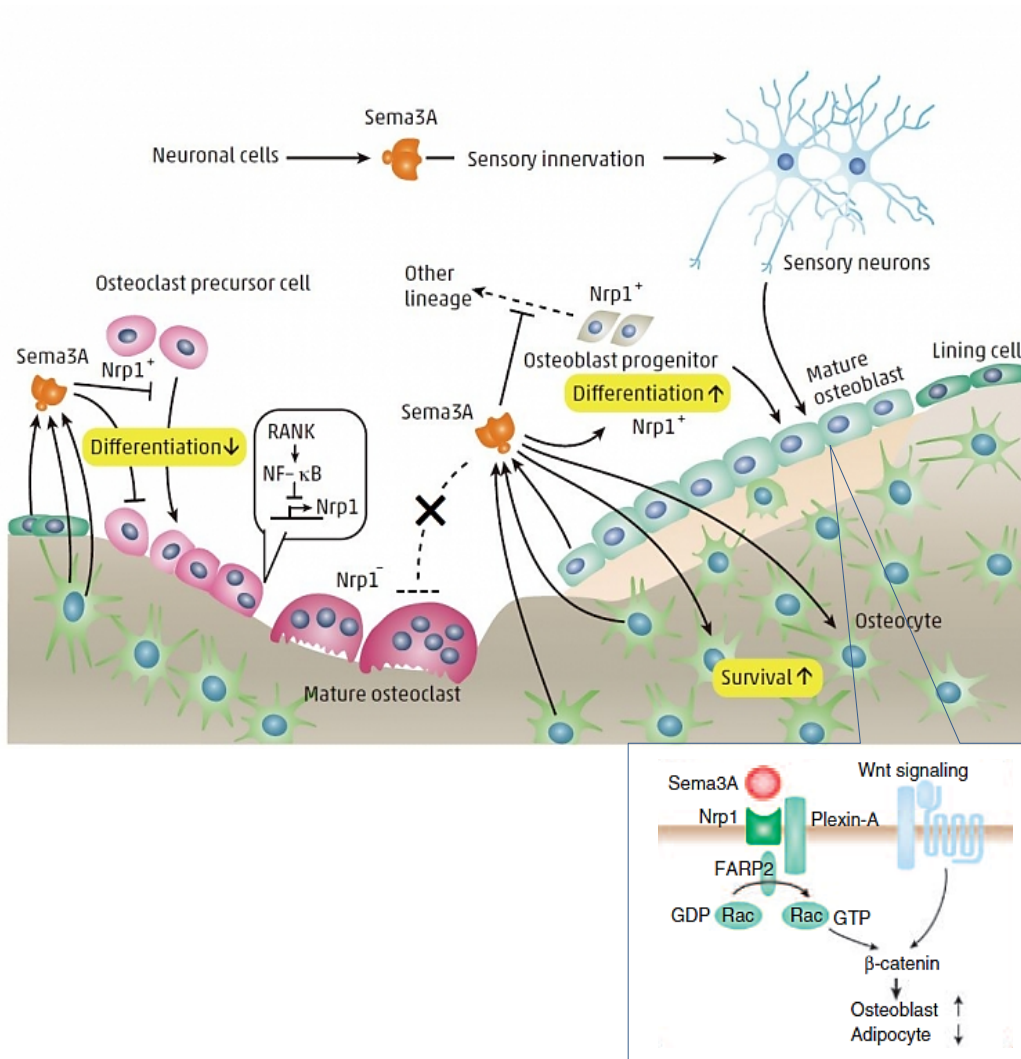
Sema3A si lega ad un complesso recettoriale comprendente la subunità ligando Neuropilina-1 e la Plexina di classe A. Tuttavia, uno studio recente ha dimostrato come l'espressione della Sema3A sia localizzata prevalentemente a livello delle cellule della linea osteoblastica, mentre l'espressione del complesso recettoriale è evidente sia su cellule osteoblastiche che su cellule precursori degli osteoclasti (98). La Plexin-A1 sembra promuovere il differenziamento degli osteoclasti mediante attivazione della via di segnalazione ITAM attraverso la formazione del complesso Plexin-A1-TREM-2-DAP12 (98). Il legame di Sema3A alla Neuropilina-1 promuove il sequestro della Plexina-A1 e la soppressione del segnale di ITAM con conseguente abrogazione della capacità di differenziazione delle cellule precursori degli osteoclasti.

Sema3A inibisce anche la migrazione delle cellule precursori degli osteoclasti. D'altra parte, la Sema3A stimola la differenziazione

osteoblastica attraverso l'attivazione della via canonica Wnt/ $\beta$ -catenina (**figura 2.3.5**). Uno studio recente ha inoltre dimostrato in vivo l'attività della Sema3A nell'attivazione delle cellule staminali mesenchimali, nell'indurre la loro differenziazione in osteoblasti e nell'indurre la formazione di nuovo osso in un modello murino (99). Il legame di sema3A con il suo recettore neuropilina-1 sulle cellule osteoblastiche provoca l'attivazione della proteina RAC1 che promuove l'accumulo nucleare di  $\beta$ -catenina, aumentandone l'attività. Attraverso le semaforine quindi, gli osteoblasti possono avere un ruolo cruciale nella fase di produzione ossea e allo stesso tempo impedire la migrazione e l'attivazione degli osteoclasti.

Nell'ambito delle patologie reumatiche autoimmuni, l'attenzione verso le semaforine si è focalizzata soprattutto sul loro ruolo nella modulazione della risposta immune. I recettori Neuropilina 1 e 2 sono localizzati a livello dei macrofagi e dei linfociti T; in seguito al legame con la Sema3A mediano la soppressione della differenziazione e dell'attività linfocitaria.

Studi condotti su pazienti affetti da LES ed AR hanno infatti dimostrato una diminuzione dei livelli di Sema3A ed una correlazione inversa con gli indici di attività di malattia (100). Allo stato attuale, non sono disponibili studi che hanno valutato il possibile ruolo delle semaforine nell'ambito della SA.



**Figura 2.3.5.** Inibizione del riassorbimento osseo e promozione della neoformazione ossea mediata dall'espressione della Sema3A



### - *Infiammazione e rimodellamento osseo*

Nelle patologie reumatiche autoimmuni si possono riscontrare due maggiori pattern di impegno articolare: erosivo, come quello presente nell'AR, o produttivo, come si osserva nelle spondiloartriti.

Le basi molecolari che determinano tali differenze non sono note a tutt'oggi. In corso di AR, citochine proinfiammatorie quali il TNF contribuiscono sostanzialmente alla patogenesi della malattia promuovendo il riassorbimento osseo, aumentando il numero di osteoclasti a livello articolare e diminuendo il numero di osteoblasti. Questo squilibrio è generato da molecole in grado di regolare il differenziamento degli osteoclasti (fra le quali RANKL), che sono indotti dalle citochine proinfiammatorie che mediano il riassorbimento osseo: i livelli di IL-6, TNF, IL-1 correlano con il numero di erosioni ed livelli di RANKL sia a livello sierico che sinoviale.

Analogamente a quanto accade per l'AR, un'aumentata espressione di TNF è presente anche nei pazienti con spondiloartriti; tuttavia, le modalità con la quale l'infiammazione porti ad un aumento della formazione ossea è ancora dibattuta. In particolare, se da una parte è indubbio il ruolo dell'infiammazione nell'induzione dell'anchilosi, fattori genetici e meccanici possono essere coinvolti.

L'impiego della RM per l'identificazione di alterazioni infiammatorie e strutturali a carico delle articolazioni sacro-iliache e del rachide ha evidenziato come lo sviluppo di sindesmofiti sia legato alla presenza di infiammazione (edema osseo) a livello degli angoli vertebrali (101). Altri studi hanno messo in evidenza come la sostituzione adiposa che segue la risoluzione dell'infiammazione a livello degli angoli vertebrali è di per sé un fattore predittivo per lo sviluppo di sindesmofiti a due anni, rappresentando una fase intermedia tra infiammazione e neoformazione ossea (102,103).

Il legame tra citochine infiammatorie e metabolismo osseo è stato recentemente ipotizzato grazie all'evidenza che citochine come il TNF e l'IL-23 siano in grado di stimolare l'espressione delle BMPs e delle Wnts, ponendo le basi per la neoformazione ossea. Tuttavia, il TNF presenta anche funzione inibitoria sulla neoformazione ossea, in quanto si è dimostrato in grado di indurre l'espressione di proteine Dkk-1 e sclerostina, potenti inibitori del sistema Wnt/ $\beta$ -catenina come precedentemente discusso (94). Inoltre, l'effetto diretto di IL-23 e IL-17 sulle cellule osteoblastiche e sugli osteoclasti è ancora da chiarire, in quanto alcuni studi hanno dimostrato effetti contrastanti e tale effetto potrebbe essere modulato in diverso modo grazie all'interazione con altre citochine e proteine secrete. Alla luce di queste evidenze, i meccanismi specifici che legano l'infiammazione alla neoformazione ossea restano a tutt'oggi poco chiari.

