



Università degli Studi di Foggia

DOTTORATO DI RICERCA

“Medicina Traslazionale e Management dei sistemi sanitari”

Ciclo XXXIV

**Evaluation of changes in bone metabolism in patients
with rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis
treated with biological drugs DMARDs.**

PhD student:
Eliana Rita Sanpaolo

Relatore:
Prof.ssa Teresa Santantonio

Correlatore:
Prof. Francesco Paolo Cantatore

Anno Accademico 2020-2021

INDICE

<i>INTRODUZIONE</i>	2
<i>1. RA</i>	4
<i>2. PsA</i>	7
<i>3. RIMODELLAMENTO OSSEO</i>	9
<i>3.1 RIMODELLAMENTO OSSEO IN RA e PsA</i>	10
<i>4. TNF-α E PATOGENESI IN RA e PsA</i>	16
<i>5. EFFETTO DMARDs NON CONVENZIONALI</i>	18
<i>6. SCOPO DELLA RICERCA</i>	23
<i>7. MATERIALI E METODI</i>	24
<i>8. RISULTATI</i>	28
<i>9. DISCUSSIONE</i>	52
<i>10. CONCLUSIONI</i>	63
<i>BIBLIOGRAFIA</i>	65

INTRODUZIONE

Le malattie reumatiche infiammatorie croniche sono in grado di modificare il normale processo di rimodellamento osseo, in quanto possono determinare un aumento del riassorbimento o un decremento della neoapposizione ossea, o entrambi. Nell'artrite reumatoide (RA) e nell'artrite psoriasica (PsA) si osserva una significativa alterazione di tali meccanismi. In particolare, la distruzione dell'osso iuxtarticolare che porta ad abnormi processi erosivi, rappresenta la tipica alterazione ossea che contribuisce ai cambiamenti strutturali articolari associati a entrambe le malattie (1, 2). Nelle artriti croniche, tra i meccanismi alla base dello sviluppo dell'osteoporosi generalizzata ci sono l'attività della malattia, l'immobilità e l'uso di corticosteroidi, mentre la stretta interazione della membrana sinoviale con l'osso causa osteopenia iuxtarticolare ed erosioni ossee, specie in corso di RA, mediante l'azione locale delle citochine infiammatorie. Infatti, i tessuti sinoviali infiammati esprimono citochine, capaci di causare alterazioni ossee locali, stimolare l'attività osteoclastica, inibendo quella osteoblastica, raggiungendo come risultato finale un bilancio di perdita ossea netta e mancata riparazione delle erosioni. Lo sviluppo di questa perdita ossea focale dipende in modo critico dagli osteoclasti (3), che derivano dai precursori delle cellule mononucleate della linea dei monociti/macrofagi (4). Il legame tra cellule ossee, infiammazione e cellule immunitarie è stato ampiamente studiato negli ultimi anni; in particolare, evidenze cliniche e sperimentali hanno dimostrato che le principali citochine coinvolte nella patogenesi dei cambiamenti infiammatori osservate in RA e in PsA svolgono un ruolo significativo nella perdita ossea sistemica e locale. Recenti evidenze sperimentali suggeriscono che il sistema immunitario e il tessuto osseo sono strettamente interconnessi e che esiste una stretta relazione tra le citochine

proinfiammatorie prodotte durante i processi sistemici di flogosi cronica e il danno osseo periarticolare e generalizzato (5, 6). Vari modelli sperimentali hanno dimostrato che in queste malattie il riassorbimento osseo patologico è, almeno in parte, dovuto ad un aumento del numero di precursori degli osteoclasti (7). In condizioni fisiologiche, la maturazione e l'attivazione degli osteoclasti sono mediate dal fattore di stimolazione delle colonie dei macrofagi (M-CSF) e il recettore attivatore del fattore nucleare $\kappa\beta$ ligando (RANKL) espressi dagli osteoblasti e dalle cellule dello stroma, mentre in condizioni patologiche come l'artrite, questo processo è marcatamente potenziato dalle citochine proinfiammatorie come il fattore di necrosi tumorale alpha (TNF- α), interleuchina-1 e 17, (IL-1 e IL-17), up-regolazione e produzione di Dickkopf (Dkk-1) e sclerostina, che svolgono un ruolo critico sia in RA che in PsA (8). Le cellule T attivate così come le cellule stromali, come i sinoviociti, i fibroblasti, sono importanti mediatori dell'osteoclastogenesi avanzata sia in RA che in PsA, entrambi possono esprimere RANKL e possono produrre citochine proinfiammatorie (9). Inoltre, è stato descritto il processo di differenziamento cellulare di tipo spontaneo da cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) a osteoclasti in modo indipendente da RANKL e altri mediatori sia in RA che PsA (5, 7). I target biologici che bloccano singole citochine, come il TNF- α , IL-6, IL-1, hanno dimostrato l'efficacia clinica in RA e in PsA, essendo in grado di ridurre l'attività della malattia e di prevenire il danno strutturale dell'osso o anche di ridurre le lesioni erosive preesistenti (10, 11).

Per Valutare lo “stato di salute” dell’osso e gli eventuali cambiamenti che occorrono in corso di stati patologici, come nel caso delle artriti croniche, ci si serve di opportune apparecchiature.

L'assorbimetria a raggi X a doppia energia (DXA- Dual X-ray Absorptiometry) è la tecnica strumentale di riferimento (gold standard) per la misurazione della densità minerale ossea (BMD) espressa in g/cm^2 e in termini di T-score che rappresenta il parametro per la definizione diagnostica dell'osteoporosi e uno dei dati fondamentali per la determinazione del rischio fratturativo nella pratica clinica corrente. Tuttavia, la BMD rappresenta la valutazione della quantità di osso per unità di superficie e non fornisce alcuna informazione sulla qualità della microarchitettura ossea. Recentemente è stata sviluppata una nuova tecnica di imaging non invasiva, in grado di determinare un nuovo parametro "strutturale", il Trabecular Bone Score (TBS), una misurazione della struttura del livello di grigi effettuata su rielaborazioni in pixel delle immagini acquisite con metodica DEXA. Il TBS è correlato alla microarchitettura ed al rischio fratturativo, fornendo informazioni sulla qualità dell'osso indipendenti dalla BMD standard.

1. RA

L' Artrite Reumatoide (RA) è una malattia infiammatoria autoimmune cronica, che attacca principalmente le articolazioni sinoviali. È caratterizzata da infiammazione poliarticolare simmetrica, che coinvolge più comunemente le piccole articolazioni di mani e piedi, che possono portare a danno articolare progressivo e conseguente disabilità funzionale con una diminuzione della qualità della vita; può anche manifestarsi in sedi extra-articolari (12). La prevalenza della malattia è di circa l'1% della popolazione e le donne tra i 40-50 anni sono più colpite degli uomini (13, 14). La sua patogenesi non è del tutto conosciuta, ma viene attribuita alla presenza di un terreno genetico predisponente su cui agiscono fattori ambientali e che determina

una anomala attivazione del sistema immunitario (15, 16). Evidenze cliniche suggeriscono l'importanza di una diagnosi e di un trattamento precoce della RA, in quanto capaci di modificare in modo decisivo il decorso della malattia (17), per cui sono stati introdotti i concetti di "window of opportunity", ad indicare una fase iniziale di malattia ove una terapia adeguata con Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs (DMARDs) si dimostra particolarmente efficace nel contrastare la sua progressione (18) e di early rheumatoid arthritis o RA all'esordio (19, 20). L'importanza dell'identificazione di una artrite in fase precoce consiste proprio nell'individuare quei fattori (ad esempio positività degli anticorpi anticitrullina (ACPA)) predittivi di persistenza e maggiore aggressività di malattia (21). Nel 2010 l'American College of Rheumatology (ACR) in collaborazione con l'European League Against Rheumatism (EULAR), con l'intento di migliorare l'identificazione precoce dei pazienti con artrite indifferenziata più propensi a sviluppare una forma cronica erosiva, ha proposto nuovi criteri classificativi (Figura 1), considerando i vecchi, datati 1987, quandanche sufficientemente specifici, non abbastanza sensibili nell'individuare le artriti in fasi precoci (22-24).

c) The ACR/EULAR 2010 classification criteria for RA. A score of 6 or more classifies a patient as definite RA. Adapted from references 16 & 17.

	Points
JOINTS (0-5)	
1 large joint	0
2-10 large joints	1
1-3 small joints (large joints not counted)	2
4-10 small joints (large joints not counted)	3
>10 joints (at least one small joint)	5
SEROLOGY (0-3)	
Negative RF AND negative ACPA	0
Low positive RF OR low positive ACPA	2
High positive OR high positive ACPA	3
SYMPTOM DURATION (0-1)	
<6 weeks	0
≥6 weeks	1
ACUTE PHASE REACTANTS (0-1)	
Normal CRP AND ESR	0
Abnormal CRP OR ESR	1

Patients should have at least 1 joint with definite clinical synovitis (swelling), with the synovitis not better explained by another disease. ACR, American College of Rheumatology; EULAR, European League Against Rheumatism; RF, rheumatoid factor; ACPA, anti-citrullinated protein antibody; CRP, C-reactive protein; ESR, erythrocyte sedimentation rate.

Figura 1: criteri classificativi ACR/EULAR 2010 per RA – da Mjaavatten et al. 2013

Tali criteri guadagnavano in sensibilità, perdendo però in specificità, oltre ad essere non agevolmente applicabili nella pratica clinica, per cui nel 2014 sono stati proposti i cosiddetti criteri ERA (Early Rheumatoid Arthritis), con specificità e sensibilità simili a quelle dei criteri 2010, ma più facili da applicare nella pratica clinica (Figura 2) (25, 26).

Criterion	Definition
1. Morning stiffness	Morning stiffness in and around the joints, lasting at least 30 minutes
2. Polyarthritits	At least 3 joints areas have had swelling. The 14 areas are right or left PIP, MCP, wrist, elbow, knee, ankle, and MTP joints.
3. Arthritis of hand joints	At least 1 area swollen in a wrist, MCP or PIP joint.
4. Positive RF	Positive refers to IU values that are more than the upper limit of normal for the laboratory and assay.
5. Positive anti-CCP antibodies	Positive refers to IU values that are more than the upper limit of normal for the laboratory and assay.

*A patient can be classified as rheumatoid arthritis if he/she has satisfied at least 3 out of these 5 criteria.

Figura 2: Criteri classificativi per ERA (Early Rheumatoid Arthritis).

La RA è caratterizzata da un coinvolgimento osseo rappresentato da osteoporosi generalizzata e perdita ossea localizzata, che include erosioni e osteopenia iuxtarticolare a carico delle articolazioni colpite (27). L'erosione ossea, processo che si verifica velocemente, può colpire l'80% dei pazienti con RA già entro un anno dalla diagnosi (28), ed è correlata con la presenza di un processo infiammatorio aumentato e prolungato (29). In aggiunta, così come la condizione osteoporotica può facilitare lo sviluppo delle erosioni, vi è una stretta correlazione tra perdita osseo locale e sistemica (30, 31).

2. PSA

L'Artrite Psoriasica (PsA) è una malattia infiammatoria appartenente ad un gruppo di malattie reumatiche infiammatorie, le Spondiloartriti (SpAs), che condividono un background genetico, meccanismi fisiopatologici e caratteristiche cliniche. A seconda della manifestazione principale, le SpAs possono essere classificate come assiali (che coinvolgono principalmente lo scheletro assiale, cioè le articolazioni sacro-iliache e la colonna vertebrale) o periferiche (caratterizzate da artrite, entesite o dattilite). Queste ultime includono l'Artrite Psoriasica (32, 33).

La malattia si può manifestare in qualsiasi periodo della vita ma più comunemente tra i 30-50 anni di età, con la stessa incidenza tra uomini e donne. Nella maggioranza dei casi il quadro cutaneo precede quello articolare. In Italia si stima che un terzo della popolazione affetta da psoriasi presenta o potrà sviluppare un'artrite psoriasica. Nonostante siano stati proposti diversi criteri diagnostici, non esiste un consenso universale. Per la diagnosi dell'Artrite Psoriasica tutte le linee guida raccomandano di seguire i criteri di classificazione definiti dal gruppo di studio CASPAR (Classification Criteria for Psoriatic Arthritis), utili per l'identificazione dei pazienti sia con malattia precoce sia con malattia "stabilizzata" e nonostante questi siano criteri classificativi, possono essere di supporto allo specialista di riferimento (reumatologo) per la diagnosi clinica di PsA (Figura 3) (34-36).

Tabella 1. Criteri CASPAR e punteggi attribuiti ad ogni condizione clinica.

Condizioni cliniche al momento della valutazione specialistica	punti
Psoriasi in atto*, anamnesi personale# o familiare° di psoriasi.	2
Presenza di tipica distrofia psoriasica ungueale incluse onicolisi, <i>pitting</i> e ipercheratosi.	1
Negatività al reumatest, eseguito con qualsiasi metodica tranne il metodo al latex .	1
Contemporanea presenza di dattilite, definita come ingrossamento delle dita o storia di dattilite, diagnosticata da uno specialista (reumatologo, dermatologo).	1
Evidenza radiografica (su radiografie standard delle mani e/o dei piedi) di una formazione juxta-articolare di nuovo osso evidenziabile come ossificazione mal definita in prossimità dei margini articolari (escludendo la formazione di osteofiti).	1
*Definita come una malattia della cute o del cuoio capelluto presente al momento della valutazione da parte del dermatologo o del reumatologo. #La storia personale di una pregressa psoriasi può essere riferita dal paziente o da un professionista. ° La storia familiare può risalire alla prima o alla seconda generazione.	

Figura 3: CRITERI CLASSIFICATIVI CASPAR PER PsA (ARTRITE PSORIASICA) - Linee guida terapeutiche n. 7, Aggiornamento Gennaio 2016 (34)

Nei pazienti affetti si trovano frequentemente valori elevati di proteina C-reattiva (PCR) nella fase acuta e attiva della malattia. Generalmente, il fattore reumatoide (FR), gli anticorpi antinucleo e anticorpi contro peptidi citrullinati risultano negativi (37).

Le erosioni ossee si verificano anche nei pazienti affetti da artrite psoriasica, ma, a differenza del coinvolgimento osseo che si verifica in RA, la PsA è caratterizzata dalla coesistenza di lesioni ossee distruttive e lesioni ossee produttive, il che suggerisce un'alterazione del processo di rimodellamento osseo nelle articolazioni colpite. (38-40).

In particolare, nella PsA le erosioni ossee sono associate alla formazione di nuovo osso, tipicamente ai bordi dell'articolazione della cartilagine all'inserzione delle entesi (41). Nei pazienti con PsA, il coinvolgimento sistemico dell'osso è meno consolidato rispetto ai pazienti con RA (42, 43). Tuttavia, un recente studio di popolazione in una coorte longitudinale ha mostrato un'incidenza di fratture maggiore del 7-26% nei pazienti con PsA e psoriasi, rispetto alla popolazione generale, ma non rispetto alla popolazione colpita da RA, in cui il rischio di frattura è risultato comparabile (44).

3. RIMODELLAMENTO OSSEO

Il rimodellamento osseo è un processo fisiologico responsabile della crescita e della riparazione/rigenerazione del tessuto osseo attraverso il corretto mantenimento dell'equilibrio tra la deposizione della matrice ossea e il riassorbimento durante lo sviluppo e l'omeostasi (45). Alla base di questo equilibrio vi è una stretta e coordinata attività tra due tipi cellulari: da un lato gli osteoclasti riassorbono il tessuto osseo vecchio mentre gli osteoblasti producono nuovo tessuto osteoide che, successivamente, viene mineralizzato e rimpiazza l'osso riassorbito; in condizioni normali questi due processi sono strettamente accoppiati e bilanciati (45-47). Gli osteoblasti hanno origine dalle cellule mesenchimali, mentre gli osteoclasti derivano dalle cellule staminali ematopoietiche (48, 49). Gli osteoblasti sono responsabili del processo di formazione dell'osso, produzione di proteine e mineralizzazione della matrice (50, 51). Durante il processo di differenziazione degli osteoblasti risultano overespressi due fattori trascrizionali, fattore di trascrizione correlato a Runt 2 (Runx2) e Osterix (Osx). Questi ultimi sono necessari per la regolazione del processo di differenziamento e sono coinvolti nel

mantenimento della funzionalità degli osteoblasti (52). Tuttavia, il ruolo degli osteoblasti riguarda anche la regolazione della differenziazione degli osteoclasti. Infatti, quando questi due tipi di cellule interagiscono, gli osteoblasti producono diversi fattori solubili, tra cui il fattore M-CSF, RANKL e osteoprotegerina (OPG) (53). Durante il processo di osteoclastogenesi, RANKL è un fattore essenziale. Infatti, RANKL, che è presente sulla superficie degli osteoblasti e può anche essere rilevata come proteina solubile a seguito della proteolisi da parte delle metalloproteinasi di matrice (MMP), interagisce con RANK, recettore transmembrana di tipo I presente sui macrofagi, inducendo il differenziamento degli osteoclasti. Il complesso RANK-RANKL stimola una cascata di segnali caratterizzati dalla trimerizzazione di RANK e dall'attivazione del fattore 6 associato al recettore del TNF (TRAF6), che in seguito sono responsabili dell'attivazione di NF- κ B e MAPK chinasi (mitogen-activated protein kinasis). (54). Questa interazione induce anche un aumento della capacità di riassorbimento osseo. Al contrario, l'interazione RANK/RANKL è regolata negativamente dalla presenza di OPG. Questa molecola solubile ha un'affinità vincolante con RANKL, quindi previene ulteriormente il legame (porta a un'interazione di legame inferiore) tra il ligando e il suo recettore sugli osteoclasti (52).