#### - **La calprotectina**

La calprotectina è una proteina eterodimerica di 36 kDa contenuta nei granuli citoplasmatici dei granulociti neutrofili, dei quali costituisce circa il 60% dell'intero contenuto e viene espressa dai geni *S100A8* e *A9*. La calprotectina è anche un importante mediatore di molte funzioni come l'attività chemiotattica, la disattivazione dei macrofagi e l'inibizione della sintesi di immunoglobuline. Livelli elevati di calprotectina sono stati identificati nei siti di infiammazione e nel fluido extracellulare in pazienti con AR, fibrosi cistica, sindrome di Sjogren e ascessi (104). La calprotectina risulta essere un utile biomarcatore nelle malattie infiammatorie intestinali in quanto riscontrabile nelle feci, essendo resistente alla degradazione proteolitica (valori normali nell'adulto < 50 ng/g). La determinazione della calprotectina sierica si è rivelata utile in diverse condizioni infiammatorie. Recenti report in letteratura hanno mostrato un aumento dei livelli sierici di calprotectina

nei pazienti affetti da SpA assiali. Huang et al. hanno recentemente osservato come, sebbene vi fosse una correlazione tra i livelli di calprotectina sierica ed alcuni indici di attività di malattia, quest'ultima non fosse correlata con lo score radiografico mSASSS e con alcuni effettori della pathway Wnt/beta-catenina (105). Mentre altri studi hanno suggerito l'utilità della calprotectina sierica come biomarcatore di progressione del danno radiografico (106). La presenza di elevati livelli di calprotectina sierica, così come avviene per i livelli sierici di PCR, potrebbe quindi essere legato alla presenza di una più cospicua infiammazione tissutale con maggiore predisposizione alla progressione radiografica.

## Cap. 3. CONTRIBUTO ORIGINALE

### 3.1. Introduzione

La neoformazione ossea in corso di SpA assiali è stata da sempre considerata come espressione di un danno strutturale conseguente ad uno stato infiammatorio cronico, sebbene, al contrario di quanto accade nell'AR, i cambiamenti tipici delle SpA siano dominati dalla anchilosi conseguente alla formazione di nuovo osso.

Come precedentemente discusso, la neoformazione ossea nelle SpA assiali è il risultato di diversi meccanismi che comprendono *pathway* cellulari, citochine infiammatorie e cellule residenti quali osteociti, condrociti, cellule staminali mesenchimali e leucociti. Le BMPs sono note per ricoprire un ruolo fondamentale nello sviluppo del sistema scheletrico durante l'embriogenesi e l'organogenesi, e svolgono l'importante funzione di contribuire alla attivazione osteoblastica nella riparazione delle fratture. Simili proprietà potrebbero essere utilizzate anche nei complessi meccanismi che regolano il processo riparativo tissutale secondario ad uno stimolo infiammatorio. Recenti studi hanno infatti suggerito che la BMP-7 possa essere legata alla neoformazione ossea nella SA (107), tuttavia, il ruolo degli altri membri della famiglia delle BMPs come ad esempio la BMP-2 non è stato ancora chiarito in modo approfondito. Una delle vie principali implicate nella neoformazione ossea è il sistema Wnt/ $\beta$ -catenina, con particolare

riguardo al ruolo svolto dalla proteina sclerostina, in grado di svolgere una funzione inibitoria su tale via.

La sclerostina è espressa specificatamente a livello del tessuto osseo dagli osteociti; è stato dimostrato come pazienti affetti da SA presentano livelli bassi rispetto a controlli sani o ai pazienti affetti da altre patologie (94, 108). Inoltre, studi istologici hanno mostrato una notevole riduzione della sclerostina a livello enteseale. La causa di tale riduzione non è nota ma potrebbe derivare da un silenziamento dell'espressione genica o dalla presenza di anticorpi circolanti. Tuttavia, vi sono studi contrastanti che non hanno portato agli stessi risultati (109). Vista la grande variabilità nelle casistiche e nei metodi di studio, è difficile giungere ad una conclusione unanime sul reale ruolo di questo biomarcatore.

Inoltre, come descritto in precedenza, recenti studi hanno dimostrato un coinvolgimento delle semaforine nel metabolismo osseo, in particolare come attivatori della pathway Wnt/beta-catenina. Non solo, il ruolo delle Semaforine sembrerebbe anche importante nella comunicazione tra le cellule del sistema immunitario: studi condotti su altre patologie autoimmuni reumatiche, in particolare LES ed AR hanno dimostrato un possibile coinvolgimento nella patogenesi ed una correlazione con l'attività di malattia. Tuttavia, tali molecole non sono state valutate in modo sistematico nelle SpA, ed è ancora poco chiaro il contributo di queste ultime alla patogenesi della neoformazione ossea ed il loro legame con l'infiammazione cronica nella SpA.

L'obiettivo primario del presente studio è stato quello di valutare alcuni potenziali biomarcatori di patologia e di neoformazione ossea in un gruppo di pazienti con SpA assiale e di indagare le possibili correlazioni con gli indici clinici di attività di malattia, di disabilità, con gli indici radiografici di danno e con la presenza di una remissione clinica. A

questo scopo sono state valutate le proteine Sema3A, sclerostina, BMP-2, IL-17A e calprotectina.

### ***3.2 Materiali e metodi***

Sessanta pazienti affetti da SpA assiale radiografica, giunti consecutivamente alla nostra osservazione sono stati arruolati nel presente studio. Sono stati inoltre arruolati 30 controlli sani, appaiati per età e sesso. I criteri di inclusione prevedevano: 1) il soddisfacimento dei criteri ASAS per le SpA assiali; 2) la presenza di una sacroileite radiograficamente evidente secondo i criteri di New York; 3) l'età maggiore di 18 anni. Sono stati esclusi dallo studio pazienti con anamnesi positiva per fratture ossee nei 5 anni precedenti alla visita di arruolamento.

In tutti i pazienti sono stati registrati i principali parametri clinico-demografici (età, sesso, età alla comparsa dell'artrite, presenza di comorbidità, eventuali fattori traumatici, attività professionali svolte, terapie in atto).

#### ***- Valutazione dei pazienti***

Per ogni paziente sono stati inoltre valutati i principali indici di attività di malattia e disabilità.

Come indici di flogosi sono stati registrati i valori di VES (mm/h) e PCR (mg/dl).

Sono stati inoltre valutati i seguenti parametri:

- Dolore da parte del paziente, su scala analogica visiva (*Visual Analog Scale* - VAS, 0-100 mm) (65);

- Stato di salute globale da parte del paziente, su scala analogica visiva (VAS, 0-100 mm) (66);
- *Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index* (BASFI);
- *Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index* (BASDAI) (67);
- *Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index* (BASMI) (68);
- *Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score* (ASDAS-VES, ASDAS-PCR) (69).

In tutti pazienti sono state valutate le radiografie della colonna e del bacino eseguite entro sei mesi dalla visita di arruolamento. Il danno radiografico alla colonna è stato valutato mediante *modified Stoke Ankylosing Spondylitis Spinal Score* (mSASSS) (71); il coinvolgimento delle articolazioni sacro-iliache è stato valutato mediante assegnazione di uno score variabile fra 1 e 4 in accordo ai criteri di New York.

### ***Livelli sierici di Sema3A, sclerostina, BMP-2, IL-17A e Calprotectina***

Le concentrazioni sieriche delle proteine Sema3A, sclerostina, BMP-2, IL-17A e calprotectina sono state valutate utilizzando Kit ELISA commerciali (Human SEMA3A ELISA Kit-NP\_006071.1 (MBS2510626), Human Sclerostin ELISA Kit-NP\_079513.1 (MBS015699), Human BMP-2 ELISA Kit-C8C060 (MBS175918), Human Interleukin 17A ELISA Kit-NP\_002181.1 (MBS005765), Human Calprotectin ELISA Kit-AAB33355.1 (MBS026266)). I campioni sierici dei pazienti sono stati prelevati da sangue venoso periferico al momento della visita e conservati a -80°.

### **3.3. Analisi statistica**

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando, per le variabili continue, il test di Mann-Whitney per campioni indipendenti ed il test

di Wilcoxon per le variabili dipendenti. I risultati sono stati espressi come mediana e 25°-75° percentile. La significatività delle correlazioni è stata valutata con il coefficiente di correlazione dei ranghi di Spearman. Sono stati considerati significativi valori di  $p < 0.05$ . Sensibilità, specificità e Likelihood ratio sono stati valutati per analizzare i valori sierici dei diversi biomarcatori tra pazienti e controlli. La valutazione statistica è stata eseguita utilizzando il programma PRISM – Graphpad.

### **3.4. Risultati**

Le principali caratteristiche demografiche, cliniche, laboratoristiche e radiografiche dei pazienti affetti da SpA (n=60), arruolati nel presente studio, sono riassunte nella tabella 1.

In linea con i dati riportati in letteratura, la presenza dell'allele HLA-B27 è stata riscontrata in 44 (73.3%) pazienti. Per quanto riguarda le caratteristiche cliniche, 21 pazienti (35%) presentavano impegno periferico, prevalentemente a carico delle grandi articolazioni (ginocchia e caviglie).

La durata di malattia mediana era di 12.5 anni, configurando un gruppo di pazienti con patologia ormai stabilizzata.

#### *Valutazione delle concentrazioni sieriche dei biomarcatori*

Non si è evidenziava nessuna differenza significativa fra le concentrazioni sieriche [mediana (25°-75°)] di Sema3A tra i pazienti [0.26 (0.20-0.31) pg/ml] e i controlli [0.28 (0.26-0.3) pg/ml;  $p = \text{n.s.}$ ] (figura 1). Inoltre, la Sema3A presentava una bassa sensibilità (57.5%) e specificità (65%) nel differenziare i pazienti con SpA assiale rispetto



ai controlli sani (figura 2). I livelli di Sema3A correlavano positivamente con i valori di VES ( $\rho=0.37$ ,  $p=0.049$ ;) ma, non sono state riscontrate correlazioni significative tra i valori di Sema3A e i gli indici di danno radiografico (figura 3).