3.1 RIMODELLAMENTO OSSEO IN RA e PsA

Le malattie articolari infiammatorie croniche, tra cui la RA e la PsA, spesso sono caratterizzate dalla distruzione dell'osso iuxtaarticolare da erosioni dovute all'elevata attività delle cellule multinucleate, gli osteoclasti, coinvolte nel riassorbimento osseo. Infatti, negli ultimi anni l'attenzione è stata particolarmente focalizzata su queste cellule, riconosciute ampiamente come le cellule responsabili del danno

osseo locale e sistemico nell'RA e PsA (54, 55). In condizioni fisiologiche, la maturazione e l'attivazione degli osteoclasti sono mediate dal fattore M-CSF e RANKL espresse dagli osteoblasti e dalle cellule dello stroma. L'attivazione degli osteoclasti dipende dalla stimolazione esercitata dal recettore attivatore del fattore nucleare $\kappa\beta$ ligando (RANKL) a cui si lega l'attivatore del recettore del fattore nucleare (RANK) sulla superficie degli osteoclasti (Figura 4).

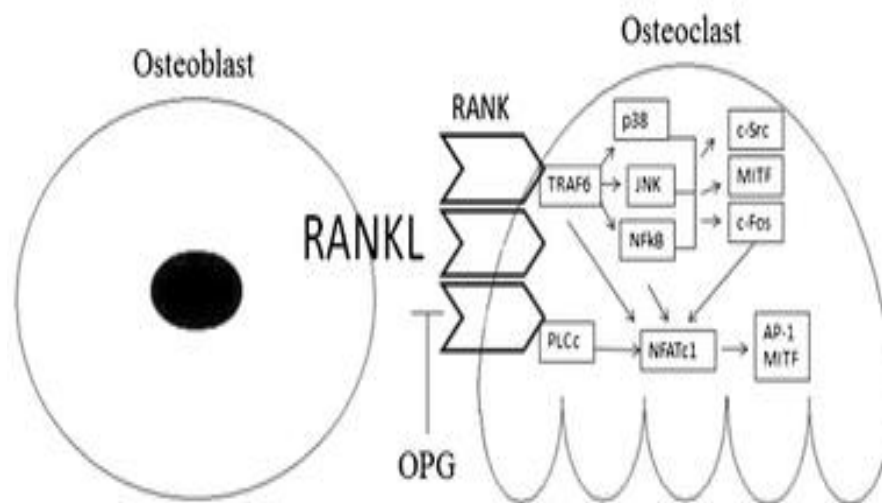


Figura 4: Il complesso RANK-RANKL. da Maruotti et al. 2011

RANKL è una citochina appartenente alla superfamiglia TNF- α , altamente espressa dalle cellule stromali/osteoblastiche e dai linfociti T attivati, induce direttamente la differenziazione dei precursori osteoclastici in osteoclasti maturi mediante il legame al suo recettore RANK. Il principale regolatore negativo dell'attività di RANKL è l'OPG, che è un recettore esca solubile per RANKL prodotto dagli osteoblasti (56). Questo recettore esca inibisce competitivamente il legame di RANKL a RANK sulla membrana cellulare degli osteoclasti, prevenendo così

l'attivazione di RANK e la conseguente osteoclastogenesi. Il sistema RANK-RANKL-OPG è il principale regolatore dell'osteoclastogenesi in condizioni fisiologiche e queste proteine sono cruciali per la fisiologia ossea (46, 57, 58), ma in condizioni patologiche come l'artrite, questo processo è marcatamente potenziato dalle citochine proinfiammatorie come il TNF- α , interleuchina-1, interleuchina-6 e 17, (IL-1, IL-6 e IL-17), up-regolazione e produzione di Dkk-1 e sclerostina, che svolgono un ruolo critico sia in RA che in PsA. Le principali citochine proinfiammatorie IL-1, IL-6, e TNF- α si trovano in concentrazioni più elevate nel liquido sinoviale e nei tessuti dei pazienti con RA e rappresentano i mediatori chiave implicati nel processo infiammatorio e nella risposta immunitaria alla base della patogenesi di questa malattia. Tutte queste citochine sono in grado di influenzare negativamente il metabolismo osseo con meccanismi diversi e di conseguenza sono coinvolti nella patogenesi della perdita ossea sia generalizzata che locale (55, 59). La regolazione del pathway NF- $\kappa\beta$ attraverso il sistema RANK/RANKL/OPG risulta essenziale per il processo di osteoclastogenesi e per l'attività degli osteoclasti, ma questa via di segnalazione (NF- $\kappa\beta$) può essere attivata anche dal TNF- α tramite il recettore 1 del TNF (TNFR1), il quale è espresso dai precursori degli osteoclasti (60). Vari studi suggeriscono che in queste patologie il TNF- α possa favorire il processo di riassorbimento osseo, ma è anche capace di aumentare il differenziamento, il reclutamento e l'attività degli osteoclasti sia direttamente che indirettamente. Nel primo caso questa abilità del TNF- α è dettata dalla presenza di concentrazioni minime di RANKL o dall'assenza della sua segnalazione; nel secondo caso, indirettamente, è dettata dall'aumentata espressione degli attivatori degli osteoclasti (M-CSF e RANKL) in diversi tipi cellulari, tra cui gli osteoblasti e le cellule del sistema immunitario (61, 62).

Nonostante l'analisi degli effetti ossei dell'infiammazione in corso di RA e PsA siano stati prevalentemente focalizzati sull'aumento del riassorbimento osseo mediato dagli osteoclasti indotto da diverse citochine implicate nella patogenesi della malattia, negli ultimi anni diversi studi hanno dimostrato che l'infiammazione non solo induce l'osteoclastogenesi, ma è in grado di alterare la differenziazione e funzionalità degli osteoblasti; in particolare è stato mostrato che il TNF- α possiede anche la capacità di inibire questi due processi (57, 63). Nonostante il principale meccanismo di perdita ossea associato all'infiammazione sia dovuto ad un aumentato riassorbimento osseo, studi *in vitro* mostrano che il TNF- α , attraverso il suo recettore TNFR1, è in grado di aumentare il processo apoptotico degli osteoblasti e diminuirne il processo di differenziamento e proliferazione, interferendo con l'espressione dei due regolatori essenziali coinvolti nel differenziamento degli osteoblasti, Runx2 e Osterix. Tuttavia, anche il pathway di segnalazione Wntless (Wnt) risulta essere di notevole interesse durante il processo di rimodellamento osseo. Questa via di segnalazione è coinvolta nel processo di differenziamento e proliferazione degli osteoblasti, ed è stato mostrato che il TNF- α può sopprimere la formazione ossea mediata da osteoblasti attraverso l'inibizione della via Wnt- β -catenina, che è una delle vie canoniche di formazione ossea, attraverso la sovraregolazione degli inibitori di Wnt, Dkk-1 e sclerostina (61, 64, 65).

La famiglia Wnt nell'uomo comprende attualmente 19 diverse glicoproteine (33, 66) che possono innescare cascate multiple di segnalazione: la "via canonica", detta anche "via Wnt/ β -catenina", e diversi "percorsi non canonici" (Figura 5).

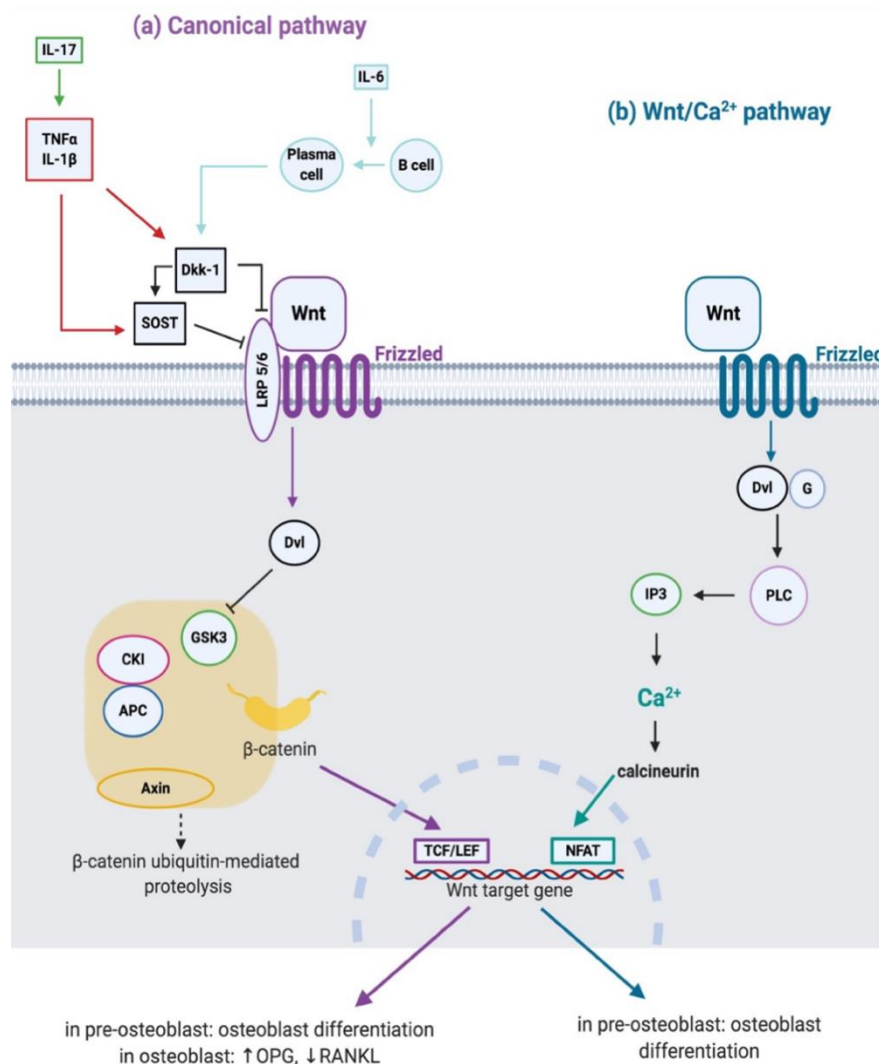


Figura 5: Wnt signaling pathways. (a) Canonical Wnt pathway (b) Wnt/Ca²⁺ pathway – da Cici et al. 2019

La via di trasduzione del segnale “wingless” (Wnt) gioca un ruolo essenziale nella differenziazione e funzione osteoblastica. Il pathway Wnt canonico è attivato dalle “low density lipoprotein receptor related proteins” (LRP) 5 and LRP6 che formano un complesso con i co-recettori Frizzled, stabilizzano la beta-catenina citosolica e inducono la trascrizione di geni essenziali per la differenziazione osteoblastica e la formazione ossea. Diversi antagonisti del pathway di segnalazione Wnt, tra cui

sclerostina e Dkk-1 sono in grado di sopprimere il pathway di segnalazione Wnt negli osteoblasti e quindi ridurre la differenziazione e attività. Il Dkk-1 gioca probabilmente un ruolo fondamentale nelle complicanze ossee delle malattie reumatiche infiammatorie croniche; è stato infatti dimostrato che i tessuti articolari sede di processi infiammatori in RA producono Dkk-1, che il TNF- α è un potente induttore dell'espressione di Dkk-1 e inibisce la formazione ossea nelle articolazioni di pazienti con RA (67, 68). Il pathway di segnalazione Wnt è coinvolto nella perdita di osso sistemica e localizzata, tipiche alterazioni ossee della RA. Negli ultimi anni, gli inibitori di Wnt, Dkk-1 e la sclerostina, hanno acquisito maggiore importanza nella comprensione dei processi fisiopatologici alla base della RA. In un recente studio è stato mostrato che i livelli sierici di sclerostina erano significativamente più alti nei pazienti con RA rispetto ai controlli e correlavano con elevata attività di malattia, elevati livelli degli indici di infiammazione, e con una maggiore entità del danno osseo (69-71). Il Dkk-1 potrebbe rappresentare un bersaglio terapeutico nella RA, in quanto può essere un biomarcatore del danno strutturale e anche un predittore di progressione strutturale (70).

Anche nella PsA vi è il coinvolgimento del pathway di segnalazione Wnt. La via di segnalazione Wnt e i suoi inibitori, come Dkk-1 e sclerostina, a causa del loro ruolo nell'omeostasi ossea, potrebbero svolgere un importante ruolo nella PsA. In uno studio recente, in pazienti con PsA i livelli sierici di Dkk-1 sono risultati significativamente inferiori rispetto ai pazienti con RA e soggetti sani di controllo, ma sono aumentati dopo il trattamento con anti-IL-17A, suggerendo un'inibizione della proliferazione ossea locale indotta da terapia, tipica delle lesioni ossee in PsA (72, 73). Il TNF- α è coinvolto anche in PsA, non solo per il suo effetto proinfiammatorio, ma anche come induttore del processo di osteoclastogenesi (74,

75) e per il suo effetto sul pathway Wnt, potenziando l'espressione degli inibitori Dkk-1 e sclerostina (33, 67, 68, 76).

4. TNF- α E PATOGENESI IN RA E PSA

Il TNF- α , dalla sua scoperta avvenuta circa 40 anni fa, è stato associato a diverse malattie e identificato come una importante citochina proinfiammatoria. È una citochina pleiotropica: la molecola del precursore del TNF- α è prodotta come proteina transmembrana, che in seguito subisce il clivaggio da parte di una metalloproteinasi, con conseguente formazione e rilascio del TNF solubile. Una delle principali fonti di TNF sono i macrofagi derivanti dai monociti, che esprimono citochine proinfiammatorie, identificate nei pazienti con RA, ma anche i linfociti T, i neutrofili, cellule endoteliali, fibroblasti e osteoclasti. Il suo ruolo è implicato nei processi di proliferazione cellulare, apoptosi e svolge anche un importante ruolo nei principali processi infiammatori. Il TNF sostiene anche l'infiammazione, in particolare nelle articolazioni, dove induce la proliferazione del rivestimento sinoviale e la migrazione dei neutrofili e di altre cellule immunitarie (77-79).

Nella patogenesi della RA un processo molto rilevante è l'attivazione dei macrofagi, che può verificarsi attraverso l'azione di citochine proinfiammatorie, immunocomplessi e recettori Toll-like (TLR). Studi recenti hanno evidenziato che gli ACPA, nonché fattori predittivi di attività erosiva della patologia, formano immunocomplessi che inducono la produzione di TNF e altre citochine proinfiammatorie da parte dei macrofagi.

Il TNF è uno dei principali regolatori della patogenesi della RA. In pazienti con RA risulta aumentata la sua espressione e la sovraespressione di TNF provoca artrite

autoimmune in modelli animali transgenici. Il suo coinvolgimento nella patogenesi di RA risulta essere multidirezionale; attiva le cellule endoteliali e recluta le cellule proinfiammatorie come i fibroblasti sinoviali e macrofagi, che rilasciano citochine proinfiammatorie come IL-6, IL-1 e TNF. Controlla anche lo sviluppo dei linfociti T helper (Th)1 e Th17, la produzione di anticorpi e differenziazione degli osteoclasti (80-82).

Il TNF gioca un importante ruolo anche nella patogenesi della PsA, in cui risulta essere aumentato nel tessuto e nel fluido sinoviale di pazienti affetti. A questo livello il TNF- α induce, attraverso la stimolazione e l'attivazione di cellule circolanti e residenti, la produzione di citochine, chemochine, molecole di adesione e metalloproteinasi. Il TNF- α , insieme ad altre citochine come IL-23, IL-17 e IL-22, sembra essere la citochina chiave che guida l'infiammazione e attiva le cellule residenti nell'articolazione e nelle entesi, inclusi sinoviociti simili a fibroblasti sinoviali, condrociti, osteoblasti e osteoclasti (81). Diversi studi hanno evidenziato la presenza di alcuni polimorfismi del promotore del TNF- α , suggerendo una forte associazione tra questi polimorfismi e la PsA, ipotizzando la loro importanza nella patogenesi della PsA e il loro potenziale utilizzo come biomarcatori di rischio per la malattia (83). Inoltre, è stato scoperto che alcuni polimorfismi a singolo nucleotide del gene TNF- α possono promuovere la risposta ai farmaci anti-TNF- α (83, 84).

Sulla scorta di tali considerazioni, furono sviluppati i primi farmaci biologici capaci di inibire il TNF- α . Al giorno d'oggi, cinque anti-TNF (infliximab - INF, etanercept - ETA, adalimumab - ADA, golimumab - GOL e certolizumab pegol - CZP) sono stati approvati per il trattamento della PsA (85).