La concentrazione sierica di sclerostina [mediana (25°-75°)] è risultata significativamente più alta nei controlli sani [18.04 (13.6-24) pg/ml] rispetto ai pazienti affetti da SpA [6.46 (4.5-11.1) pg/ml;  $p$  value  $< 0.01$ ] (figura 4) ed inoltre per valori  $< 13.18$  la determinazione della sclerostina presentava una elevata sensibilità (82%) e specificità (90%) per la diagnosi di SpA assiale (figura 5). Tuttavia, Nessuna correlazione statisticamente significativa è stata riscontrata tra le concentrazioni sieriche di sclerostina con il danno radiografico, valutato mediante indice mSASSS (figura 6) o con gli indici clinici di attività ed i parametri di laboratorio. Inoltre, non sono state riscontrate differenze significative nei livelli di sclerostina tra pazienti con impegno radiografico più severo ( $mSASSS > 10$ ) e meno severo ( $mSASSS \leq 10$ ). Le concentrazioni di BMP-2 non sono risultate differenti tra pazienti e controlli (figura 7) e hanno mostrato poca utilità nel differenziare i pazienti con SpA dai controlli (figura 8 – analisi dell'AUC) ma correlavano positivamente (Spearman  $\rho$ : 0.33,  $p=0.02$ ) con l'indice mSASSS (figura 9) e sono significativamente più alte nei pazienti con anchilosi delle articolazioni sacro-iliache rispetto ai pazienti con sacroileite di grado minore. I livelli di calprotectina (mediana/ 25°-75° percentile) sono risultati significativamente ( $p=0.01$ ) più elevati nei pazienti con SpA assiale [14.5 (7.23-21.9) ng/ml] rispetto ai controlli [8.23 (5.1-10.2)] (figura 10) e mostravano una buona specificità per la diagnosi di SpA assiale (figura 11). Inoltre, correlavano significativamente con i livelli di IL-17A e con i valori sierici di PCR, tuttavia, a differenza di quanto riportato in altri studi, nessuna relazione è stata riscontrata con i valori di mSASSS.

L'analisi della nostra casistica ha mostrato che in 40 (66.6%) pazienti era presente uno stato di remissione e/o bassa attività di malattia valutata attraverso il criterio ASDAS-PCR  $\leq 2.1$ . Analizzando i valori sierici dei biomarcatori presi in esame abbiamo riscontrato che i livelli di BMP-2 erano significativamente più elevati nei pazienti che avevano raggiunto la remissione / bassa attività di malattia rispetto ai pazienti con attività di malattia elevata. Di notevole interesse, le concentrazioni plasmatiche di BMP-2 correlavano inversamente con i livelli di IL-17A, dimostrando una relazione tra i livelli di BMP-2 e la presenza di infiammazione espressa come attività di malattia elevata e presenza in circolo di proteine proinfiammatorie (IL-17A) (figure 12 e 13). I livelli di calprotectina, di Sema3A e sclerostina non erano significativamente differenti tra i due gruppi di pazienti (bassa attività di malattia / elevata attività di malattia).

**Tabella 1.** Caratteristiche demografiche, laboratoristiche, cliniche, radiografiche dei pazienti arruolati (N=60)

|  |                 |
|--|-----------------|
| Maschi/femmine                                     | 40/20           |
| Età (anni - mediana/25°-75°)                       | 50 (40.5-56.75) |
| Durata di malattia (mediana/25°-75°) anni          | 12.5 (6.2-21.5) |
| HLA-B27 (%)  | 44 (73.3)       |
| PCR mg/dl (mediana/25°-75°)                        | 0.5 (0.2-0.9)   |
| VES mm/I ora (mediana/25°-75°)                     | 12.5 (5-20.7)   |
| VAS global health (mediana/25°-75°)                | 4.75 (3-5.9)    |
| VAS medico (mediana/25°-75°)                       | 4 (3-5)         |
| ASDAS-PCR (mediana/25°-75°)                        | 2.2 (1.5-3.3)   |
| BASMI (mediana/25°-75°)                            | 2 (1-5)         |
| Sacroilete IV grado (% su pazienti con Spondilite) | 14 (35)         |
| mSASSS (mediana/25°-75°)                           | 10 (2.5-29.5)   |
| Presenza artite periferica (%)                     | 21 (35)         |
| Terapia (%)  |                 |
| FANS   | (42.5)          |
| DMARDs   | (15)            |
| Anti-TNF   | (57.5)          |
| Anti-IL17  | (5)             |

**Figura 1.** Concentrazioni sieriche della Sema3A nei pazienti affetti da SpA assiale (N=60) e nei controlli sani (N=30)

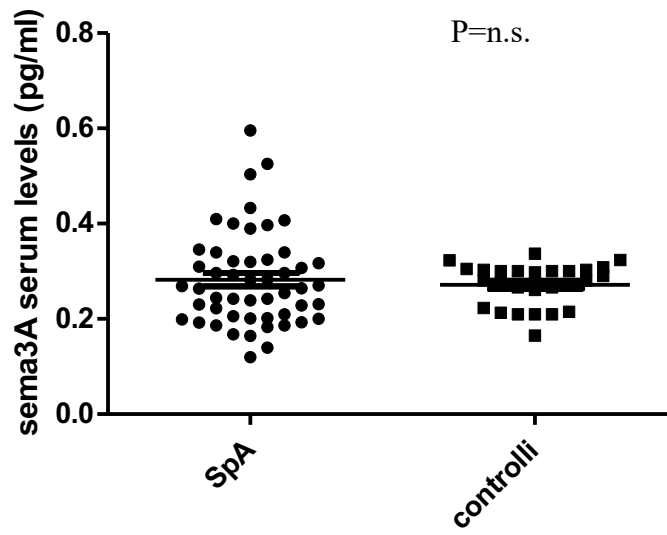
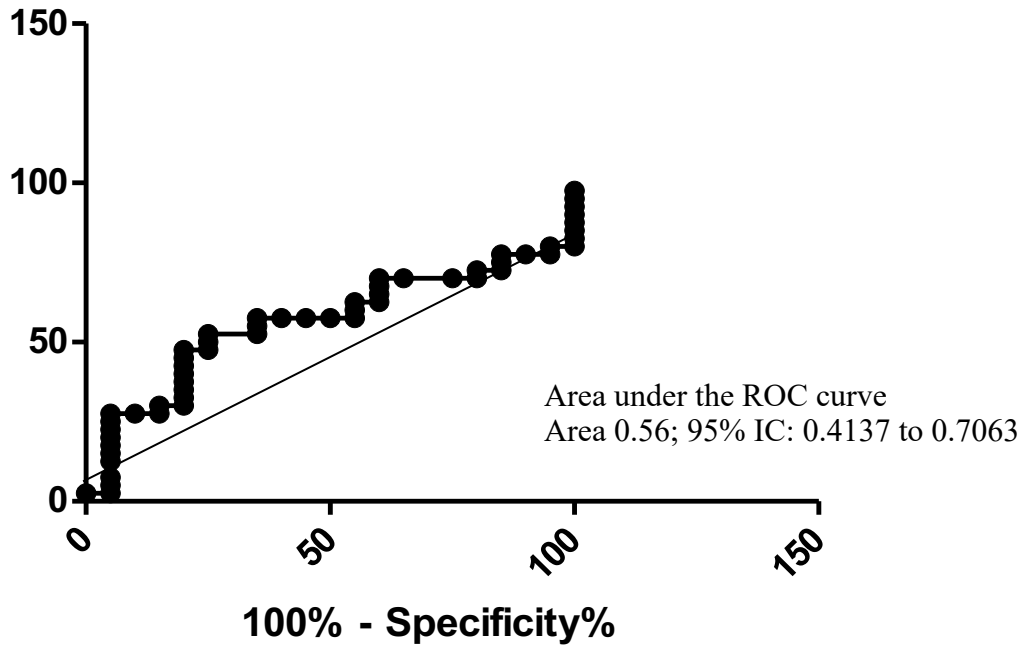
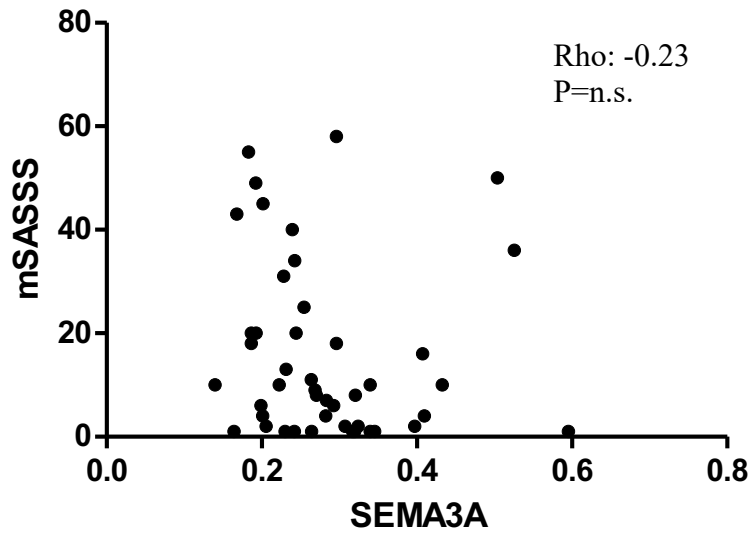


Figura 2. Sensibilità, specificità, likelihood ratio e area under the curve (AUC) dei valori di SEMA3A per la diagnosi di SpA assiale