5. EFFETTO DMARDS NON CONVENZIONALI

Oltre ai farmaci antiinfiammatori non steroidei e ai corticosteroidi, il trattamento tradizionale della RA consiste nell'utilizzo di farmaci antireumatici modificanti la malattia (DMARDs), i quali agiscono come agenti immuno-modulatori attraverso il loro effetto sui processi autoimmuni caratterizzanti la patologia. I DMARDs convenzionali e biologici sono le due principali classi di DMARDs utilizzate per RA. DMARD convenzionali (chiamati cDMARDs) includono farmaci come metotressato e idrossiclorochina (MTX e HCQ), mentre i farmaci biologici DMARDs non convenzionali sono anticorpi monoclonali e recettori solubili che prendono di mira molecole o cellule messaggere proteiche.

Negli ultimi anni, sono stati sviluppati degli agenti terapeutici che agiscono su uno specifico meccanismo molecolare appartenente alla cascata infiammatoria, tra cui appunto gli inibitori del TNF- α . Gli agenti anti-TNF- α sono stati approvati per il trattamento di varie malattie infiammatorie, e hanno mostrato la loro efficacia anche in RA e PsA; rappresentano i farmaci biologici più utilizzati dal 2000 e sono generalmente ben tollerati (33, 86).

Il blocco del TNF- α può agire prevenendo l'effetto stimolante diretto del TNF- α sull'osteoclastogenesi ma, è stato ipotizzato che l'inibizione del TNF- α possa agire anche attraverso la riduzione di RANKL, considerando che l'aumentata espressione di quest'ultimo è anche dovuta all'azione del TNF- α . Inoltre, è stato visto che il trattamento con anti-TNF- α potrebbe prevenire l'effetto negativo di questa citochina sul differenziamento e sull'attività degli osteoblasti (7, 46, 62). Il trattamento con anti-TNF- α induce una diminuzione significativa dei marker di riassorbimento osseo, come Ctx (Telopeptide C-terminale Del Collagene Di Tipo I), e un aumento dei marker di formazione ossea, tra cui Oc (osteocalcina) e PINP

(propeptide N-terminale del procollagene tipo 1), che rappresentano l'espressione di un cambiamento nei processi di rimodellamento osseo favorendo un bilancio osseo netto positivo (7, 87-90). L'effetto della terapia con farmaci biotecnologici in RA è dimostrabile grazie alla sua capacità di rallentare la distruzione ossea ed inibire la progressione radiologica. In modelli animali di CIA (collagen induced arthritis), il blocco di TNF- α riduce le erosioni in sede articolare, la perdita ossea generalizzata e l'infiammazione sinoviale (91, 92). Questo effetto è stato collegato al pathway di segnalazione cellulare Wnt, valutando l'effetto della terapia principalmente con gli inibitori del TNF- α (76).

In diversi studi è stato mostrato che l'utilizzo degli inibitori del TNF- α induce una diminuzione della concentrazione di Dkk-1 a livello sierico in pazienti con RA sottoposti a questo trattamento (33, 93-95). Infatti, in pazienti con RA sono stati riscontrati ridotti livelli sierici di Dkk-1 dopo 6 mesi di trattamento con agenti anti-TNF- α (con un maggior utilizzo di adalimumab e certolizumab) (93); in questi, però, non è stato osservato alcun cambiamento nei livelli sierici di sclerostina, altro inibitore del Wnt. Tuttavia, recentemente sono state condotte ulteriori ricerche che hanno portato a interessanti risultati. In particolare, in un gruppo di pazienti affetti da RA dopo 2 mesi di trattamento con anti-TNF- α certolizumab-pegol è stato riscontrato un repentino calo nelle concentrazioni sieriche sia di Dkk-1 che di sclerostina (65, 94). In pazienti con RA è stata riscontrata una concentrazione sierica di Dkk-1 significativamente aumentata rispetto ai controlli sani e ai pazienti affetti da altre malattie reumatiche (Osteoartrite, Sclerosi Sistemica, Lupus Eritematoso Sistemico, Spondilite Anchilosante), verosimilmente correlata al processo di erosione ossea (95). Questi dati hanno portato ad ipotizzare che il Dkk-1 possa fungere da biomarcatore dell'attività della malattia correlata all'erosione ossea, e quindi come nuovo indicatore clinico per RA. Queste evidenze

suggeriscono che ci sia una importante interazione tra la disregolazione della via di segnalazione Wnt, l'infiammazione TNF-dipendente e le alterazioni del metabolismo osseo nella RA.

I farmaci biologici anti-TNF- α attualmente autorizzati per la terapia della RA, si sono dimostrati efficaci anche nella PsA (96); sono stati i primi farmaci biologici considerati per il trattamento della PsA. La loro efficacia terapeutica, rispetto ai classici DMARDs, ha permesso di raggiungere uno stato di remissione e bassa attività di malattia, riscontrabile anche attraverso i marker di rimodellamento osseo, che potrebbe essere legato ad una ridotta progressione del danno articolare (28, 39, 40, 87). Il trattamento con gli inibitori del TNF- α ha pertanto notevolmente migliorato l'esito clinico dei pazienti riducendo i segni e i sintomi, migliorando così la qualità della vita. Il danno articolare erosivo, così come l'impatto sulla qualità della vita nei pazienti affetti da PsA, può essere paragonabile a quello in pazienti con RA (97). Sono state mostrate evidenze scientifiche sull'efficacia del trattamento con anti-TNF- α e sul coinvolgimento articolare in PsA. Infatti, a seguito del trattamento terapeutico con gli inibitori del TNF- α , è stata riscontrata una diminuzione dell'infiltrato cellulare globale e linfociti T, nonché una riduzione della vascolarizzazione in biopsia sinoviale di pazienti affetti da PsA (98). Dal punto di vista clinico, studi osservazionali e sperimentazioni cliniche hanno evidenziato l'efficacia dell'anti-TNF- α in tutti i domini clinici della PsA e in particolare nel coinvolgimento articolare periferico (98). In questo contesto, numerosi studi concentrano la loro attenzione sul ruolo di Dkk-1 in PsA, in relazione alla formazione ossea e trattamento con inibitori del TNF- α , ma spesso i dati risultano controversi (99-101). Per esempio, studi mostrano che in pazienti con spondilite anchilosante (AS), anche dopo trattamento con anti-TNF- α , i livelli sierici di Dkk-1 sono risultati significativamente più alti rispetto ai pazienti affetti

da RA e ai controlli sani (102). Un altro studio, contrariamente, ha rilevato che le concentrazioni sieriche di Dkk-1 in pazienti con AS erano più basse rispetto ai controlli sani, e che restavano invariate dopo il trattamento con anti-TNF- α (38, 102). Si potrebbe quindi ipotizzare che in AS i livelli circolanti di Dkk-1 non siano in grado di sopprimere la formazione ossea mediata da Wnt, e quindi l'incapacità del TNF- α di indurre Dkk-1 in SpA potrebbe essere una spiegazione del perché la terapia anti-TNF- α potrebbe non bloccare formazione di nuovo osso (76). Gli studi riguardanti il coinvolgimento del Dkk-1 nella patogenesi del danno strutturale e nei meccanismi molecolari risultano quindi in conflitto tra loro, suggerendo che la nuova formazione ossea osservata nei pazienti con PsA può essere regolata da diversi meccanismi di segnalazione e dall'inibitore sclerostina del Wnt. Sono stati studiati i livelli di sclerostina negli osteociti e nei sieri di pazienti con AS e questi sono risultati significativamente più bassi rispetto a quelli dei pazienti con RA e dei controlli sani. La sclerostina inibisce anche la segnalazione della proteina morfogenetica ossea (BMP). È stato riportato che una diminuzione dei livelli di Dkk-1 e sclerostina potrebbe attivare la segnalazione di Wnt e BMP (103).

Per quanto riguarda gli effetti degli anti-TNF- α sulla BMD diversi studi hanno documentato che vi è un lieve incremento o stabilità della BMD alla colonna vertebrale e una BMD stabile all'anca. Inoltre, comparando il trattamento con anti-TNF- α e farmaci tradizionali sintetici (csDMARDs) è stata mostrata una maggiore efficacia degli inibitori del TNF- α relativamente alla BMD (92) Tuttavia, non è del tutto conosciuto il meccanismo d'azione attraverso il quale gli anti-TNF agiscono sulla BMD; molti dati correlano l'effetto degli anti-TNF alle citochine proinfiammatorie, allo stato infiammatorio sistemico e alla perdita ossea generalizzata. È interessante capire se gli effetti positivi siano dovuti al trattamento stesso con anti-TNF o se questi siano dovuti ad un blocco dell'infiammazione anti-

TNF mediata (92). Un recente studio su un gruppo di pazienti affetti da diverse patologie reumatologiche, tra cui RA e SpA, ha valutato gli effetti degli agenti anti-TNF su TBS e BMD, e che, a differenza di quest'ultimo, vi è un'associazione tra TBS e attività della malattia misurato sia clinicamente (ASDAS) che attraverso i marker dell'inflammatione. Inoltre, è stato osservato che dopo trattamento con anti-TNF- α migliora la BMD, mentre il TBS resta invariato (104).

In uno studio prospettico su pazienti con RA e AS sono stati valutati i valori di TBS e BMD durante il trattamento con farmaci anti-TNF- α . I valori di BMD erano significativamente aumentati; i valori del TBS, invece, risultavano stabili in AS e significativamente diminuiti nel gruppo RA dove il trattamento a lungo termine con gli anti-TNF- α esercitava un effetto positivo sulla massa ossea a livello lombare. Rispetto alla AS, dunque, il TBS decresce nei pazienti affetti da RA in trattamento con anti-TNF- α suggerendo la loro influenza sull'osso (106).

6. SCOPO DELLA RICERCA

1. Valutare la variazione di BMD e TBS in una popolazione di soggetti affetti da RA e PsA trattati con farmaci bDMARD non convenzionali (anti-TNF- α);
2. Valutare l'effetto dei bDMARD anti-TNF- α sull'osteoclastogenesi spontanea in soggetti affetti da RA e PsA in cellule mononucleate del sangue periferico (peripheral blood mononuclear cells – PMBCs);
3. Valutare gli effetti dei bDMARD anti-TNF- α sulla produzione di RANKL/OPG e regolatori del sistema Wnt (Dkk-1 e sclerostina) su campioni di siero pre-raccolto e sovranatante delle colture cellulari di PBMCs.

7. MATERIALI E METODI

Lo studio ha coinvolto 13 soggetti affetti da RA e 15 soggetti affetti da PsA, di età compresa tra i 18 e i 45 anni soddisfacenti i criteri classificativi dell'ACR/EULAR 2010 e criteri CASPAR, rispettivamente per RA e PsA (22-24, 34-36). L'utilizzo di farmaci anti-infiammatori non steroidei e cortisonico a dosaggio basso, in caso di necessità (≤ 5 mg/die di equivalente prednisonico) è stato consentito per tutta la durata del follow-up. Sono stati esclusi dallo studio pazienti con cause secondarie di osteoporosi, disordini metabolici, donne in post-menopausa, soggetti con indice di massa corporea (BMI) ≤ 20 e ≥ 30 e soggetti che avevano assunto nei 6 mesi precedenti l'arruolamento farmaci in grado di interferire con il metabolismo osseo. Come soggetti di controllo sono stati reclutati 10 soggetti sani, comparabili per età e sesso ai soggetti con RA e PsA. Tutti i soggetti di sesso femminile inclusi nello studio non risultavano essere in menopausa. Nello studio sono stati inclusi solo pazienti naïve alla terapia biologica. I pazienti arruolati sono stati assegnati a ricevere un trattamento con farmaci anti-TNF- α (adalimumab, etanercept o golimumab) secondo le raccomandazioni EULAR per la pratica clinica per il trattamento della RA e della PsA (24). I dati demografici e clinici, compreso il precedente trattamento con cDMARDs, sono stati raccolti al basale.

Al baseline (per i soggetti sani e per i soggetti affetti da RA e PsA) ed ogni 3 mesi (per i soggetti con RA e PsA) per 12 mesi di follow-up è stato effettuato un prelievo ematico ai fini della valutazione *in vitro* della osteoclastogenesi spontanea da monociti-macrofagi isolati dal sangue periferico (PBMCs) e la quantificazione dei livelli sierici e nel sovrnatante delle colture di PBMCs di RANKL, OPG e molecole regolatrici del sistema Wnt (Dkk-1 e sclerostina). Nei soggetti con RA e PsA è stata effettuata la valutazione della BMD e del TBS al basale e al termine del

follow-up (12mesi). Il siero prelevato dai pazienti ad ogni valutazione durante il follow-up è stato conservato a -20°C per le successive valutazioni.

L'osteoclastogenesi spontanea è stata valutata al basale nei soggetti affetti da RA, PsA e nei controlli sani ed è stata rivalutata al termine del follow-up (12 mesi) nei soggetti con RA e PsA. A tutti i soggetti partecipanti alla ricerca è stato fornito un consenso informato scritto prima dell'arruolamento, in accordo con la Dichiarazione di Helsinki.

Valutazione di BMD e TBS

Le misurazioni DEXA (Dual Energy X-ray Adsorbtiometry) sono state effettuate in tutti i partecipanti utilizzando uno scanner total body (QDR 4500 Acclaim Series Elite, Hologic Inc., Bedford, MA, USA) per valutare la BMD. La valutazione della BMD è stata eseguita sia a livello della colonna lombare (L1-L4) utilizzando la vista antero-posteriore che dell'anca sinistra (collo femorale e anca totale) ed è stata espressa come grammi di minerale osseo per centimetro quadrato (g/cm^2), al basale e a 12 mesi utilizzando il metodo DEXA. Tutte le misurazioni sono state effettuate in accordo con le istruzioni della casa produttrice dell'apparecchio, sempre dallo stesso operatore ed utilizzando lo stesso apparecchio DEXA. I valori TBS sono stati valutati utilizzando le stesse immagini DEXA della colonna lombare (L1-L4), che sono state analizzate in maniera operatore-indipendente utilizzando il software TBS (versione software iNight 2.1 Med-Imaps, Merignac, Francia). La valutazione del TBS è stata effettuata con il metodo DEXA, al basale e a 12 mesi.

Isolamento PBMCs

Le cellule mononucleate del sangue periferico umano (PBMCs) sono state isolate da campioni di sangue venoso di pazienti con RA e PsA al basale (tempo zero) e ai

rispettivi tempi stabiliti precedentemente (3, 6, 9, 12 mesi) (5, 107). Il procedimento di isolamento delle cellule PBMCs è un metodo che si basa sull'applicazione della centrifugazione in gradiente di densità con Lymphocyte separation media, LymphoSep™ (1,077 g/mL), come Ficoll-Paque. Per via della loro densità superiore, gli eritrociti, i granulociti e le cellule morte passano attraverso lo strato di Lymphosep mentre i linfociti e i monociti si accumulano sul limite del gradiente del plasma poiché hanno una densità inferiore. Dopo i lavaggi, le cellule mononucleari sono state contate e seminate in piastre multi-pozzetto in un appropriato mezzo di coltura, costituito da DMEM ad alto contenuto di glucosio supplementato con antibiotici e antifungine (Gibco by Life Technologies, USA) e con il 2% di siero fetale di vitello (FCS-Corning) e incubate a 37 ° C in un'atmosfera satura di acqua con il 5% di CO₂. Dopo 3 ore dall'isolamento le cellule sono state risospese in mezzo di coltura e trasferite in well chamber slides (1x10⁶ cells/wells) e incubate a 37°C in un'atmosfera satura di acqua con il 5% di CO₂.

Osteoclastogenesi spontanea

Come riportato precedentemente da altri Autori, è stata dimostrata la presenza di osteoclastogenesi spontanea nei pazienti con PsA (7).

Le PBMCs, dopo essere state separate secondo le procedure descritte su gradiente di concentrazione, seminate in chamber slides ad una concentrazione di 1x10⁶ cells/wells, sono state incubate a 37°C in un'atmosfera satura di acqua con il 5% di CO₂ per 14 giorni. Il mezzo di coltura è stato rifornito ogni 2-3 giorni. Al termine del processo di differenziamento sulle cellule aderenti ai vetrini è stata eseguita la colorazione della fosfatasi acida tartrato-resistente (TRAP, Sigma Diagnostics, St Louis, Missouri, USA). I vetrini sono stati osservati al microscopio ottico e le cellule TRAP-positive con tre o più nuclei sono state contate come osteoclasti. Il

sistema di punteggio che abbiamo utilizzato presenta i dati come numero di osteoclasti per 10^6 PBMCs registrati come numero di cellule multinucleari TRAP-positive. Le colture stimulate con 25 ng/mL di M-CSF e 100 ng/mL di RANKL sono servite come controllo positivo. Inoltre, è stato raccolto, al termine del processo, il sovranatante cellulare e conservato a -20°C per la successiva misurazione di Dkk-1, Sclerostina, OPG e RANKL mediante saggio immunoenzimatico specifico.