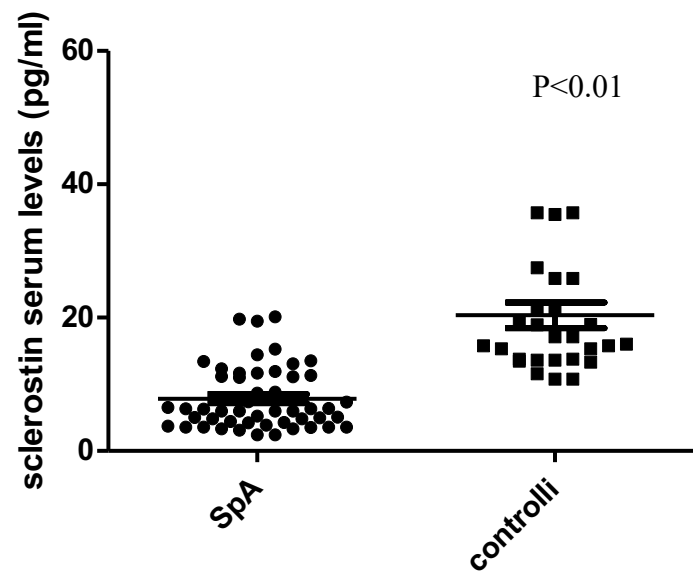


|          | Sensitivity% | 95% CI           | Specificity% | 95% CI           | Likelihood ratio |
|----------|--------------|------------------|--------------|------------------|------------------|
| < 0.2719 | 57.50        | 40.89% to 72.96% | 65.00        | 40.78% to 84.61% | 1.64             |
| < 0.2750 | 57.50        | 40.89% to 72.96% | 60.00        | 36.05% to 80.88% | 1.44             |

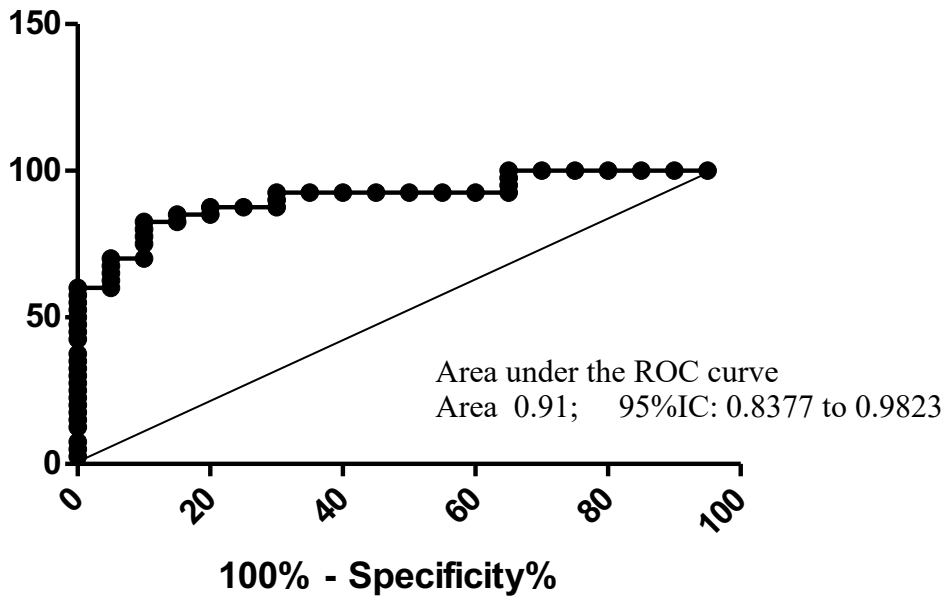
**Figura 2.** Correrlazione (Spearman Rho) tra le concentrazioni plasmatiche sema3A e l'indice di danno radiografico mSASSS



**Figura 4.** Concentrazioni sieriche della sclerostina nei pazienti affetti da SpA assiale (n=60) e nei controlli sani (n=30)



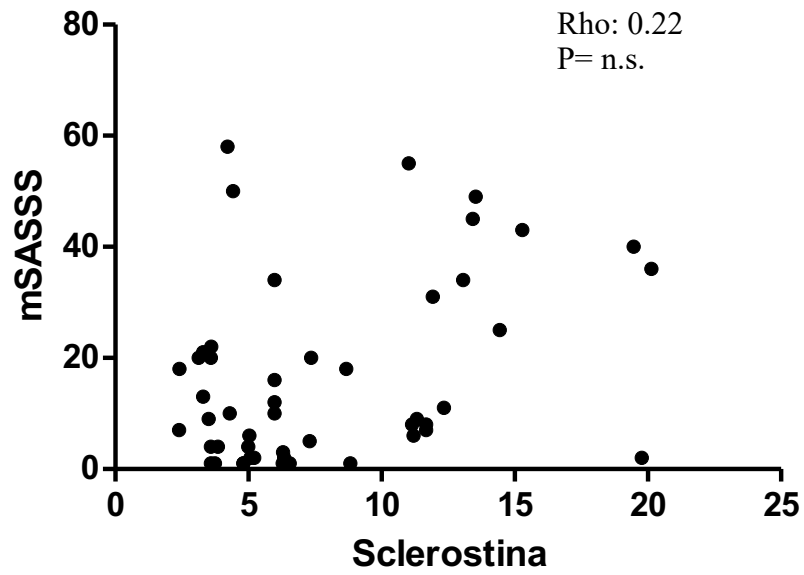
**Figura 5.** Sensibilità, specificità, likelihood ratio e area under the curve (AUC) dei valori di sclerostina per la diagnosi di SpA assiale



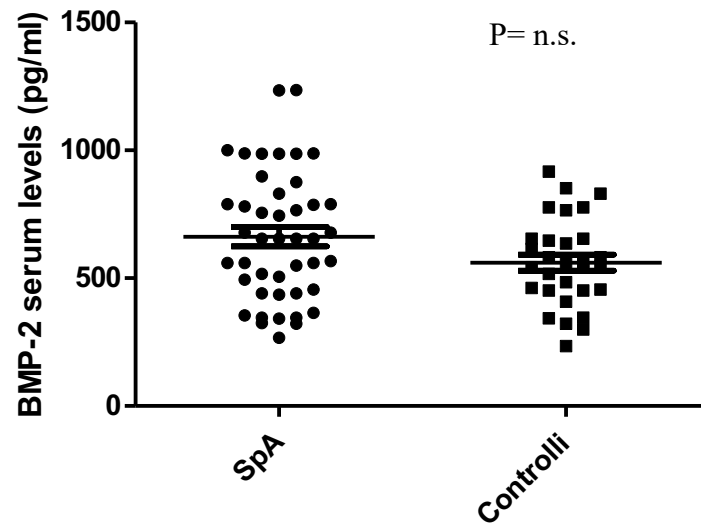
|         | Sensitivity% | 95% CI           | Specificity% | 95% CI           | LR    |
|---------|--------------|------------------|--------------|------------------|-------|
| < 11.44 | 70.00        | 53.47% to 83.44% | 95.00        | 75.13% to 99.87% | 14.00 |
| < 11.62 | 70.00        | 53.47% to 83.44% | 90.00        | 68.30% to 98.77% | 7.00  |
| < 11.80 | 75.00        | 58.80% to 87.31% | 90.00        | 68.30% to 98.77% | 7.50  |
| < 12.13 | 77.50        | 61.55% to 89.16% | 90.00        | 68.30% to 98.77% | 7.75  |
| < 12.70 | 80.00        | 64.35% to 90.95% | 90.00        | 68.30% to 98.77% | 8.00  |
| < 13.18 | 82.50        | 67.22% to 92.66% | 90.00        | 68.30% to 98.77% | 8.25  |
| < 13.36 | 82.50        | 67.22% to 92.66% | 85.00        | 62.11% to 96.79% | 5.50  |
| < 13.45 | 85.00        | 70.16% to 94.29% | 85.00        | 62.11% to 96.79% | 5.67  |



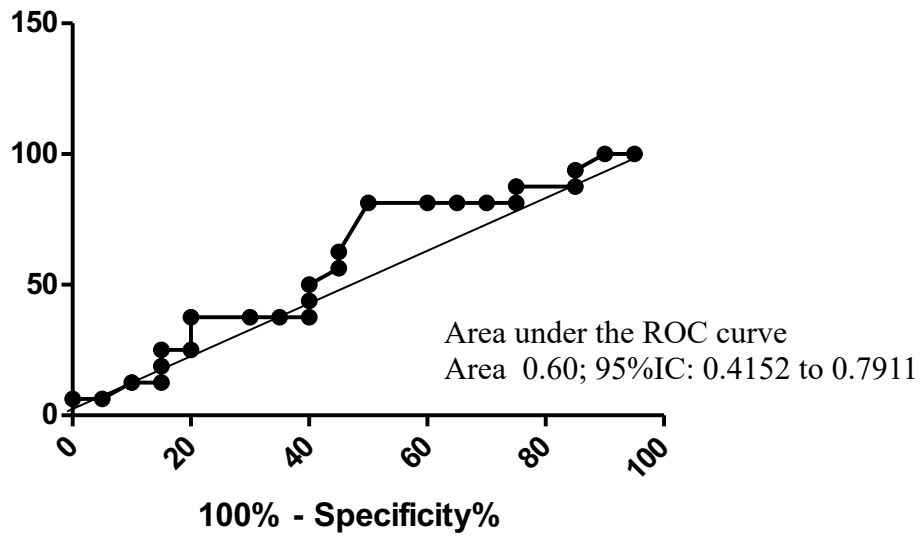
**Figura 6.** Correrlazione (Spearman Rho) tra le concentrazioni plasmatiche di sclerostna e l'mSASSS



**Figura 7.** Concentrazioni sieriche della BMP-2 nei pazienti affetti da SpA assiale (n=60) e nei controlli sani (n=30)

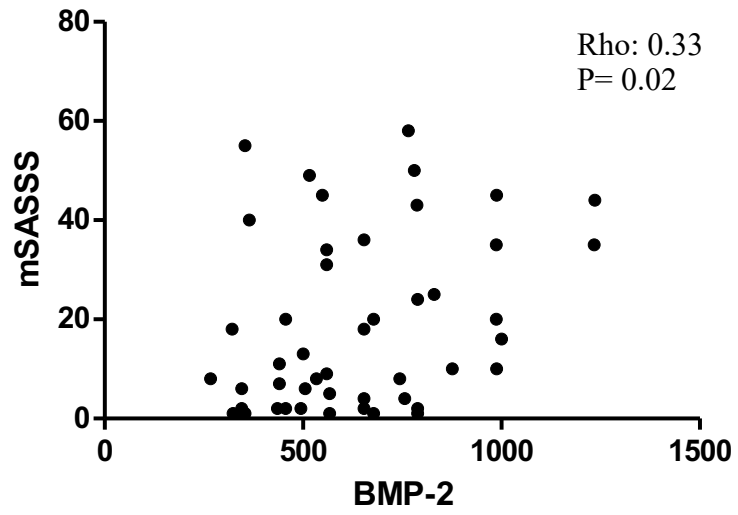


**Figura 8.** Sensibilità, specificità, likelihood ratio e area under the curve (AUC) dei valori di BMP-2 per la diagnosi di SpA assiale



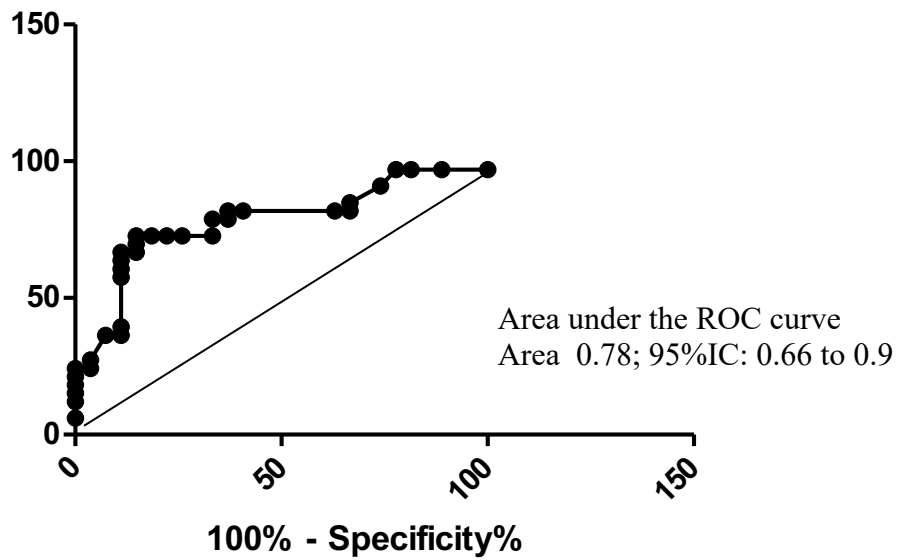
|         | Sensitivity% | 95% CI           | Specificity% | 95% CI           | LR   |
|---------|--------------|------------------|--------------|------------------|------|
| < 500.2 | 43.75        | 19.75% to 70.12% | 60.00        | 36.05% to 80.88% | 1.09 |
| < 511.0 | 50.00        | 24.65% to 75.35% | 60.00        | 36.05% to 80.88% | 1.25 |
| < 532.7 | 56.25        | 29.88% to 80.25% | 55.00        | 31.53% to 76.94% | 1.25 |

**Figura 9.** Correrlazione (Spearman Rho) tra le concentrazioni plasmatiche di BMP-2 e l'mSASSS



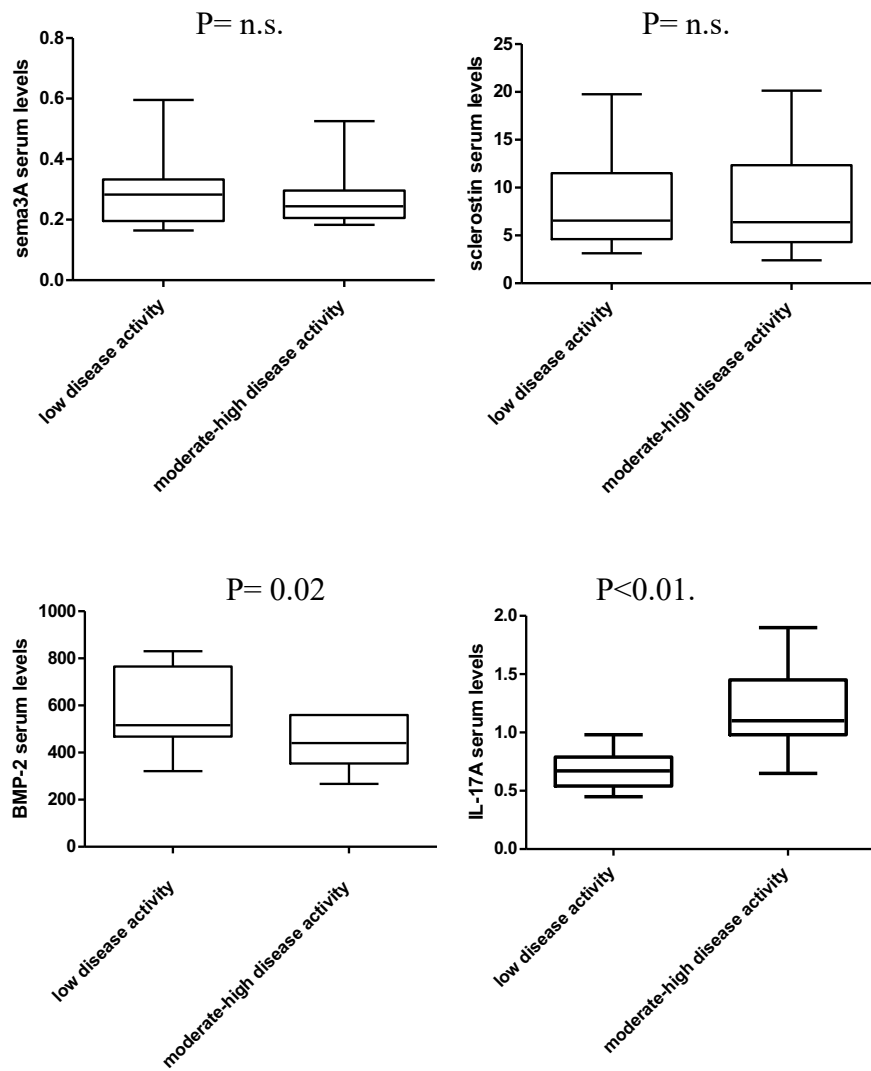


**Figura 11.** Sensibilità, specificità, likelihood ratio e area under the curve (AUC) dei valori di calprotectina per la diagnosi di SpA assiale

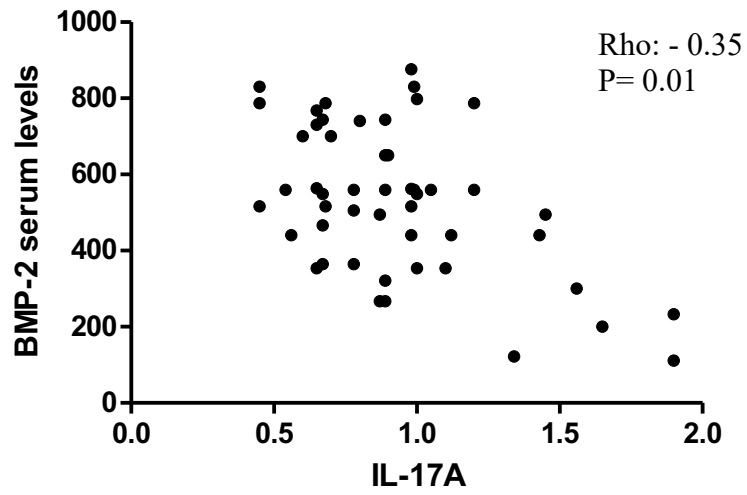


|         | Sensitivity% | 95% CI           | Specificity% | 95% CI           | LR   |
|---------|--------------|------------------|--------------|------------------|------|
| > 9.750 | 66.67        | 48.17% to 82.04% | 85.19        | 66.27% to 95.81% | 4.50 |
| > 11.20 | 66.67        | 48.17% to 82.04% | 88.89        | 70.84% to 97.65% | 6.00 |
| > 13.45 | 63.64        | 45.12% to 79.60% | 88.89        | 70.84% to 97.65% | 5.73 |
| > 14.60 | 60.61        | 42.14% to 77.09% | 88.89        | 70.84% to 97.65% | 5.45 |

**Figure 12:** Valutazione dei livelli sierici di Sema3A, sclerostina, BMP-2, calprotectina e IL-17A nei pazienti in remissione / bassa attività di malattia (ASDAS-PCR  $\leq 2.1$ ) e nei pazienti con elevata attività di malattia al momento della visita



**Figura 13.** Correrlazione (Spearman Rho) tra le concentrazioni plasmatiche di BMP-2 e le concentrazioni di IL-17A





### **3.5. DISCUSSIONE**

La comprensione della neoformazione ossea nella patogenesi delle Spondiloartriti assiali è uno degli obiettivi di ricerca principali a causa dello stretto legame con le modificazioni cliniche, la disabilità e la riduzione della qualità di vita nei pazienti.

Il nostro studio aggiunge un tassello importante, mediante la valutazione di alcune molecole che sembrano svolgere un ruolo centrale nelle *pathways* coinvolte nel metabolismo osseo.