Valutazione dei regolatori del rimodellamento osseo

Per valutare i regolatori del rimodellamento osseo, sono stati condotti i test ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) su campioni di siero pre-raccolti ai time-points stabiliti in precedenza, in particolare sui seguenti analiti RANKL/OPG, Dkk-1 e sclerostina, a tempo zero ed ogni 3 mesi fino al termine del follow-up a 12 mesi, secondo i protocolli dei seguenti kit (Human Tumor necrosis factor ligand superfamily member 11 ELISA kit, Mybiosource - Human Dickkopf-1 (Dkk-1) ELISA Kit, Mybiosource - Human OPG ELISA Kit, Mybiosource - Sclerostin (SOST) Human ELISA Kit, Thermofisher)

Analisi statistica

I risultati sono espressi come media \pm DS o percentuale. Cambiamenti osservati al basale ed a diversi “time points” di follow-up in ogni gruppo di trattamento sono stati valutati utilizzando paired t tests per i dati distribuiti secondo la distribuzione normale e il Wilcoxon rank test per i dati non distribuiti secondo la distribuzione normale. Le differenze tra i gruppi sono state valutate utilizzando il test di Kruskal-Wallis. La correlazione tra variabili continue è stata valutata usando il test di Pearson. P value ≤ 0.05 sono stati considerati statisticamente significativi.

8. RISULTATI

Caratteristiche demografiche dei pazienti

Le principali caratteristiche demografiche dei soggetti con RA e PsA e dei soggetti sani sono illustrate nella tabella 1.

	RA	PsA	Controlli	p
N pazienti	13	15	10	-
Età (anni)*	40,8±6,4	42,4±6,14	45,3±7,85	ns
Maschi (%)**	3 (23)	4 (26)	2 (20)	-
Durata malattia (anni)*	4,1±1,8	3,2±1,59	/	
DAS28 PCR*	3,8±0,8	4,2±0,67	/	
N pz in trattamento con MTX (%)	13 (100)	15 (100)	/	
N pz in procinto di passaggio a ADA (%)	7 (43,8)	9 (60)	/	
N pz in procinto di passaggio a ETN (%)	4 (30,7)	5 (33,3)	/	
N pz in procinto di passaggio a GOL (%)	2 (15,4)	1 (6,7)	/	

Tabella 1: caratteristiche dei soggetti reclutati al baseline. ADA= adalimumab; ETN= etanercept; GOL= golimumab; MTX=metotrexate; DAS28= punteggio attività malattia; PCR= proteina C reattiva

Molecole regolatrici del metabolismo osseo al basale

Per quanto riguarda il sistema RANKL/OPG i test sono stati effettuati al basale sia *in vivo* che *in vitro*, utilizzando, rispettivamente, i campioni di siero precedentemente raccolti e il sovrinatante cellulare ottenuto dalle colture di PBMCs, le quali sono state sottoposte a processo di differenziamento osteoclastico. I dati mostrano che *in vivo* i livelli sierici di RANKL sono significativamente superiori nei soggetti con RA e PsA rispetto ai soggetti sani (rispettivamente $2311,28 \pm 459,50$ e $1447,52 \pm 316,46$ pg/mL vs $699,82 \pm 108,10$ pg/mL $p < 0,01$). Inoltre, relativamente ai soggetti affetti da artrite, i livelli sierici di RANKL sono significativamente maggiori nel gruppo RA rispetto al gruppo PsA ($2311,28 \pm 459,50$ vs $1447,52 \pm 316,46$ pg/mL $p < 0,01$) (Figura 6).

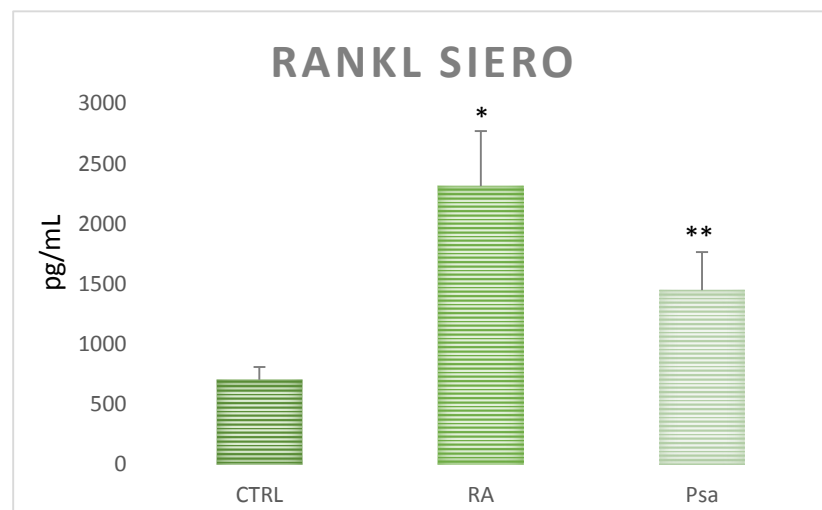


Figura 6: Livelli sierici di RANKL al basale in RA, PsA e controlli sani. * $p < 0,01$ vs CTRL e PsA; ** $p < 0,01$ vs CTRL

I livelli di RANKL nelle colture cellulari sono risultati significativamente superiori nei soggetti con RA rispetto ai soggetti con PsA ($9468,83 \pm 561,90$ vs $8846,40 \pm 901,10$ pg/mL $p < 0,05$) e ai soggetti sani ($9468,83 \pm 561,90$ vs $8302,02 \pm 1083,40$ pg/mL $p < 0,05$); in aggiunta, come già riscontrato a livello sierico, anche nelle colture cellulari i livelli di RANKL nei soggetti con PsA sono significativamente superiori rispetto a quelli dei soggetti sani ($8846,40 \pm 901,10$ vs $8302,02 \pm 1083,40$ pg/mL $p < 0,05$) (Figura 7).

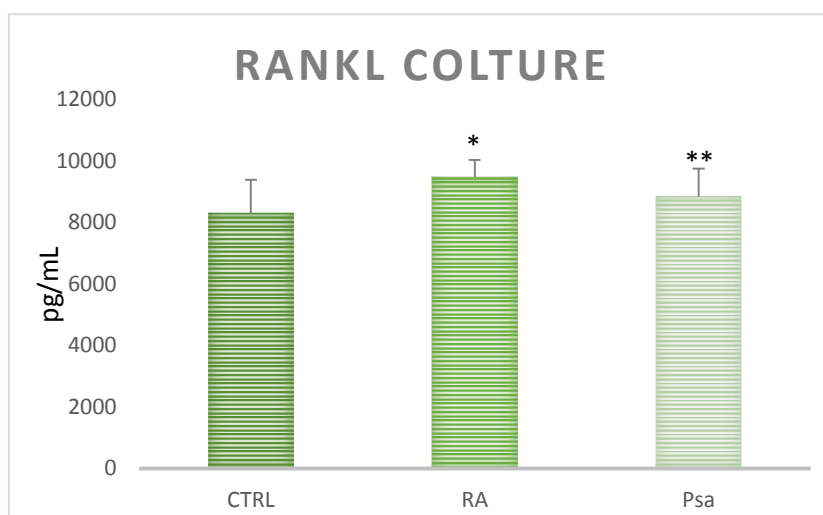


Figura 7: Livelli di RANKL in colture cellulari di PBMCs al basale in RA, PsA e controlli sani. * $p < 0,05$ vs CTRL e PsA; ** $p < 0,05$ vs CTRL.

Contrariamente a quanto osservato per il RANKL, i livelli sierici di OPG nei soggetti con RA sono risultati significativamente inferiori rispetto ai soggetti con

PsA ($404,2 \pm 100,36$ vs $614,45 \pm 100,11$ pg/mL $p < 0,05$) e ai soggetti sani ($404,2 \pm 100,36$ vs $588,13 \pm 54,63$ pg/mL $p < 0,05$) (Figura 8).

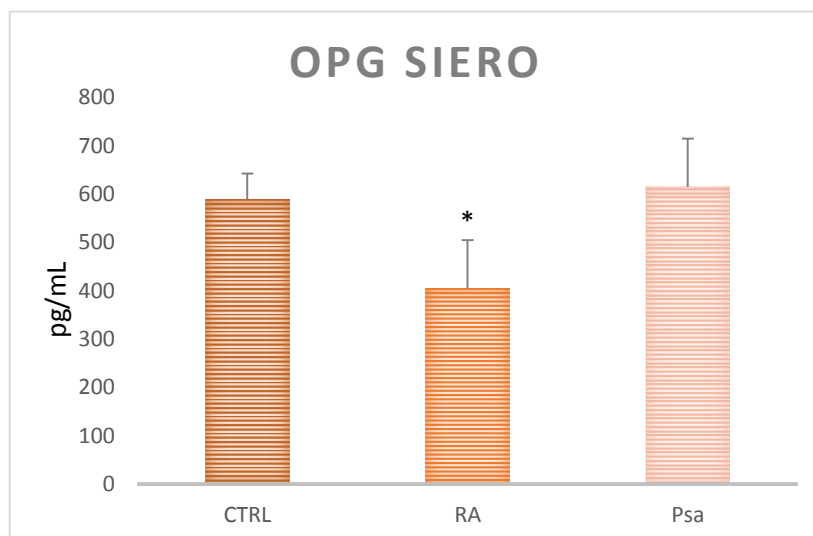


Figura 8: Livelli sierici di OPG al basale in RA, PsA e controlli sani. * $p < 0,05$ vs CTRL e PsA

La stessa situazione è stata rilevata nelle colture cellulari circa i valori di OPG, con valori significativamente inferiori nei soggetti con RA rispetto ai soggetti con PsA ($169,56 \pm 29,35$ vs $377,44 \pm 63,12$ pg/mL $p < 0,01$) e rispetto al gruppo dei controlli sani ($169,56 \pm 29,35$ vs $405,12 \pm 54,21$ pg/mL $p < 0,01$). Non sono invece state evidenziate differenze significative dei livelli di OPG nel siero e nel sovrnatante delle colture cellulari di PBMCs tra i soggetti con PsA e i soggetti sani (siero:

614,45±100,11 pg/mL vs 588,13±54,63 pg/mL; colture cellulari: 377,44 pg/mL vs 405,12±54,21 pg/mL) (Figura 9).

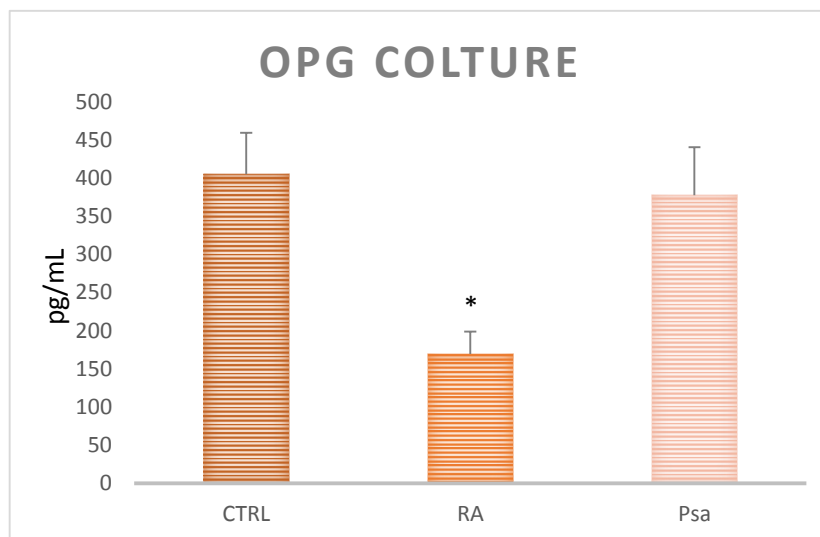


Figura 9: Livelli di OPG in colture cellulari di PBMCs al basale in RA, PsA e controlli sani. *p<0,01 vs CTRL e PsA

Per cui, dai dati ottenuti attraverso gli studi *in vitro* si rileva, sostanzialmente, che l'espressione di OPG e RANKL rispecchia quanto accade *in vivo*, confermando un'augmentata espressione di RANKL in entrambe le patologie rispetto ai soggetti sani e in RA rispetto a PsA. Mentre l'espressione di OPG risulta ridotta in RA.

I livelli sierici di Dkk-1 e sclerostina in PsA sono significativamente inferiori rispetto ai soggetti sani, mentre in soggetti RA, a livello sierico, i livelli di Dkk-1 e sclerostina risultano significativamente aumentati, sia rispetto ai controlli sani che rispetto ai soggetti con PsA.

Analizzando i risultati nel dettaglio, i livelli sierici di Dkk-1 dei soggetti con RA sono significativamente maggiori rispetto ai soggetti con PsA ($8442,87 \pm 984,74$ vs $3924,44 \pm 914,11$ pg/mL $p < 0,01$) e ai controlli sani ($8442,87 \pm 984,74$ vs $5178,8 \pm 986,61$ pg/mL $p < 0,01$), mentre nei soggetti con PsA risultano significativamente inferiori rispetto ai soggetti sani ($3924,44 \pm 914,11$ vs $5178,8 \pm 986,61$ pg/mL $p < 0,01$) (Figura 10).

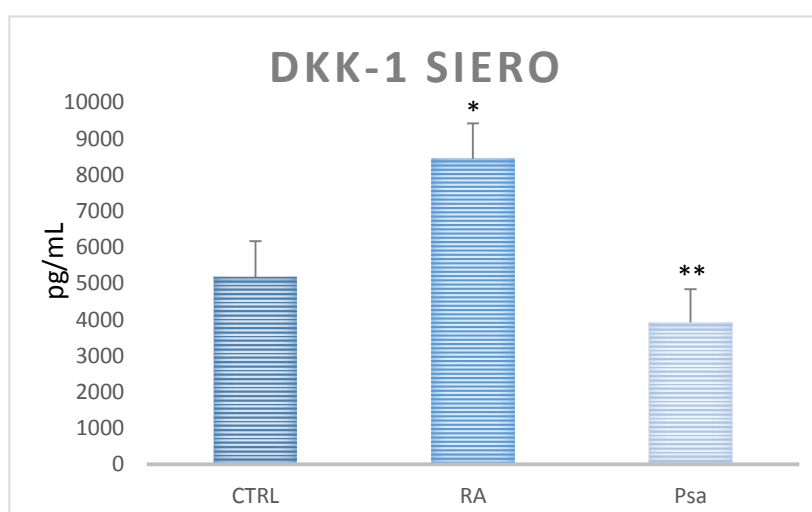


Figura 10: Livelli sierici di Dkk-1 al basale in RA, PsA e controlli sani. * $p < 0,01$ vs CTRL e PsA; ** $p < 0,01$ vs CTRL

I livelli sierici di sclerostina dei soggetti con RA sono significativamente maggiori sia rispetto ai soggetti con PsA ($505,51 \pm 102,38$ vs $161,53 \pm 52,96$ pg/mL $p < 0,001$) che rispetto ai controlli sani ($505,51 \pm 102,38$ vs $294,46 \pm 49,76$ pg/mL $p < 0,01$); si rileva che il gruppo di soggetti con PsA presenta dei livelli di sclerostina

significativamente inferiori rispetto ai livelli riscontrati nel gruppo dei controlli sani (161,53±52,96 vs 294,46±49,76 pg/mL p<0,01) (Figura 11).

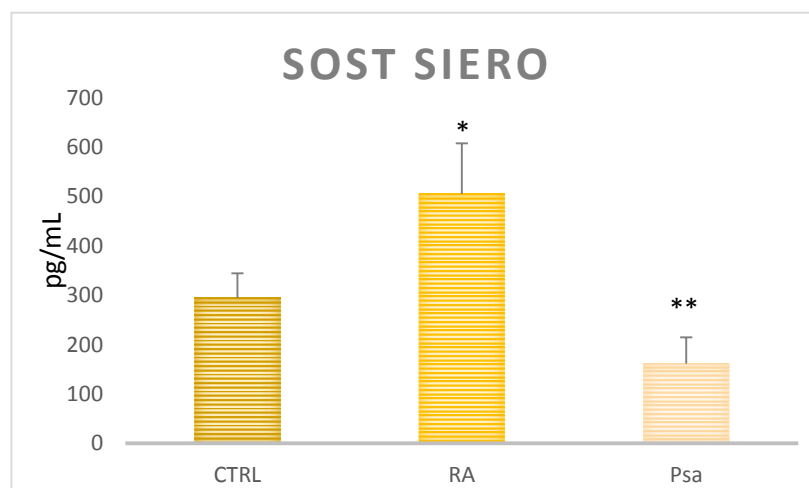


Figura 11: Livelli sierici di SOST al basale in RA, PsA e controlli sani.
*p<0,001 vs CTRL – p<0,01 vs PsA; **p<0,01 vs CTRL

Per ciò che riguarda la sintesi di questi due regolatori di Wnt nelle colture cellulari, questa è significativamente inferiore nei soggetti con PsA rispetto ai soggetti con RA e sani, mentre nei pazienti con RA i livelli di Dkk-1 e sclerostina risultano essere significativamente superiori.