Pur non avendo identificato differenze significative in termini di concentrazione sierica di Sema3A fra pazienti affetti da SpA assiale e i controlli sani, appare interessante il riscontro di una significativa correlazione dei livelli di questa molecola con alcuni indici di attività di malattia, quali la VES. Questo risultato potrebbe indicare un *link* fra il processo infiammatorio e la sintesi di Sema3A. Tuttavia, nella nostra esperienza, la Sema3A non presenta livelli di sensibilità e specificità elevata nei confronti della SpA assiale e nessuna correlazione è stata riscontrata con gli indici di danno radiografico portando ad ipotizzare che tale proteina non sia un utile biomarcatore di progressione radiografica.

Nel nostro studio abbiamo confermato la presenza di livelli significativamente più bassi di sclerostina nei pazienti affetti da SpA rispetto ai controlli sani. Tale risultato è in accordo con le precedenti esperienze pubblicate in letteratura. In particolare, Appel e collaboratori hanno evidenziato livelli sierici di sclerostina significativamente più bassi in una coorte di 46 pazienti affetti da SA rispetto a controlli sani e soggetti affetti da osteoartrosi. I livelli sierici di sclerostina risultavano inoltre significativamente associati allo sviluppo di nuovi sindesmofiti a 1 e 2 anni di follow-up, rafforzando l'ipotesi che la minore espressione degli inibitori del sistema Wnt contribuisca all'attivazione e alla

differenziazione delle cellule osteoblastiche (94). Nello stesso studio, gli autori dimostravano una ridotta espressione di sclerostina anche a livello di campioni di tessuto osseo ottenuti da pazienti con SA (94). Tali risultati sono stati confermati in altri studi (108,110).

Nello studio condotto da Saad e colleghi è stato evidenziato l'incremento dei livelli di sclerostina già dopo 6 mesi di trattamento con farmaci antagonisti del TNF, con il raggiungimento della significatività statistica a 12 mesi. Inoltre, gli stessi autori riportavano livelli di sclerostina persistentemente ridotti nei pazienti con elevata attività di malattia (108). La sclerostina potrebbe essere un utile biomarcatore per i pazienti affetti da sospetta SpA assiale in quanto presenta una buona sensibilità e specificità. A differenza di altri report, non sono state riscontrate correlazioni significative con gli indici che misurano il grado di progressione radiografica. Tale dato potrebbe essere spiegato dal disegno dello studio, di tipo cross-sectional, o dal fatto che altre proteine potrebbero promuovere la sintesi ossea.

Nella nostra coorte non abbiamo evidenziato differenze significative per quanto riguarda i livelli di sclerostina legate all'attività di malattia o alla terapia praticata. Tale dato rafforza l'ipotesi che infiammazione e neoformazione ossea siano processi appaiati ma indipendenti e che i livelli di sclerostina non vengano di conseguenza influenzati dalla presenza di infiammazione, dalla durata di malattia o dall'attività di malattia. Si può ipotizzare che i processi patogenetici che determinano una diminuzione dei livelli di sclerostina, siano estremamente precoci e si automantengano in modo indipendente. Questa ipotesi è in accordo con alcuni dati presenti in letteratura che suggeriscono come nei pazienti con danno radiografico avanzato il trattamento con antagonisti del TNF non sia in grado di modificare il quadro già esistente e di rallentarne la progressione.

Di notevole interesse è la presenza di una correlazione tra i livelli sierici di BMP-2 ed un maggior danno radiografico, seppure tali livelli non siano differenti dai controlli sani. La correlazione inversa tra i livelli di BMP-2 e i livelli di IL-17A ci permette di fornire ipotesi a supporto del fatto che la presenza di un processo infiammatorio mediato dall'IL-17 sia associato, ma non direttamente responsabile, della neoformazione ossea. In accordo con tale ipotesi, infatti, i pazienti in remissione presentavano valori significativamente più alti di BMP-2 rispetto ai pazienti con elevata attività di malattia e la BMP-2 correlava inversamente con i livelli di PCR. I nostri risultati sono in linea con quanto riportato di recente in letteratura: una alterata produzione della BMP-2 e della noggina produrrebbe infatti una differenziazione osteogenica anormale delle cellule staminali mesenchimali nelle SpA (111)

Per quanto riguarda la calprotectina, il nostro studio ha confermato la sua utilità come biomarcatore di infiammazione, tuttavia, in accordo ad altri studi, non abbiamo dimostrato una correlazione con il danno radiografico.

### ***Conclusioni***

I risultati del nostro studio suggeriscono il possibile ruolo di alcuni biomarcatori nelle complesse dinamiche che legano l'infiammazione al rimodellamento osseo nei pazienti con SpA.

Inoltre, i livelli di sclerostina sembrerebbero essere un utile biomarcatore, specifico per i pazienti affetti da SpA.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Jürgen B, Joachim S. Ankylosing Spondylitis. *Lancet* 2007; 369: 1379–1390.
2. Dougados M, Baeten D. Spondyloarthritis. *Lancet* 2011;377:2127-37.
3. Rudwaleit M, van der Heijde D, Landewé R, Listing J, Akkoc N, Brandt J et al. The development of Assessment of SpondyloArthritis international Society classification criteria for axial spondyloarthritis (part II): validation and final selection. *Ann Rheum Dis.* 2009 Jun;68(6):777-83
4. Klippel JH, Dieppe PA. *Rheumatology*. Mosby, 1998; vol. 2, sez. 6, cap. 22
5. Kiltz U, Baraliakos X, Karakostas P, Igelmann M, Kalthoff L, Klink C, Krause D, Schmitz-Bortz E, Flörecke M, Bollow M, Braun J. Do patients with non-radiographic axial spondylarthritis differ from patients with ankylosing spondylitis? *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2012 Sep;64(9):1415-22
6. Julkunen H, Nenonen E, Aromaa A, Heliövaara M. The epidemiology of ankylosing spondylitis in Finland. *Duodecim*. 1989; 105(13-14): 1246-51.
7. Bakland G, Nossent HC, Gran JT. Incidence and Prevalence of Ankylosing Spondylitis in Northern Norway. *Arthritis & Rheum* 2005; 53(6): 850–855
8. Gofton P, Robinson HS, Trueman GE. Ankylosing spondylitis in a Canadian Indian population. *Ann Rheum Dis* 1966; 25(6): 525- 527

9. Gömör B, Gyodi E, Bakos L. Distribution of HLA B27 and ankylosing spondylitis in the Hungarian population. *J Rheumatol Suppl.* 1977; 3: 33-35.
10. Feldtkeller E, Khan MA, van der Heijde D, van der Linden S, Braun J. Age at disease onset and diagnosis delay in HLA-B27 negative vs. positive patients with ankylosing spondylitis. *Rheumatol Int.* 2003; 23(2) :61-66
11. Baraliakos X, Braun J. Non-radiographic axial spondyloarthritis and ankylosing spondylitis: what are the similarities and differences? *RMD Open.* 2015 Aug 15;1(Suppl 1):e000053
12. Dean LE, Jones GT, MacDonald AG, Downham C, Sturrock RD, Macfarlane GJ. Global prevalence of ankylosing spondylitis. *Rheumatology (Oxford).* 2014 Apr;53(4):650-7
13. Bonfiglioli R, Conde RA, Sampaio-Barros PD, Louzada-Junior P, Donadi EA, Bertolo MB. Frequency of HLA-B27 alleles in Brazilian patients with psoriatic arthritis. *Clin Rheumatol.* 2008 Jun;27(6):709-12
14. Taurog JD, Hammer RE. Experimental spondyloarthropathy in HLA-B27 transgenic rats.. *Clin Rheumatol.* 1996; 15(1): 22-27.
15. Sheehan NJ. HLA-B27: what's new? *Rheumatology (Oxford).* 2010 Apr;49(4):621-31

16. Kim TH, Uhm WS, Inman RD. Pathogenesis of ankylosing spondylitis and reactive arthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2005; 17(4): 400-405.
17. Ramos M, Lopez de Castro JA. HLA-B27 and the pathogenesis of spondyloarthritis. *Tissue Antigens*. 2002; 60(3): 191-205.
18. Colbert RA, DeLay ML, Layh-Schmitt G, Sowders DP. HLA-B27 misfolding and spondyloarthropathies. *Prion* 2009; 3(1): 15-26.
19. Lories RJ. Animal models of spondyloarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2006 Jul;18(4):342-6
20. Colbert RA, Tran TM, Layh-Schmitt G. HLA-B27 misfolding and ankylosing spondylitis. *Mol Immunol*. 2014 Jan;57(1):44-51
21. Xu B, Ma JX, Ma XL, Jia HB, Feng R, Xu LY. Association between rs7517847 and rs2201841 polymorphisms in IL-23 receptor gene and risk of ankylosing spondylitis: a meta-analysis. *PeerJ*. 2015 Apr 23;3:e910.
22. Reeves E, Elliott T, James E, Edwards CJ. ERAP1 in the pathogenesis of ankylosing spondylitis. *Immunol Res*. 2014 Dec;60(2-3):257-69.
23. Sinkorová Z, Capková J, Niederlová J, Stepánková R, Sinkora J. Commensal intestinal bacterial strains trigger ankylosing enthesopathy of the ankle in inbred B10.BR (H-2(k)) male mice. *Hum Immunol* 2008; 69(12): 845-850.