Nello specifico, i livelli di Dkk-1 *in vitro* rispecchiano quanto verificatosi a livello sierico, con valori significativamente maggiori nei soggetti con RA rispetto ai soggetti con PsA (645,06±104,5 vs 388,85±97,64 pg/mL p<0,01) e rispetto ai soggetti sani (645,06±104,50 vs 555,81±98 pg/mL p<0,01); allo stesso modo, nel

gruppo di pazienti affetti da PsA, il livello di Dkk-1 nelle colture si rileva inferiore rispetto al gruppo dei soggetti sani ($388,85 \pm 97,64$ vs $555,81 \pm 98$ pg/mL $p < 0,01$) (Figura 12).

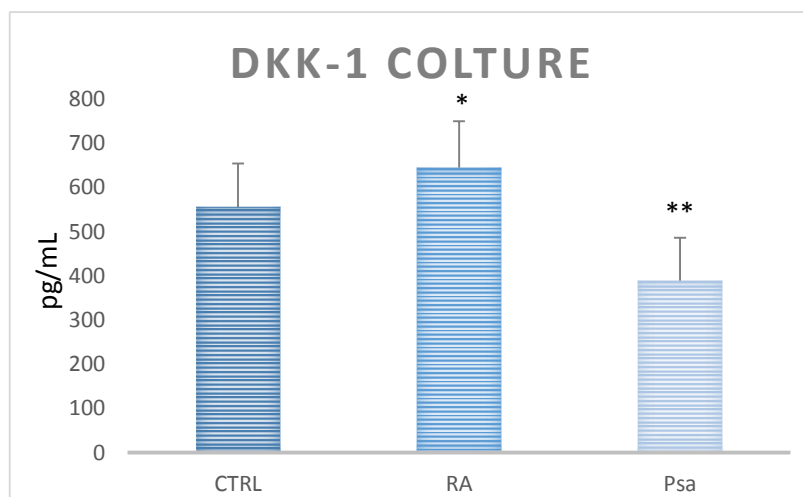


Figura 12: Livelli di Dkk-1 in colture cellulari di PBMCs al basale in RA, PsA e controlli sani. * $p < 0,01$ vs PsA e CTRL; ** $p < 0,01$ vs CTRL

I livelli di sclerostina nelle colture cellulari confermano quanto detto per i livelli sierici: nei soggetti con RA si osservano valori significativamente aumentati rispetto ai soggetti con PsA ($82,07 \pm 14,44$ vs $45,8 \pm 9,37$ pg/mL $p < 0,01$) e ai soggetti sani ($82,07 \pm 14,44$ vs $59,95 \pm 11,02$ pg/mL $p < 0,01$) e il livello colturale di sclerostina

nel gruppo PsA è significativamente inferiore in relazione a quello riscontrato nel gruppo di controllo ($45,8 \pm 9,37$ pg/mL vs $59,95 \pm 11,02$ pg/mL) (Figura 13).

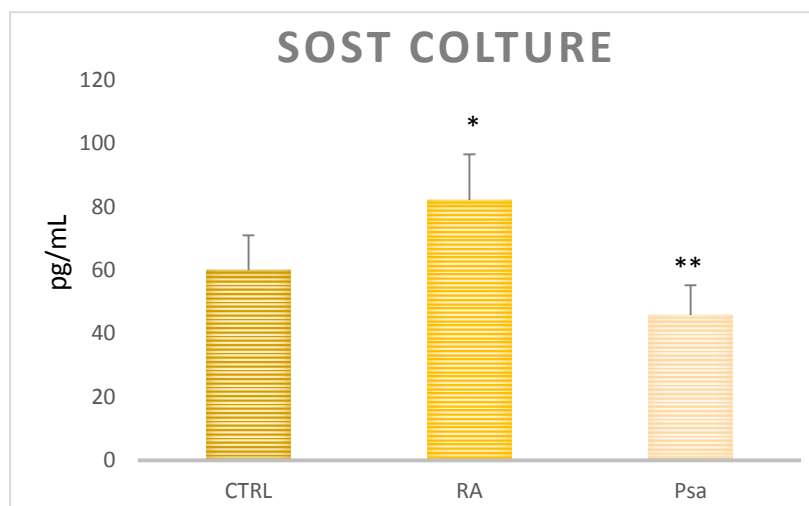


Figura 13: Livelli di SOST in colture cellulari di PBMCs al basale in RA, PsA e controlli sani. * $p < 0,01$ vs PsA e CTRL; ** $p < 0,01$ vs CTRL

In base ai risultati ottenuti, nei soggetti con RA il rapporto RANKL/OPG risulta essere significativamente maggiore rispetto ai soggetti con PsA (RANKL/OPG sierico $6,09 \pm 2,30$ vs $2,38 \pm 0,5$ $p < 0,01$) ed al gruppo controllo (RANKL/OPG sierico $6,09 \pm 2,30$ vs $1,18 \pm 0,4$, $p < 0,01$); il rapporto RANKL/OPG è significativamente maggiore nei soggetti con PsA se relazionato a quello nei soggetti sani (RANKL/OPG sierico $2,38 \pm 0,5$ vs $1,18 \pm 0,4$ $p < 0,01$). I valori dei regolatori del metabolismo osseo al basale nei soggetti con RA, PsA e nei controlli sani sono riassunti nella Tabella 2.

Parametri	RA	PsA	Controlli	p
RANKL siero (pg/ml)*	2311,28±459,5*§	1447,52±316,46**	699,82±108,1	*§p<0,01 vs PsA e CTRL **p<0,01 vs CTRL
RANKL colture (pg/ml)*	9468,83±561,9*§	8846,40±901,10**	8302,02±1083,4	*§p<0,05 vs PsA e CTRL **p<0,05 vs CTRL
OPG siero (pg/ml)*	404,2±100,36*§	614,45±100,11**	588,13±54,63	*§p<0,05 vs PsA e CTRL
OPG colture (pg/ml)*	169,65±29,35*§	377,44±63,12**	405,12±54,21	*§p<0,01 vs PsA e CTRL
Dkk-1 siero (pg/ml)*	8442,87±984,74*§	3924,44±914,11**	5178,8±986,61	*§p<0,01 vs PsA e CTRL **p<0,01 vs CTRL
Dkk-1 colture (pg/ml)*	645,06±104,5*§	388,85±97,64**	555,81±98	*§p<0,01 vs PsA e CTRL **p<0,01 vs CTRL
SOST siero (pg/ml)*	505,51±102,38*§	161,53±52,94**	294,46±49,76	*§p<0,001 vs PsA *§p<0,01 vs CTRL **p<0,001 vs CTRL
SOST colture (pg/ml)*	82,07±14,44*§	45,8±9,37**	59,95±11,02	*§p<0,001 vs PsA *§p<0,01 vs CTRL **p<0,01 vs CTRL
RANKL/OPG siero	6,09±2,3*§	2,38±0,5**	1,18±0,4	*§p<0,01 vs PsA e CTRL **p<0,01 vs CTRL
RANKL/OPG colture	57,29±9,93	23,96±4,31	20,4±5,4	
N osteoclasti/campo*	31±8,32	28,3±7,34	0	

Tabella 2: Dkk-1: Dickkopf; OPG: osteoprotegerina; RANKL: Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B ligand; SOST: Sclerostina.

Variazione delle molecole regolatorie del metabolismo osseo durante il follow up nei soggetti con RA a PsA

Soggetti con RA

Nei pazienti con RA i livelli sierici di OPG dopo l'inizio della terapia con anti-TNF- α aumentano progressivamente e significativamente in tutti i tempi del follow-up rispetto al basale (3 mesi: $462,05 \pm 99,5$ vs basale: $404,2 \pm 100,36$ $p < 0,05$; 6 mesi $544,44 \pm 100,07$ vs 3 mesi – $p < 0,05$; 9 mesi: $784,4 \pm 100,67$ vs 6 mesi – $p < 0,01$; 12 mesi $812,89 \pm 99,54$ vs basale, 3 mesi e 6 mesi $p < 0,001$) (Figura 14). Nelle colture cellulari di PBMCs la produzione di OPG aumenta significativamente al terzo mese di follow-up rispetto al basale ($352,4 \pm 29,39$ vs $169,56 \pm 29,35$ $p < 0,01$) e resta a valori aumentati (non significativamente differente) nei successivi tempi del follow-up (6, 9 e 12 mesi) (Figura 15). Al contrario, i livelli sierici di RANKL diminuiscono significativamente a partire dal sesto mese di follow-up ($1891,83 \pm 471,2$ vs $2311,28 \pm 459,5$ - 6 mesi vs basale $p < 0,05$) e si riducono ulteriormente al nono mese ($1224,91 \pm 464,27$ vs mese 6 $p < 0,01$; vs basale $p < 0,001$) (Figura 16). Anche nelle colture di PBMCs i livelli di RANKL nel sovrnatante si riducono significativamente a partire dal sesto mese di follow-up ($6141,73 \pm 561,23$ vs $9468,83 \pm 561,9$, $p < 0,01$), senza subire variazioni significative nei successivi tempi del follow-up (Figura 17).

I livelli sierici di sclerostina diminuiscono progressivamente dopo l'inizio della terapia con anti-TNF- α con una riduzione statisticamente significativa al sesto mese ($371,23 \pm 104,16$ vs $505,51 \pm 102,38$, 6 mese vs basale $p < 0,05$), e al nono mese di follow-up ($315,06 \pm 103,56$ vs 6 mese e basale, $p < 0,05$) (Figura 18). Analogamente, nel sovrnatante delle colture cellulari, al sesto mese di follow up i livelli di

sclerostina si riducono significativamente rispetto al basale ($58,23 \pm 12,88$ vs $82,07 \pm 14,44$ $p < 0,05$), riducendosi ulteriormente al dodicesimo mese di follow-up ($46,84 \pm 11,4$, $p < 0,05$ vs 6 mese, $p < 0,01$ vs basale) (Figura 19). Anche i livelli sierici di Dkk-1 diminuiscono progressivamente rispetto al basale dopo l'inizio della terapia con anti-TNF- α , raggiungendo una riduzione significativa a partire dal nono mese di follow-up ($5483,33 \pm 1016,22$ vs $8442,87 \pm 984,74$ $p < 0,001$) (Figura 20).

Soggetti con PsA

Nei soggetti con PsA non si evidenziano variazioni significative di OPG rispetto al basale dopo l'inizio della terapia con anti-TNF- α sia a livello sierico che nel sovrnatante delle colture di PBMCs (Figura 14,15). Al contrario, analogamente a quanto osservato nei pazienti con RA, i livelli sierici di RANKL si riducono significativamente a partire già dal terzo mese di follow-up rispetto al basale ($1004,1 \pm 316,38$ vs $1447,52 \pm 316,46$ vs $p < 0,01$) e si riducono significativamente in tutti i tempi successivi del follow-up ($786,25 \pm 316,57$ 6 mese, $p < 0,05$ vs 3 mese; $426,49 \pm 316,21$ 9 mese, $p < 0,01$ vs 6 mese) (Figura 16). Anche nel sovrnatante delle colture di PBMCs i livelli di RANKL si riducono rispetto al basale, in maniera significativa a partire dal sesto mese ($6322,34 \pm 900,37$ vs $8846,4 \pm 901,1$ $p < 0,001$), rimanendo a livelli simili per tutta la durata del follow-up (Figura 17). Non vengono evidenziate variazioni dei livelli circolanti di sclerostina nei pazienti affetti da PsA dopo l'inizio della terapia con anti-TNF- α ; al contrario, nelle colture di PBMCs, si osserva un aumento significativo dei livelli di sclerostina a partire dal terzo mese dopo l'inizio della terapia con anti-TNF- α ($111,42 \pm 9,8$ vs $45,83 \pm 9,37$, $p < 0,01$). I livelli colturali di sclerostina non subiscono in seguito variazioni significative per tutta la durata del follow-up (Figura 18,19). Analogamente a quanto osservato per

la sclerostina, mentre i livelli circolanti di Dkk-1 non subiscono variazioni rispetto al basale dopo l'inizio della terapia con anti-TNF- α (Figura 20), nel sovranatante delle colture cellulari aumentano significativamente a partire dal terzo mese di follow-up ($665,28 \pm 99,86$ vs $388,85 \pm 97,64$, $p < 0,01$) senza subire in seguito variazioni significative (Figura 21).

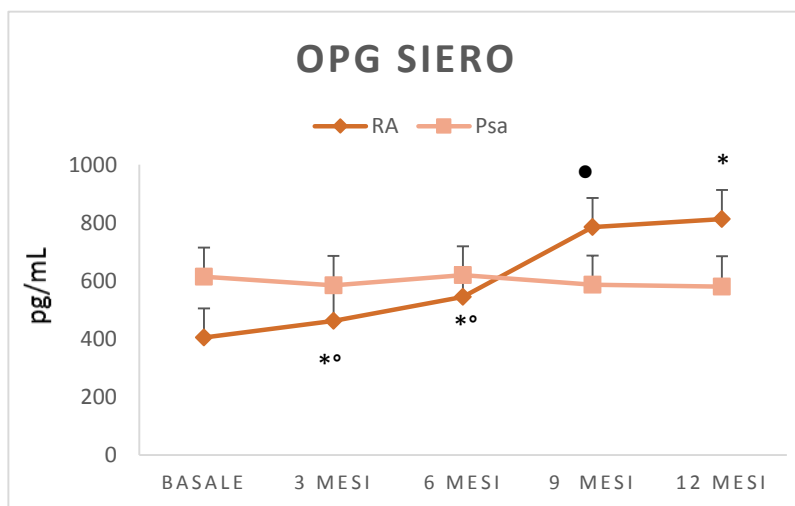


Figura 14: Livelli sierici di OPG ad ogni time-points del trattamento con anti-TNF- α in soggetti affetti da RA e PsA. * $p < 0,001$ 12 mesi vs basale, 3 e 6 mesi; • $p < 0,01$ 9 mesi vs 6 mesi; *° $p < 0,05$ 3-6 mesi vs basale

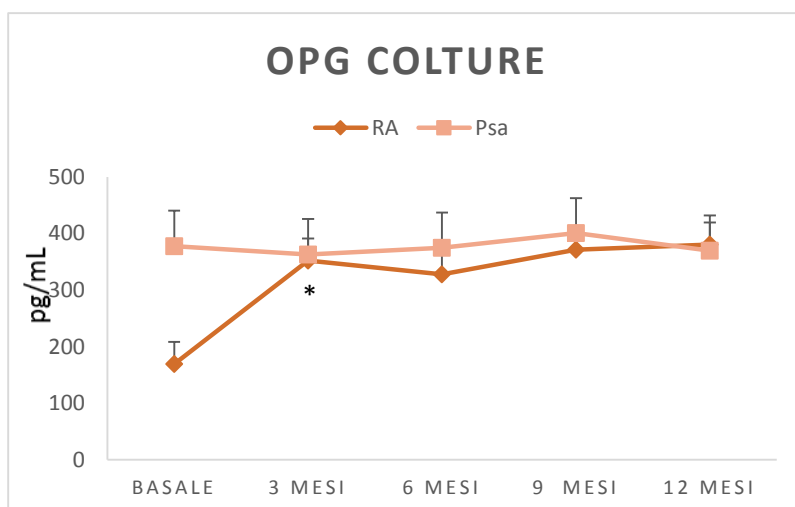


Figura 15: Livelli di OPG nelle colture cellulari di PBMCs ad ogni time-points del trattamento con anti-TNF- α in soggetti affetti da RA e PsA. * $p < 0,01$ 3 mesi vs basale

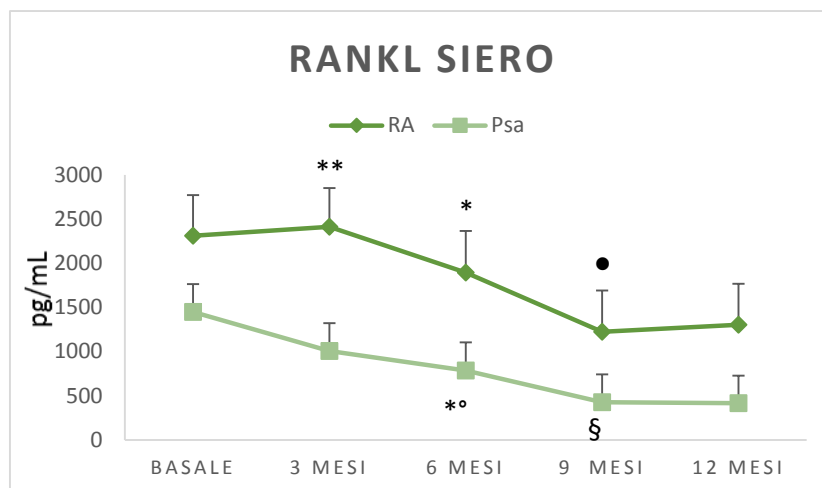


Figura 16: Livelli sierici di RANKL ad ogni time-points del trattamento con anti-TNF- α in soggetti affetti da RA e PsA. * $p < 0,05$ 6mesi vs basale; • $p < 0,01$ 9mesi vs 6 mesi – $p < 0,001$ 9 mesi vs basale. ** $p < 0,01$ 3 mesi vs basale; * $p < 0,05$ 6 mesi vs 3 mesi; § $p < 0,01$ 9 mesi vs 6 mesi

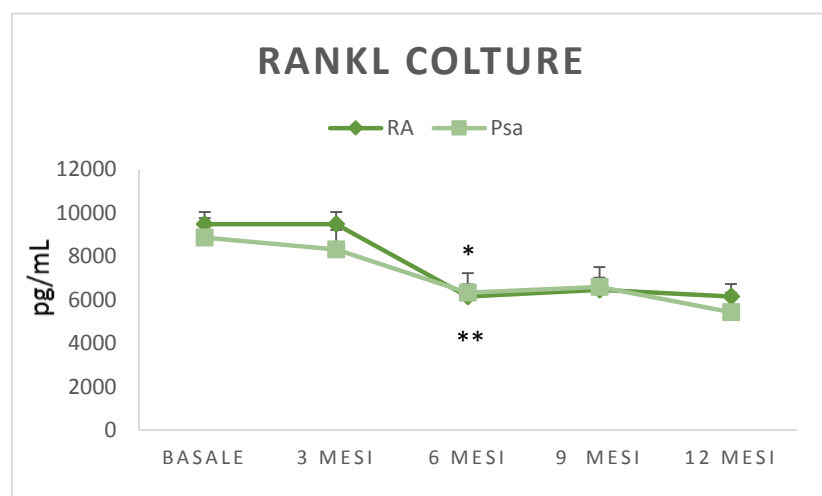


Figura 17: Livelli di RANKL nelle colture cellulari di PBMCs ad ogni time-points del trattamento con anti-TNF- α in soggetti affetti da RA e PsA. * $p < 0,016$ mesi vs basale; ** $p < 0,001$ 6 mesi vs basale

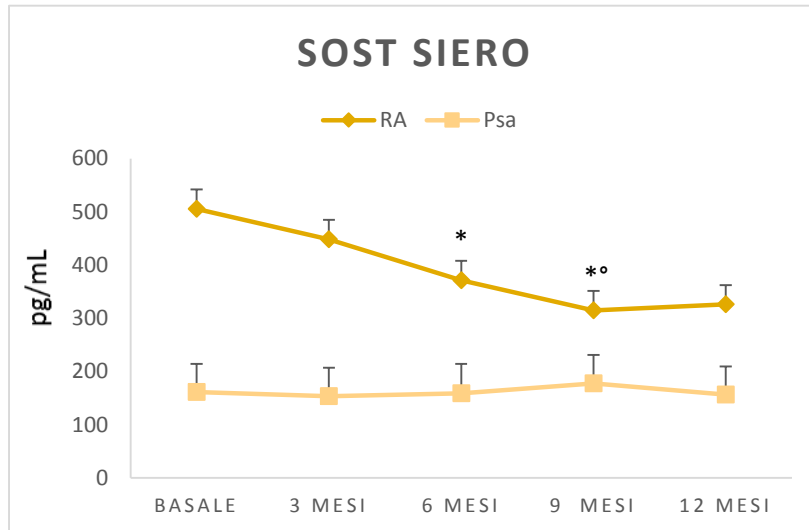


Figura 18: Livelli sierici di SOST ad ogni time-points del trattamento con anti-TNF- α in soggetti affetti da RA e PsA. * $p < 0,05$ 6mesi vs basale; *° $p < 0,05$ 9 mesi vs 6 mesi

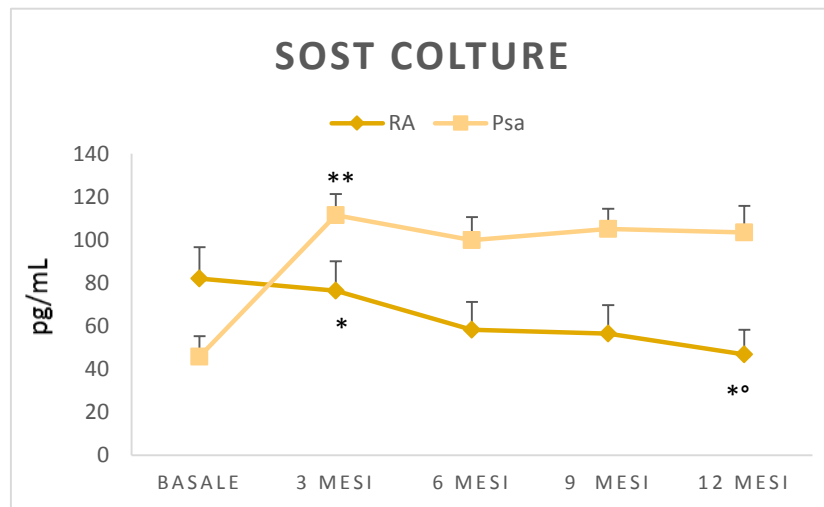


Figura 19: Livelli di SOST nelle colture cellulari di PBMCs ad ogni time-points del trattamento con anti-TNF- α in soggetti affetti da RA e PsA. * $p < 0,05$ 3 mesi vs basale; *° $p < 0,05$ 12 mesi vs 6 mesi – $p < 0,01$ 12 mesi vs basale. ** $p < 0,01$ 3 mesi vs basale

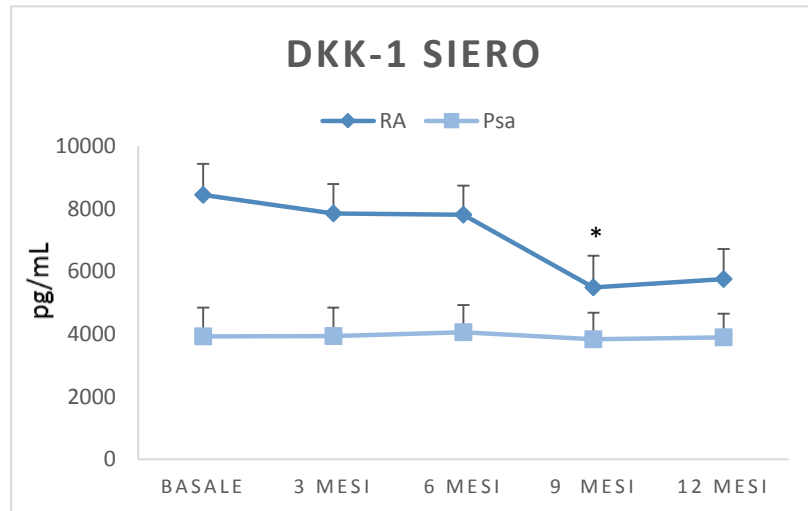


Figura 20: Livelli sierici di Dkk-1 ad ogni time-points del trattamento con anti-TNF- α in soggetti affetti da RA e PsA. * $p < 0,001$ 9 mesi vs basale

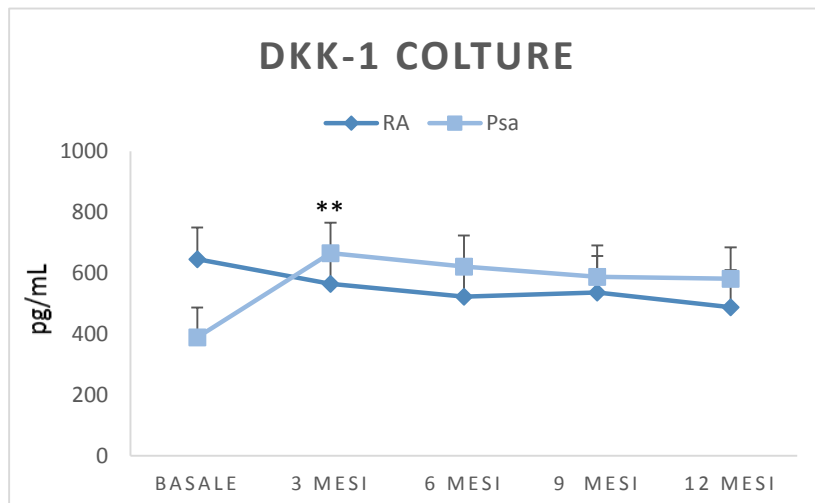
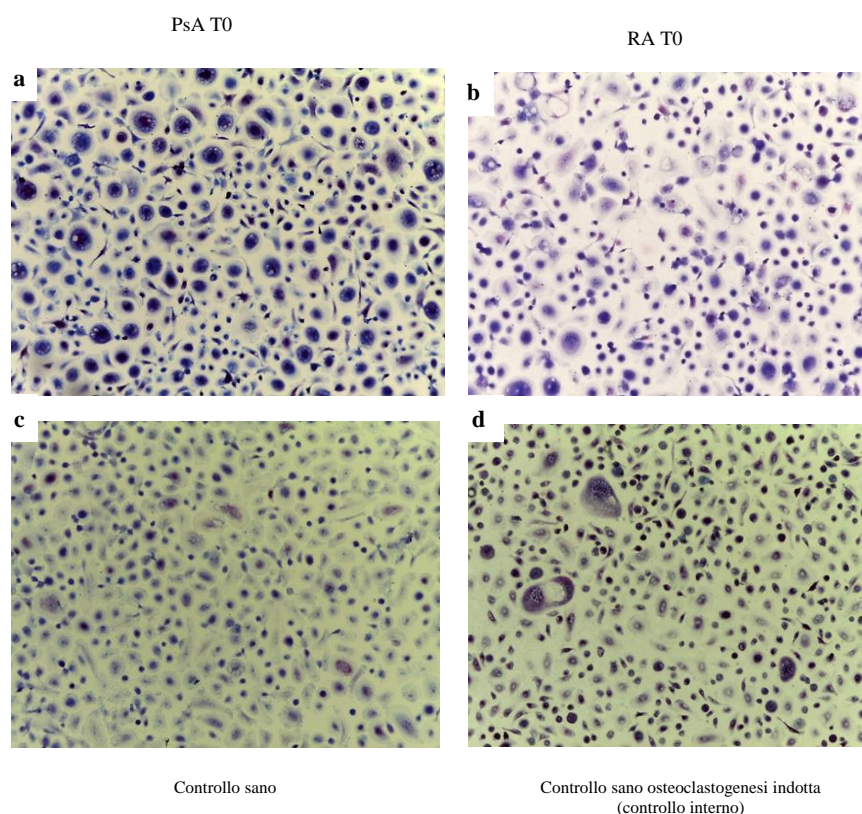


Figura 21: Livelli di Dkk-1 nelle colture cellulari di PBMCs ad ogni time-points del trattamento con anti-TNF- α in soggetti affetti da RA e PsA. ** $p < 0,01$ 3 mesi vs basale

Osteoclastogenesi spontanea

Come già mostrato precedentemente (7), al basale numerose cellule multinucleate TRAP+ sono presenti nelle colture di PBMCs derivanti da pazienti affetti da RA e PsA (prima dell'inizio della terapia con farmaci anti-TNF- α), in assenza di stimolazione con RANKL e M-CSF (utilizzati *in vitro* per indurre osteoclastogenesi in PBMCs). Il numero di cellule multinucleate TRAP+ è maggiore nei pazienti con RA rispetto ai pazienti con PsA. Nei controlli sani non si osserva nessuna cellula multinucleata TRAP+ (Figura 22).



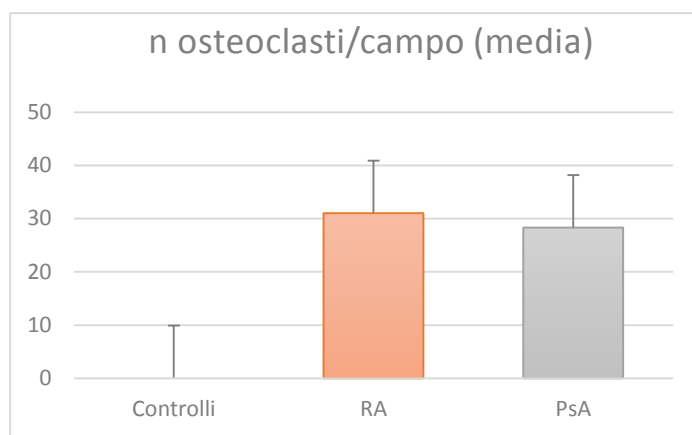


Figura 22: Osteoclasti in PBMCs di pazienti di RA e PsA. i PBMCs sono stati ottenuti da pazienti di RA, pPsA e soggetti sani. Nelle colture derivanti dai soggetti con RA e PsA (**a** e **b**) è stata valutata l'osteoclastogenesi spontanea, mentre nelle colture derivanti dai soggetti sani il processo di osteoclastogenesi è stato valutato sia in assenza che in presenza (**c** e **d**) di M-CSF (25 ng/ml) e RANKL (100 ng/ml) (controllo positivo), fissati e trattati per TRAP, fotografati ad ingrandimento 10x.

Alla fine del follow-up (12 mesi dall'inizio della terapia con anti-TNF- α) il numero delle cellule multinucleate TRAP+ si riduce significativamente sia nei pazienti con RA che nei pazienti con PsA (Figura 23).

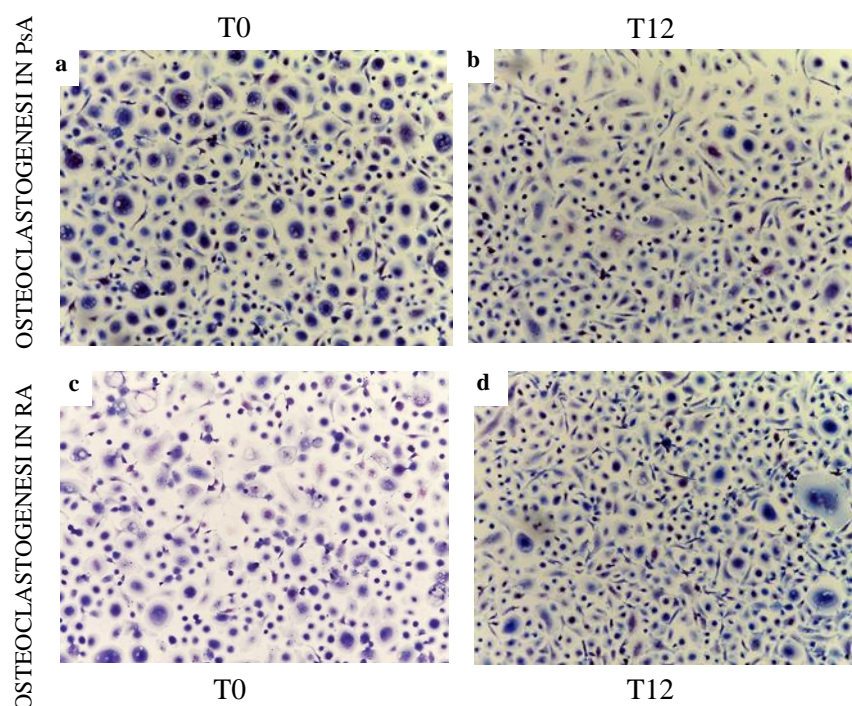


Figura 23: osteoclastogenesi al basale e dopo 12 mesi di trattamento con anti-TNF- α in soggetti con PsA (**a** vs **b**) e in soggetti con RA (**c** vs **d**)

Densità minerale ossea e TBS in soggetti con RA e PsA

BMD e TBS

Al basale i valori di BMD dei pazienti affetti da RA ($0,7503 \pm 0,0593 \text{ g/cm}^2$) sono significativamente inferiori rispetto ai valori di BMD osservati nei soggetti sani ($0,787 \pm 0,12 \text{ g/cm}^2$) e nei pazienti con PsA ($0,790 \pm 0,04732 \text{ g/cm}^2$, $p=0,049$), mentre non si osservano differenze tra pazienti affetti da PsA e controlli sani. Dopo 12 mesi di follow-up non si osservano variazioni significative di BMD sia nel gruppo soggetti con RA (baseline $0,7503 \pm 0,05937$ vs $0,7624 \pm 0,06022 \text{ g/cm}^2$ ai 12 mesi) che nel gruppo dei pazienti PsA (baseline $0,79 \pm 0,201$ vs $0,801 \pm 0,186 \text{ g/cm}^2$ ai 12 mesi) (Figura 24).