24. Mease PJ. Spondyloarthritis update: new insights regarding classification, pathophysiology, and management. *M.D. Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases* 2008; 66(3): 203
25. Rashid T, Ebringer A. Autoimmunity in Rheumatic Diseases Is Induced by Microbial Infections via Crossreactivity or Molecular Mimicry. *Autoimmune Dis.* 2012;2012:539282
26. Olivieri I, Gherardi S, Bini C, Trippi D, Ciompi ML, Pasero G. Trauma and seronegative spondyloarthropathy: rapid joint destruction in peripheral arthritis triggered by physical injury. *Ann Rheum Dis* 1988; 61: 73-76.
27. Olivieri I, Gemignani G, Christou C, Pasero G. Trauma and seronegative spondyloarthropathy: report of two more cases of peripheral arthritis precipitated by physical injury. *Ann Rheumatic Diseases* 1989; 48: 520- 521
28. Stebbings SM, Taylor C, Tannock G, Baird MA, Highton J. The immune response to autologous *Bacteroides* in Ankylosing Spondylitis is characterized by reduced Interleukin 10 production. *J Rheumatology* 2009; 36: 4
29. Sherlock JP, Joyce-Shaikh B, Turner SP, Chao CC, Sathe M, Grein J, Gorman DM, Bowman EP, McClanahan TK, Yearley JH, Eberl G, Buckley CD, Kastelein RA, Pierce RH, Laface DM, Cua DJ. IL-23 induces spondyloarthropathy by acting on ROR- $\gamma$ t<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> enthesal resident T cells. *Nat Med.* 2012 Jul 1;18(7):1069-76
30. McGonagle D, McDermott MF. A proposed classification of the immunological diseases. *PLoS Med.* 2006;3(8):e297.

31. Vanaki N, Aslani S, Jamshidi A, Mahmoudi M. Role of innate immune system in the pathogenesis of ankylosing spondylitis. *Biomed Pharmacother.* 2018;105:130-143.
32. Ambarus C, Yeremenko N, Tak PP, Baeten D. Pathogenesis of spondyloarthritis: autoimmune or autoinflammatory? *Curr Opin Rheumatol.* 2012;24(4):351-8.
32. Calin A, Porta J, Fries JF, Schurman DJ. Clinical history as a screening test for ankylosing spondylitis. *JAMA* 1977; 237, 2613-2614
33. 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(4): 361-368.
34. Sieper J, van der Heijde D, Landewe' R, Brandt J, Burgos-Vagas R, Collantes-Estevez E, et al. New criteria for inflammatory back pain in patients with chronic back pain: a real patient exercise by experts from the Assessment of SpondyloArthritis international Society (ASAS). *Ann Rheum Dis* 2009; 68, 784-788
35. Sieper J et al. Ankylosing Spondylitis: an overview. *Ann Rheum Dis* 2002; 61:8-18.
36. Martin TM, Smith JR, Rosenbaum JT. Anterior uveitis: current concepts of pathogenesis and interactions with the spondyloarthropathies. *Curr Opin Rheumatol* 2002; 14: 337-41



37. Frezzotti R, Guerra R. *Oftalmologia essenziale*. Casa editrice Ambrosiana 2006; seconda edizione cap 7: pag 181-193.
38. Protopopov M, Poddubnyy D. Radiographic progression in non-radiographic axial spondyloarthritis. *Expert Rev Clin Immunol*. 2018 Jun;14(6):525-533.
39. Report on the Second international Enthesitis Workshop. *Arthritis & Rheumatism* 2003; 48(4): 896-905.
40. Benjamin M, McGonagle D. The anatomical basis for disease localisation in seronegative spondyloarthropathy at entheses and related sites. *J Anat* 2001; 199: 503-526.
41. Canoso JJ. The premiere enthesis. *J Rheum* 1998; 25: 1254–1256
42. Benjamin M, Ralphs JR. Fibrocartilage in tendons and ligaments adaptation to compressive load. *Journal of Anatomy* 1998;193: 481-494.
43. Benjamin, Toumi H, Ralphs JR, Bydder G, Bestand T M, Milz S . Where tendons and ligaments meet bone: attachment sites (‘entheses’) in relation to exercise and/or mechanical load. *J Anat* 2006; 208: 471-490
44. Benjamin M, McGonagle D. Histopathologic Changes at “Synovio–Enthesial Complexes” suggesting a novel mechanism for synovitis in Osteoarthritis and Spondylarthritis. *Arthritis & Rheumatism* 2007; 56 (11): 3601–3609

45. Schett G, Lories RJ, D'Agostino MA, Elewaut D, Kirkham B, Soriano ER, McGonagle D. Enthesitis: from pathophysiology to treatment. *Nat Rev Rheumatol*. 2017 Nov 21;13(12):731-741.
46. Lubrano E, Marchesoni A, Olivieri I, D'Angelo S, Palazzi C, Scarpa R, Ferrara N, Parsons WJ, Brunese L, Helliwell PS, Spadaro A. The radiological assessment of axial involvement in psoriatic arthritis. *J Rheumatol Suppl*. 2012 Jul;89:54-6.
50. Cittadini G. Diagnostica per immagini e radioterapia. Edizioni Culturali Internazionali Genova 2003; cap. XIII: pag 230-231
51. Ory PA, Gladman DD, Mease PJ. Psoriatic arthritis and imaging. *Ann Rheum Dis* 2005; vol. 64 (suppl. II), pp. 55-57.
52. Walter P Maksymowych. Spondyloarthritis: lessons from imaging. *Arthritis Research & Therapy* 2009, 11: 222
53. Spadaro A, Iagnocco A, Perrotta FM, Modesti M, Scarno A, Valesini G. Clinical and ultrasonography assessment of peripheral enthesitis in ankylosingspondylitis. *Rheumatology (Oxford)*. 2011 Nov;50(11):2080-6
54. Perrotta FM, Addimanda O, Ramonda R, D'Angelo S, Lubrano E, Marchesoni A, Olivieri I, Punzi L, Salvarani C, Spadaro A. Predictive factors for partial remission according to the Ankylosing Spondylitis Assessment Study working group in patients with ankylosing spondylitis treated with anti-TNF $\alpha$  drugs. *Reumatismo*. 2014 Nov 6;66(3):208-14
55. Lubrano E, Perrotta FM, Marchesoni A, D'Angelo S, Ramonda R, Addimanda O, Olivieri I, Punzi L, Salvarani C. Remission in nonradiographic axial spondyloarthritis treated with anti-tumor

necrosis factor- $\alpha$  drugs: an Italian multicenter study. *J Rheumatol.* 2015 Feb;42(2):258-63

56. Sieper J, van der Heijde D. Review: Nonradiographic axial spondyloarthritis: new definition of an old disease? *Arthritis Rheum.* 2013 Mar;65(3):543-51

57. Poddubnyy D, Rudwaleit M, Haibel H, et al. Rates and predictors of radiographic sacroiliitis progression over 2 years in patients with axial spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis* 2011;70(8):1369-74.

58. Poddubnyy D, Haibel H, Listing J, et al. Baseline radiographic damage, elevated acute-phase reactant levels, and cigarette smoking status predict spinal radiographic progression in early axial spondylarthritis. *Arthritis Rheum* 2012; 64(5):1388e98.

59. Song H, Poddubnyy DA, Rudwaleit M, Sieper J. Benefits and Risks of Ankylosing Spondylitis Treatment With Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs. *Arthr & Rheum* 2008; 58(4): 929–938

60. van der Heijde D, Ramiro S, Landewé R, Baraliakos X, Van den Bosch F, Sepriano A, Regel A, Ciurea A, Dagfinrud H, Dougados M, van Gaalen F, Géher P, van der Horst-Bruinsma I, Inman RD, Jongkees M, Kiltz U, Kvien TK, Machado PM, Marzo-Ortega H, Molto A, Navarro-Compán V, Ozgocmen S, Pimentel-Santos FM, Reveille J, Rudwaleit M, Sieper J, Sampaio-Barros P, Wiek D, Braun J. 2016 update of the ASAS-EULAR management recommendations for axial spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2017 Jun;76(6):978-991

61. Chen J, Liu C. Sulfasalazine for ankylosing spondylitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2005;(2):CD004800.

62. Nigil H et al. The Impact of TNF-inhibitors on radiographic progression in Ankylosing Spondylitis. *Ann heum Dis* 2013; 65: 264
63. Lubrano E, Perrotta FM. Secukinumab for ankylosing spondylitis and psoriatic arthritis. *Ther Clin Risk Manag.* 2016 Oct 21;12:1587-1592
64. Fries JF, Spitz P, Kraines RG. Health Assessment Questionnaire (HAQ), Measurement of patient outcome in arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 1980; 23: 137-145
65. Scott-Huskinson EC. Graphic representation of pain. *Pain*, 1976; 2:175-184
66. Lubrano E, Perrotta FM, Parsons WJ, Marchesoni A. Patient's Global Assessment as an Outcome Measure for Psoriatic Arthritis in Clinical Practice: A Surrogate for Measuring Low Disease Activity? *J Rheumatol.* 2015 Dec;42(12):2332-8
67. Garret S, Jenkinson T, Whitelock H, Gaisford P, Calin A. A new approach to defining disease status in ankylosing spondylitis: the Bath Ankylosing spondylitis Activity Index. *J Rheumatology* 1994; 21: 286-2291.
68. Jenkinson TR, Mallorie PA, Whitelock HC, Kennedy LG, Garret SL, Calin A. Defining spinal mobility in ankylosing spondylitis (AS). The Bath AS Metrology Index. *J Rheumatology* 1994; 21(9): 1694-1698
69. Lukas C, Landewé R, Sieper J, Dougados M, Davis J, Braun J, van der Linden S, van der Heijde D. Development of an ASAS-endorsed

disease activity score (ASDAS) in patients with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2009;68:18-24.

70. Heuft-Dorenbosch L, Spoorenberg A, Van Tubergen A et al.: Assessment of enthesitis in ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis*. 62, 127-132 (2003).

71. Creemers MC, Franssen MJ, van't Hof MA, Gribnau FW, van de Putte LB, van Riel PL. Assessment of outcome in ankylosing spondylitis: an extended radiographic scoring system. *Ann Rheum Dis*. 2005 Jan;64(1):127-9.