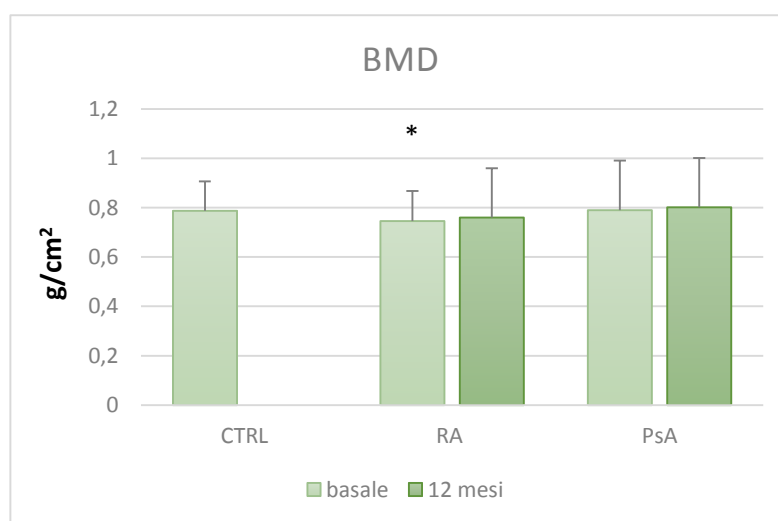


Figura 24: Valutazione della BMD in soggetti con RA, PsA e controlli sani (CTRL) al basale. Valutazione della BMD in soggetti con RA e PsA dopo 12 mesi dal trattamento con anti-TNF- α . * $p=0,049$

Per quanto riguarda i valori di TBS, non si osservano differenze significative tra i controlli sani ($1,247 \pm 0,07$), il gruppo di pazienti con RA e il gruppo di pazienti con PsA ($1,235 \pm 0,11$ vs $1,296 \pm 0,059$, $p=0,078$). Al termine del follow-up dall'inizio della terapia con anti-TNF- α (12 mesi) i valori di TBS risultano significativamente aumentati sia nei pazienti con RA ($1,235 \pm 0,059$ vs $1,522 \pm 0,11$; $p<0,001$) che nei pazienti con PsA ($1,296 \pm 0,059$ vs $1,398 \pm 0,057$; $p<0,001$). (Figura 25).

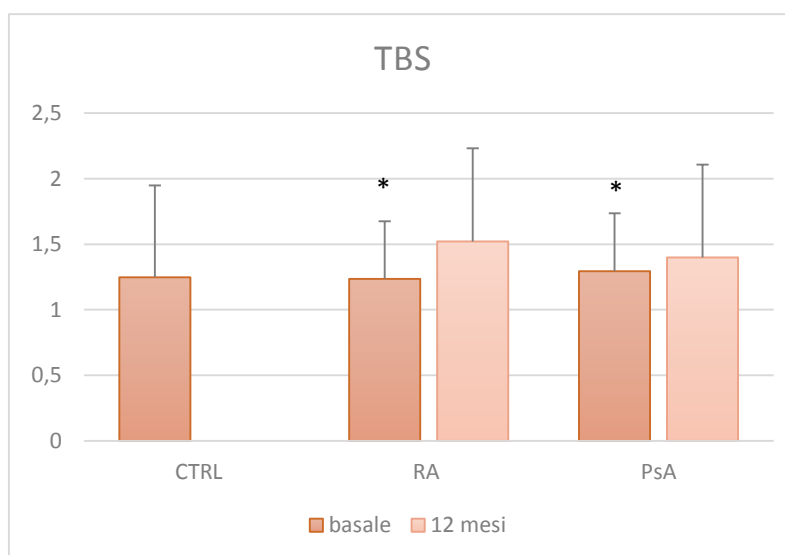


Figura 25: Valutazione del TBS in soggetti con RA e PsA al basale e dopo 12 mesi dal trattamento con anti-TNF- α . * $p<0,001$ a 12 mesi vs basale

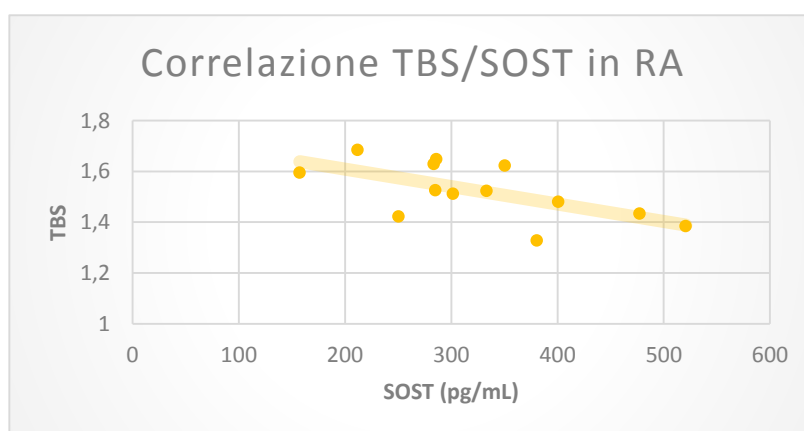
Correlazione tra TBS, BMD e regolatori del rimodellamento osseo

RA

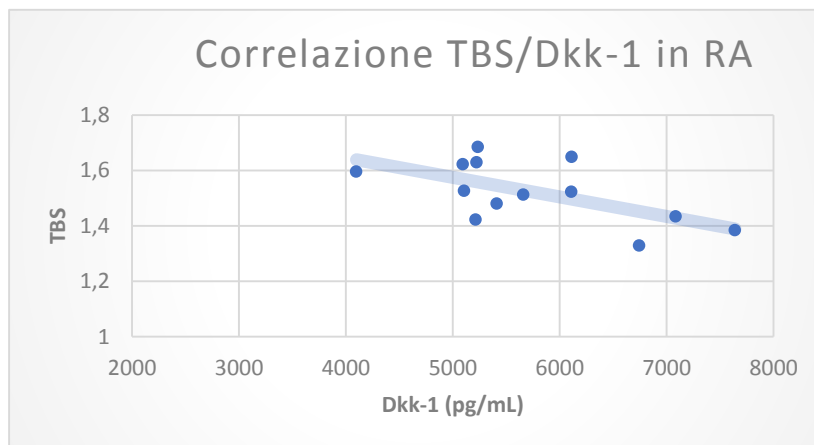
Non si evidenzia alcuna correlazione tra i valori di BMD e i livelli circolanti dei regolatori del metabolismo osseo al basale e al termine dei 12 mesi di follow-up.

Si evidenzia una correlazione tra i valori di TBS e i livelli circolanti di Dkk-1, sclerostina e OPG, sia al basale che al termine dei 12 mesi di follow-up. In particolare i valori di TBS nei soggetti con RA sono inversamente correlati con i livelli di sclerostina al basale ($r^2=-0,632$, $p=0,020$) e dopo 12 mesi di follow-up ($r^2=-0,631$, $p=0,021$) (Figura 26a); correlano negativamente anche con i livelli sierici di Dkk-1 al basale ($r^2=-0,619$, $p=0,024$) e dopo 12 mesi di follow-up ($r^2=-0,618$, $p=0,024$) (Figura 26b); al contrario si osserva una correlazione positiva tra i valori di TBS e i livelli circolanti di OPG al basale ($r^2=0,618$, $p=0,025$) e dopo 12 mesi di follow-up ($r^2=0,610$, $p=0,027$) (Figura 26c).

a



b



c

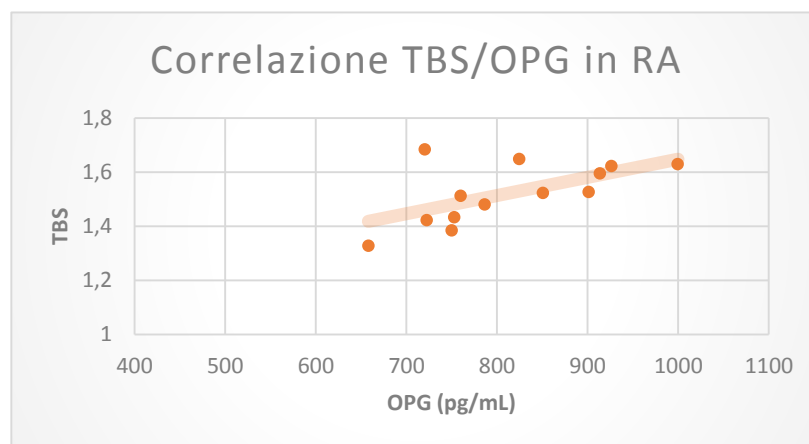


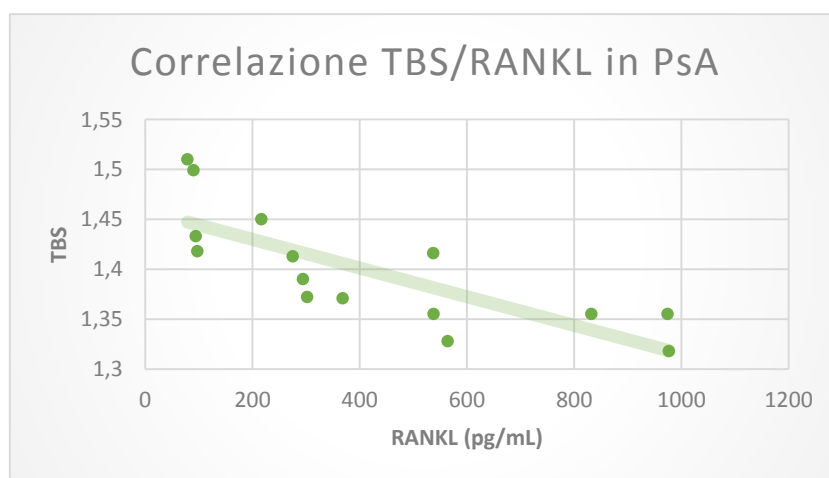
Figura 26: Correlazione tra TBS e regolatori del rimodellamento osseo sierici in soggetti con RA dopo 12 mesi di trattamento con anti-TNF- α .

PsA

Analogamente a quanto osservato nei pazienti con RA non si evidenzia alcuna correlazione tra i valori di BMD e i livelli circolanti dei regolatori del metabolismo osseo al basale e al termine dei 12 mesi di follow-up.

A differenza di quanto osservato nei pazienti con RA non si osserva alcuna correlazione tra i valori di TBS e i livelli circolanti di Dkk-1 e sclerostina, sia al basale che dopo 12 mesi dall'inizio della terapia con anti-TNF- α . Al contrario si evidenzia una correlazione negativa con i livelli sierici di RANKL sia al basale ($r^2 = -0,760$, $p=0,001$) che dopo 12 mesi ($r^2 = -0,782$, $p=0,001$) (Figura 27a) e una correlazione positiva con i livelli sierici di OPG al termine dei 12 mesi di follow-up ($r^2=0,653$, $p=0,008$) (Figura 27b).

a



b

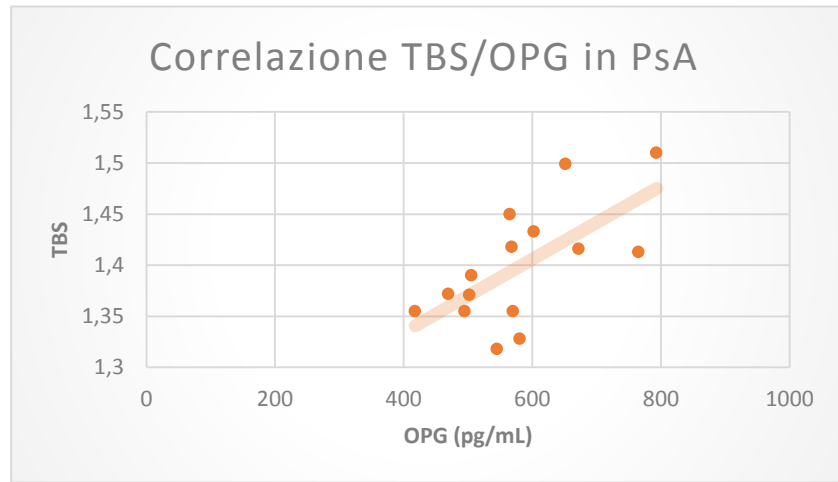


Figura 27: Correlazione tra TBS e regolatori del rimodellamento osseo in soggetti con PsA dopo 12 mesi di trattamento con anti-TNF- α .

9. DISCUSSIONE

I trattamenti con DMARD anti-TNF- α , il cui utilizzo è stato approvato per diverse patologie infiammatorie, hanno mostrato la loro efficacia anche in RA e PsA (108, 109). Evidenze in letteratura hanno mostrato la capacità di queste molecole di controllare oltre alle manifestazioni cliniche di malattia anche la progressione radiologica delle alterazioni ossee che si accompagnano alle artropatie infiammatorie come la RA (110). A questo proposito, è stato suggerito un ruolo del TNF- α nel favorire l'espressione di RANKL, fattore determinante nel processo di osteoclastogenesi; per cui il blocco del TNF- α può influire direttamente su tale processo e conseguentemente sul controllo del danno osseo erosivo in corso di patologia infiammatoria cronica articolare (7, 47, 62), pur non essendo il solo fattore capace di giocare un ruolo in questo processo (111).

Numerosi dati clinici ed epidemiologici confermano che la densità minerale ossea è ridotta nei pazienti con RA; tale riduzione è multifattoriale, ed è legata alla durata della malattia, all'utilizzo di corticosteroidi, all'handicap funzionale ed alla conseguente ridotta mobilità ed all'infiammazione, che sicuramente gioca un ruolo fondamentale nel determinare un bilancio osseo negativo (112). I dati relativi alla perdita di massa ossea generalizzata in corso di SpA, ed in corso di PsA in particolare, sono invece meno concordanti; la prevalenza dell'osteoporosi densitometrica nei pazienti affetti da SpA varia dal 3% al 47% a seconda degli studi (113).

La RA può essere considerata il prototipo di artrite cronica in grado di alterare il metabolismo osseo inducendo una perdita ossea localizzata, che si manifesta in termini di osteoporosi iuxtarticolare ed erosioni (queste ultime marker radiologico

della malattia) che sono provocate da citochine e mediatori espressi nei tessuti articolari adiacenti e che contribuiscono alla perdita ossea tramite un effetto diretto su osteoblasti ed osteoclasti ed una perdita ossea generalizzata (osteoporosi/osteopenia) indotta da citochine proinfiammatorie derivanti da tessuti articolari infiammati (sinovia), che passando nel circolo sistemico mediano gli effetti sull'osso in sedi lontane dall'articolazione. Va comunque sottolineato che esiste una differenza fondamentale riguardante il metabolismo osseo tra RA e PsA; mentre la RA è caratterizzata essenzialmente da una perdita di massa ossea locale (sotto forma di erosioni e osteoporosi iuxtarticolare) e sistemica (riduzione della BMD), in PsA, oltre alla perdita ossea locale e sistemica, si osservano caratteristicamente lesioni osteoproduttive (entesofiti, sindesmofiti) assenti in RA e che sono espressione di interazioni tra sistema immunitario e cellule ossee più complesse, soprattutto a livello locale. In base a quanto stabilito dalla World Health Organization (WHO), la diagnosi di osteoporosi si basa sulla determinazione della BMD, che può essere effettuata con varie metodiche, sebbene il gold standard sia rappresentato dall'assorbimetria a doppio raggio fotonico, che è la tecnica strumentale di riferimento per la misurazione della BMD espressa g/cm^2 e in termini di T-score che rappresenta il parametro per la definizione diagnostica dell'osteoporosi e fornisce uno dei dati fondamentali per la determinazione del rischio fratturativo nella pratica clinica corrente. Tuttavia, la BMD rappresenta la valutazione della quantità di osso per unità di superficie e non fornisce alcuna informazione sulla qualità della microarchitettura ossea, che resta di difficile valutazione nella pratica clinica corrente. Negli ultimi anni è stata sviluppata una nuova tecnica di imaging capace di determinare un nuovo parametro "strutturale", il Trabecular Bone Score, una misurazione della struttura del livello dei grigi effettuata su rielaborazioni in pixel delle immagini acquisite con metodica DEXA

a livello della colonna e che quantifica le variazioni dell'intensità di grigio di un pixel rispetto ai pixel vicini; minore è la variabilità dei grigi nell'intero tracciato e maggiore è la discrepanza di intensità di grigio tra un pixel e quelli vicini, tanto minore sarà il TBS (114). Il TBS riflette lo stato strutturale della microarchitettura ossea ed è correlato positivamente al numero di trabecole e alla connettività trabecolare e negativamente allo spazio tra trabecole; un alto valore di TBS è espressione di una microarchitettura densa, con buona connettività e pochi spazi tra trabecole; al contrario, bassi valori di TBS indicano una microarchitettura ossea lacunare con grandi spazi tra trabecole.