72. Lories RJ, Haroon N. Bone formation in axial spondyloarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2014 Oct;28(5):765-77

73. De Bari C, Dell'Accio F, Luyten FP. Human periosteum-derived cells maintain phenotypic stability and chondrogenic potential throughout expansion regardless of donor age. *Arthritis Rheum* 2001;44(1):85-95.

74. De Bari C, Dell'Accio F, Vanlauwe J, et al. Mesenchymal multipotency of adult human periosteal cells demonstrated by single-cell lineage analysis. *Arthritis Rheum* 2006;54(4):1209e21

75. Lories RJ, Matthys P, de Vlam K, et al. Ankylosing enthesitis, dactylitis, and onychoprosperiostitis in male DBA/1 mice: a model of psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis* 2004;63(5):595-8.

76. Lefebvre V, Bhattaram P. Vertebrate skeletogenesis. *Curr Top Dev Biol* 2010;90:291e317.

77. Minamizaki T, Yoshiko Y, Kozai K, et al. EP2 and EP4 receptors differentially mediate MAPK pathways underlying anabolic actions of prostaglandin E2 on bone formation in rat calvaria cell cultures. *Bone* 2009;44(6):1177-85.
78. Namikawa T, Terai H, Hoshino M, et al. Enhancing effects of a prostaglandin EP4 receptor agonist on recombinant human bone morphogenetic protein-2 mediated spine fusion in a rabbit model. *Spine* 2007;32(21):2294-9.
79. Toyoda H, Terai H, Sasaoka R, et al. Augmentation of bone morphogenetic protein-induced bone mass by local delivery of a prostaglandin E EP4 receptor agonist. *Bone* 2005;37(4):555-62.
80. Cortes A, Maksymowych WP, Wordsworth BP, et al. Association study of genes related to bone formation and resorption and the extent of radiographic change in ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2014
81. Gravallesse EM, Schett G. Effects of the IL-23-IL-17 pathway on bone in spondyloarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2018 Nov;14(11):631-640.
82. Lubberts E, Joosten LA, Oppers B, van den Bersselaar L, Coenen-de Roo CJ, Kolls JK, Schwarzenberger P, van de Loo FA, van den Berg WB. IL-1-independent role of IL-17 in synovial inflammation and joint destruction during collagen-induced arthritis. *J Immunol*. 2001 Jul 15;167(2):1004-13
83. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T

et al (1998) Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93:165–176

84. Karmakar S, Kay J, Gravallesse EM. Bone damage in rheumatoid arthritis: mechanistic insights and approaches to prevention. *Rheum Dis Clin North Am.* 2010 May;36(2):385-404

85. Kim HR, Lee SH, Kim HY (2006) Elevated serum levels of soluble receptor activator of nuclear factors-kappaB ligand (sRANKL) and reduced bone mineral density in patients with ankylosing spondylitis (AS). *Rheumatology (Oxford)* 45:1197–1200

86. 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 Oct;29(10):1155-61

87. Kim HR, Lee SH, Kim HY (2006) Elevated serum levels of soluble receptor activator of nuclear factors-kappaB ligand (sRANKL) and reduced bone mineral density in patients with ankylosing spondylitis (AS). *Rheumatology (Oxford)* 45:1197–1200

88. Franck H, Meurer T, Hofbauer LC (2004) Evaluation of bone mineral density, hormones, biochemical markers of bone metabolism, and osteoprotegerin serum levels in patients with ankylosing spondylitis. *J Rheumatol* 31:2236–2241

89. Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors.* 2004 Dec;22(4):233-41

90. Lories RJU, Derese I, Luyten FP: Modulation of Bone Morphogenetic Protein signaling inhibits the onset and progression of ankylosing enthesitis. *J Clin Invest* 2005, 115:1571-1579.
91. Park MC, Park YB, Lee SK. Relationship of bone morphogenetic proteins to disease activity and radiographic damage in patients with ankylosing spondylitis. *Scand J Rheumatol* 2008;37(3):200-4
92. Kubota T, Michigami T, Ozono K. Wnt signaling in bone. *Clin Pediatr Endocrinol*. 2010 Jul;19(3):49-56.
93. Klingberg E, Nurkkala M, Carlsten H, Forsblad-d'Elia H. Biomarkers of bone metabolism in ankylosing spondylitis in relation to osteoproliferation and osteoporosis. *J Rheumatol*. 2014 Jul;41(7):1349-56
94. Appel H, Ruiz-Heiland G, Listing J, Zwerina J, Herrmann M, Mueller R, Haibel H, Baraliakos X, Hempfing A, Rudwaleit M, Sieper J, Schett G. Altered skeletal expression of sclerostin and its link to radiographic progression in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum*. 2009 Nov;60(11):3257-62
95. Korkosz M, Gąsowski J, Leszczyński P, Pawlak-Buś K, Jeka S, Kucharska E, Grodzicki T. High disease activity in ankylosing spondylitis is associated with increased serum sclerostin level and decreased wingless protein-3a signaling but is not linked with greater structural damage. *BMC Musculoskelet Disord*. 2013 Mar 19;14:99.



96. Tsui FW, Tsui HW, Las Heras F, Pritzker KP, Inman RD. Serum levels of novel noggin and sclerostin-immune complexes are elevated in ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis*. 2014 Oct;73(10):1873-9
97. Yazdani U, Terman JR. The semaphorins. *Genome Biol*. 2006;7(3):211.
98. Negishi-Koga T, Takayanagi H. Bone cell communication factors and Semaphorins. *Bonekey Rep*. 2012 Sep 19;1:183.
99. Qiao Q, Song YL, Li FL. [Semaphorin 3A-stimulated bone marrow mesenchymal stem cells sheets promotes osteogenesis of type 2 diabetic rat]. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 2018 May 9;53(5):333-338
100. Vadasz Z, Haj T, Halasz K, Rosner I, Slobodin G, Attias D, Kessel A, Kessler O, Neufeld G, Toubi E. Semaphorin 3A is a marker for disease activity and a potential immunoregulator in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*. 2012 Jun 14;14(3):R146
101. Maksymowych WP, Chiowchanwisawakit P, Clare T, Pedersen SJ, Østergaard M, Lambert RG. Inflammatory lesions of the spine on magnetic resonance imaging predict the development of new syndesmophytes in ankylosing spondylitis: evidence of a relationship between inflammation and new bone formation. *Arthritis Rheum*. 2009 Jan;60(1):93-102
102. Maksymowych WP, Wichuk S, Chiowchanwisawakit P, Lambert RG, Pedersen SJ. Fat metaplasia and backfill are key intermediaries in the development of sacroiliac joint ankylosis in patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheumatol*. 2014 Nov;66(11):2958-67

103. Baraliakos X, Heldmann F, Callhoff J, Listing J, Appelboom T, Brandt J, Van den Bosch F, Breban M, Burmester G, Dougados M, Emery P, Gaston H, Grunke M, Van Der Horst-Bruinsma IE, Landewé R, Leirisalo-Repo M, Sieper J, De Vlam K, Pappas D, Kiltz U, Van Der Heijde D, Braun J. Which spinal lesions are associated with new bone formation in patients with ankylosing spondylitis treated with anti-TNF agents? A long-term observational study using MRI and conventional radiography. *Ann Rheum Dis.* 2014 Oct;73(10):1819-25
104. Yui S, Nakatani Y, Mikami M. Calprotectin (S100A8/S100A9), an inflammatory protein complex from neutrophils with a broad apoptosis-inducing activity. *Biol Pharm Bull.* 2003;26(6):753-60
105. Huang J, Yin Z, Song G, Cui S, Jiang J, Zhang L. Discriminating Value of Calprotectin in Disease Activity and Progression of Nonradiographic Axial Spondyloarthritis and Ankylosing Spondylitis. *Dis Markers.* 2017;2017:7574147.
106. Turina MC, Sieper J, Yeremenko N, Conrad K, Haibel H, Rudwaleit M, Baeten D, Poddubnyy D. Calprotectin serum level is an independent marker for radiographic spinal progression in axial spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2014 Sep;73(9):1746-8
107. Mahmoud A, Fayed D, Gabal MM, Hamza SM, Badr T. Insight on Bone Morphogenetic Protein 7 in Ankylosing Spondylitis and its association with disease activity and radiographic damage. *Electron Physician.* 2016 Jul 25;8(7):2670-8.

108. Saad CG, Ribeiro AC, Moraes JC, Takayama L, Goncalves CR, Rodrigues MB, de Oliveira RM, Silva CA, Bonfa E, Pereira RM. Low sclerostin levels: a predictive marker of persistent inflammation in ankylosing spondylitis during anti-tumor necrosis factor therapy? *Arthritis Res Ther.* 2012 Oct 12;14(5):R216.

109. J. Shi, H. Ying, J. Du, and B. Shen, "Serum sclerostin levels in patients with ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis," *BioMed Research International*, vol. 2017, Article ID 9295313, 7 pages, 2017

110. Ustun N, Tok F, Kalyoncu U, Motor S, Yuksel R, Yagiz AE, Guler H, Turhanoglu AD. Sclerostin and Dkk-1 in patients with ankylosing spondylitis. *Acta Reumatol Port.* 2014 Apr-Jun;39(2):146-51

111. Xie Z, Wang P, Li Y, Deng W, Zhang X, Su H, Li D, Wu Y, Shen H. Imbalance Between Bone Morphogenetic Protein 2 and Noggin Induces Abnormal Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells in Ankylosing Spondylitis. *Arthritis Rheumatol.* 2016 Feb;68(2):430-40