I risultati di questo studio evidenziano che i pazienti affetti da RA presentano una BMD che è significativamente inferiore rispetto ai pazienti con PsA; mentre i valori di TBS non sono significativamente differenti. Inoltre, mentre la terapia con anti-TNF- α non modifica dopo 12 mesi i valori di BMD nei soggetti affetti da RA e PsA, dopo 12 mesi di terapia con anti-TNF- α il TBS risulta aumentato sia nei pazienti con RA che nei pazienti con PsA. I dati sugli effetti della terapia con anti-TNF- α sulla BMD nelle malattie infiammatorie croniche articolari non sono concordanti; sebbene la maggior parte degli studi pubblicati abbia evidenziato una tendenza a un effetto positivo della terapia con anti-TNF- α sull'osso, i risultati mostrati sono in accordo con quanto pubblicato da alcuni autori (89). Vis et al, in uno studio condotto su 102 pazienti con RA, in trattamento con anti-TNF- α , non hanno rilevato cambiamenti nella BMD della colonna; al contrario, la BMD della mano era significativamente diminuita. Peraltro Orsolini et al. hanno valutato gli effetti a breve termine della terapia con anti-TNF- α in una popolazione di 54 soggetti affetti da RA, evidenziando un precoce calo della BMD dell'anca a seguito di 6 mesi dalla terapia (115). Negli ultimi anni stanno emergendo risultati in linea con gli effetti della terapia con anti TNF- α sulla BMD (89, 90, 116). La maggior parte degli studi

ha mostrato una BMD stabile o aumentata nei pazienti con RA trattati con gli anti-TNF- α . Difatti è stato riportato che la terapia anti-TNF- α sia in grado di inibire la perdita ossea a livello della colonna vertebrale e dell'anca (89, 90, 117-120), sebbene altri studi abbiano mostrato risultati contrastanti. Il trattamento di un anno con l'anti-TNF- α Infliximab associato al Metotrexato è stato in grado di prevenire la perdita ossea a livello della colonna vertebrale e dell'anca nei pazienti con RA, rispetto ai pazienti in trattamento esclusivo con Metotrexato (121). Tuttavia, in uno studio molto recente, nessun cambiamento della BMD è stato osservato in pazienti affetti da RA trattati per 15 mesi con anti-TNF- α (122). Anche gli effetti della terapia con anti-TNF- α su BMD in pazienti con SpA non sono del tutto chiari. Alcuni autori hanno evidenziato che in pazienti AS si è verificato un aumento della BMD della colonna dopo trattamento con anti-TNF- α (105, 106), ma i dati disponibili relativi all'effetto sulla BMD nei pazienti con PsA sono scarsi. Analogamente ai risultati presentati, in uno studio pubblicato di recente, in pazienti con PsA, la BMD, valutata con micro qTC, non subiva variazioni dopo un anno di terapia con anti-TNF- α (123). Tuttavia, dai risultati del presente studio, è emerso che al termine dei 12 mesi di trattamento con anti-TNF- α i valori di TBS aumentano significativamente sia nei soggetto con RA che nei soggetti con PsA, suggerendo un possibile effetto positivo di tali farmaci sulla microstruttura dell'osso. In uno studio osservazionale nel quale sono stati valutati 105 pazienti con RA attiva nell'arco di un anno, il TBS, ma non la BMD, è leggermente aumentato (1,7%) nel gruppo in trattamento con farmaco biotecnologico, mentre nel gruppo in trattamento con csDMARD il TBS è rimasto invariato (124), invece non ci sono dati relativi all'effetto della terapia con anti-TNF- α nella PsA.

Negli ultimi anni l'attenzione sui processi fisiopatologici alla base dell'alterato rimodellamento osseo in corso di RA e PsA è stata particolarmente focalizzata sugli

osteoclasti, riconosciuti ampiamente come le cellule responsabili del danno osseo locale e sistemico nella RA. L'attività osteoclastica è influenzata da numerose citochine, ma il sistema RANKL/RANK/OPG gioca un ruolo centrale nella regolazione della maturazione ed attività di tali cellule sia in condizioni fisiologiche che in condizioni patologiche. Nonostante l'analisi degli effetti ossei dell'infiammazione in corso di RA e PsA sia stata prevalentemente centrata sull'aumento del riassorbimento osseo mediato dagli osteoclasti indotto da diverse citochine implicate nella patogenesi della malattia, negli ultimi anni diversi studi hanno dimostrato che l'infiammazione non solo induce l'osteoclastogenesi ed aumenta l'attività osteoclastica, ma inibisce anche il differenziamento e la funzione osteoblastica (46). A tal proposito, numerosi studi si sono accumulati negli ultimi anni, volti a valutare il ruolo della via di trasduzione del segnale Wnt nelle alterazioni ossee in corso di RA e PsA.

I risultati del presente studio evidenziano un aumento dei livelli sierici e di produzione cellulare di RANKL nei pazienti affetti da RA e PsA rispetto ai soggetti sani; i livelli di RANKL risultano essere particolarmente elevati nei pazienti con RA, nei quali sono significativamente superiori anche rispetto ai pazienti con PsA; al contrario, i livelli circolanti e la produzione delle cellule periferiche di OPG sono significativamente ridotti nei pazienti con RA rispetto ai controlli sani e ai pazienti con PsA, mentre non ci sono differenze tra i pazienti con PsA e i controlli sani. I nostri risultati sono stati simili a quelli osservati in molti altri studi (125-127). Il rapporto RANKL/OPG, noto come regolatore dell'osteoclastogenesi, rappresenta un determinante chiave del riassorbimento osseo. Nella maggior parte dei casi, sia una sovraregolazione di RANKL che la sottoregolazione di OPG portano alla perdita ossea. Anche i dati sui livelli di RANKL in PsA sembrano confermare quanto già pubblicato precedentemente; in un altro studio, in cui i livelli circolanti

di RANKL erano elevati in pazienti con PsA, i livelli di OPG non erano differenti rispetto ai soggetti normali (128); al contrario, Grisar et al. hanno riportato che i livelli sierici di OPG erano aumentati in pazienti con PsA comparati con pazienti AS e artrite reattiva o volontari sani (129). Un aspetto interessante dei risultati dello studio presentato è che i livelli di OPG in pazienti con PsA sono più alti rispetto a quelli osservati nei pazienti con RA e non differiscono rispetto ai soggetti normali; ciò porterebbe ad ipotizzare che l'attivazione osteoclastica in pazienti con PsA sia di entità minore rispetto ai pazienti con RA (come supportato dal minore rapporto RANKL/OPG osservato nel siero) ed è possibile che nella PsA la maggiore attività osteoclastica non sia accompagnata anche da una altrettanto importante riduzione dell'attività osteoblastica, come invece è probabile che avvenga in RA. A tal proposito, i dati relativi alle molecole inibitorie del segnale Wnt che sono emersi dallo studio evidenziano che nei pazienti con RA i livelli di sclerostina e Dkk-1 risultano essere significativamente superiori rispetto ai soggetti sani, al contrario, i livelli sierici e la produzione di tali molecole da parte delle cellule mononucleate del sangue periferico risultano essere nei pazienti con PsA significativamente più bassi rispetto ai soggetti sani. Ciò sembrerebbe confermare che in PsA i processi riassorbitivi ossei siano legati ad un aumento dell'attività osteoblastica, mentre una maggiore attivazione del sistema Wnt, derivante da una minore produzione di molecole inibitorie, potrebbe essere legata ai processi di neoformazione ossea, soprattutto locali, tipici della malattia. Abbiamo rilevato che il trattamento con anti-TNF- α determina una riduzione dei livelli circolanti della produzione cellulare di RANKL nei pazienti con RA, che si osserva a partire dal sesto mese di follow up; in maniera concomitante nei pazienti con RA si osserva un aumento dei livelli di OPG, sia a livello sierico, che a livello cellulare. Anche i dati già pubblicati relativi agli effetti della terapia con anti-TNF- α sul sistema RANKL/OPG sono abbastanza

discordanti. Diversi studi non hanno evidenziato modifiche significative nei livelli sierici di RANKL in pazienti affetti da RA (122, 130, 131). Tuttavia, in altri studi è stata riscontrata la normalizzazione o la riduzione dei livelli elevati di sRANKL sia dopo il trattamento con anti-TNF (126) sia dopo trattamento con csDMARD (132). Queste discrepanze possono derivare da differenze metodologiche, soprattutto per quanto riguarda la specificità degli anticorpi utilizzati nei test immunoenzimatici, in grado di riconoscere il RANKL solubile presente nel siero come molecola libera o legata all'OPG. Inoltre, poiché sRANKL può provenire da fonti diverse dell'osso, è ragionevole ritenere che i livelli di sRANKL circolanti non rispecchino interamente il microambiente dell'osso in pazienti con RA dopo il trattamento con anti-TNF- α (133, 134).

I valori di TBS, che al termine del follow up sono significativamente aumentati nei pazienti con RA, correlano direttamente con i livelli circolanti di OPG, e in maniera negativa con i livelli circolanti di Dkk-1 e sclerostina, mentre non si osserva alcuna correlazione con i livelli circolanti di RANKL; nonostante al termine dei 12 mesi di trattamento non si siano osservate variazioni significative della BMD, il miglioramento del TBS porta ad ipotizzare un effetto benefico sulla struttura ossea, che è mediato prevalentemente da un'azione stimolatoria sull'attività osteoblastica. A differenza di quanto osservato nei pazienti con RA, la terapia con anti-TNF- α non ha determinato, nella nostra casistica, alcun effetto sui livelli sierici e sulla produzione da cellule monocitiche di sangue periferico di OPG nei pazienti con PsA. Ciò sembrerebbe suggerire l'ipotesi che l'effetto positivo sull'osso da parte dei farmaci anti-TNF- α possa essere mediato prevalentemente dall'effetto inibitorio sul RANKL, che in PsA sarebbe il principale regolatore dell'attivazione osteoclastica. Il trattamento con anti-TNF- α sembra avere un effetto differente su pazienti con RA e PsA anche sulle molecole inibitorie Wnt: a livello sierico infatti,

mentre nei pazienti con RA si osserva una riduzione significativa sia di Dkk-1 (dal nono mese di follow up) che di sclerostina (a partire dal sesto mese di follow up), nei pazienti con PsA non si osserva alcuna modifica nei livelli sierici di Dkk-1 e sclerostina dopo l'inizio della terapia. Peraltro, nei pazienti con PsA, analogamente a quanto osservato in RA si evidenzia una correlazione positiva tra i valori di TBS ed i livelli circolanti di OPG, mentre a differenza dei pazienti con RA è stata evidenziata una correlazione negativa con i livelli di RANKL e nessuna correlazione con i livelli circolanti di Dkk-1 e sclerostina; nei pazienti con PsA il miglioramento del TBS e quindi l'effetto sistemico sull'osso, potrebbe quindi essere dovuto prevalentemente ad un effetto regolatorio sugli osteoclasti. Questi dati sembrerebbero sostenere l'ipotesi che l'effetto positivo sul danno osseo della terapia con anti-TNF- α in RA sia da attribuire ad una azione inibente l'attività osteoclastica e favorente l'attività osteoblastica (mediante una riduzione delle molecole inibitorie i sistemi Wnt); la riduzione di Dkk-1 e sclerostina non si osserva a livello sierico nei pazienti con PsA, ma un dato interessante è invece l'aumento di tali molecole inibitorie a livello cellulare, che potrebbe far ipotizzare un possibile effetto inibitorio della terapia sui fenomeni di neoformazione ossea che sono tipici della malattia. La discrepanza dell'effetto della terapia con anti-TNF- α sui livelli di Dkk-1 e sclerostina a livello sierico e a livello cellulare spiegata dal fatto che le variazioni di tali molecole a livello sierico, la cui produzione è comunque inferiore rispetto a quanto osservato in RA, non sono di entità tale da poter essere rilevate con i kit ELISA comunemente utilizzati, al contrario a livello cellulare l'effetto della terapia è più facilmente evidenziabile, anche perché peraltro valutato su una singola tipologia cellulare (PBMCs), mentre i livelli sierici riflettono la produzione delle diverse citochine da diversi siti e da più tipi cellulari. Molti studi in cui è stato valutato l'effetto della terapia con anti-TNF- α , hanno evidenziato una diminuzione

della concentrazione sierica di Dkk-1 in pazienti con RA sottoposti a terapia con anti-TNF- α (93-95, 102). In particolare, Adami et al., in uno studio condotto su 54 pazienti con RA, hanno riscontrato una riduzione dei livelli sierici di Dkk-1 dopo 6 mesi di trattamento con anti-TNF- α (la maggior parte dei pazienti era stata trattata con adalimumab e certolizumab, meno con etanercept, infliximab e golimumab); non hanno osservato alcun cambiamento nei livelli sierici di sclerostina, suggerendo quindi che i cambiamenti di Dkk-1 non fossero associati a un feedback con sclerostina (93). Al contrario, Fassio et al., recentemente, in uno studio hanno riscontrato un rapido calo dei livelli sierici di Dkk-1 e sclerostina nei pazienti con RA dopo due mesi di trattamento con l'anti-TNF- α certolizumab-pegol, accompagnato da marcati cambiamenti nel turnover osseo (94). La rapidità della riduzione dei livelli sierici di Dkk-1 osservata dopo l'inizio del trattamento dimostra ulteriormente l'induzione TNF- α -dipendente di Dkk-1 *in vivo*, già dimostrata *in vitro* (65), come già suggerito da Daoussis et al. (102). Wang et al. hanno riportato che la concentrazione sierica di Dkk-1 era significativamente aumentata nei pazienti con RA rispetto ai controlli sani e ai pazienti affetti da altre malattie reumatiche. Inoltre, nel loro studio, il trattamento con l'anti-TNF- α Infliximab e anti-IL-1 Anakinra ha indotto una riduzione significativa dei livelli circolanti di Dkk-1 (33, 95). Per quanto riguarda le SpA (gruppo di cui fa parte la PsA), diversi studi hanno mostrato che i livelli circolanti di Dkk-1 rispondono in maniera differente al blocco del TNF- α . È stato mostrato che i livelli sierici di Dkk-1 erano significativamente più alti in pazienti con AS rispetto ai pazienti con RA e controlli sani e che erano ulteriormente aumentati in pazienti con AS in trattamento con anti-TNF- α (102); gli autori hanno ipotizzato che i livelli più elevati di Dkk-1 possano riflettere un meccanismo di contro-bilanciamento per attenuare la segnalazione Wnt, che si attiva dopo la risoluzione dell'infiammazione a seguito del trattamento.

Al contrario, analogamente a quanto emerso in questo studio, un altro studio ha rilevato che i livelli circolanti di Dkk-1 erano più bassi in pazienti con AS rispetto ai controlli sani, ma non venivano modificati dopo il trattamento con anti-TNF- α (38); mentre in altri studi è stato confermato che in pazienti con SpA i livelli di Dkk-1 e sclerostina erano significativamente più bassi rispetto ai controlli sani (135). Tra i motivi per cui i dati relativi ai livelli circolanti di inibitori di Wnt in pazienti con SpA sono molto discordanti c'è la possibilità che la produzione di tali citochine possa variare in base allo stadio evolutivo della malattia. Kwon et al., in pazienti AS non hanno evidenziato alcuna variazione nei livelli sierici di Dkk-1 dopo 3 mesi dal trattamento con gli anti-TNF- α (38). Al contrario, in pazienti affetti da axSpA con elevata attività di malattia sono stati evidenziati livelli sierici di Dkk-1 significativamente più alti prima del trattamento rispetto ai pazienti con bassa attività di malattia e trattati esclusivamente con FANS, mentre è stata evidenziata nei pazienti con elevata attività di malattia una riduzione dei livelli di Dkk-1 associata a miglioramento degli indici di flogosi e degli indici clinimetrici a seguito di terapia con anti-TNF- α della durata di 6 mesi (136). Analogamente in un altro studio, Zhao et al. hanno mostrato che i livelli sierici di Dkk-1 sono significativamente diminuiti dopo 6 mesi di trattamento con gli inibitori del TNF- α nei pazienti con AS ad elevata attività della malattia associato ad una riduzione degli indici clinimetrici, biumorali e di imaging di attività di malattia, soprattutto per quanto riguarda l'edema a livello delle articolazioni sacro-iliache (101). Il trattamento con anti-TNF- α potrebbe nelle fasi iniziali della malattia prevenire quindi la neoformazione ossea locale agendo tramite un aumento degli inibitori del sistema Wnt.

Per ultimo, i dati provenienti dal nostro studio evidenziano una più accentuata osteoclastogenesi nei pazienti affetti da RA rispetto ai pazienti affetti da PsA, a

fronte di una attività osteoclastogenica assente nei controlli sani (attività comunque inducibile con opportuno stimolo in tale gruppo); ciò è in accordo con quanto riportato precedentemente in letteratura già nel 2003 da Ritchlin et al., che hanno evidenziato un marcato aumento dei precursori degli osteoclasti in campioni di sangue provenienti da pazienti con PsA rispetto ai controlli sani e una forte attivazione osteoclastica *in vitro* in colture cellulari di PBMCs di pazienti con PsA, in assenza di stimolatori esogeni (RANKL e M-CSF) (7). La maggiore attività osteoclastogenica riscontrata nel gruppo RA rispetto al gruppo PsA potrebbe corrispondere ad un diverso pattern nell'espressione *in vivo* e *in vitro* di RANKL e OPG: nel gruppo di pazienti affetti da RA si rileva al basale, rispetto ai controlli sani, sia più alti livelli di RANKL che minori livelli di OPG, mentre nel gruppo di pazienti affetti da PsA ad elevati livelli di RANKL non corrispondono livelli di OPG ridotti. La terapia con anti-TNF- α sembra influenzare il differenziamento osteoclastico, che risulta significativamente ridotto sia in pazienti con RA che in pazienti con PsA, così come sembra ridurre i livelli sierici e la sintesi da parte delle cellule mononucleate di RANKL.

10. CONCLUSIONI

I farmaci anti-TNF- α sono efficaci nel ridurre l'infiammazione e la progressione del danno radiologico nei pazienti con RA, tuttavia, il meccanismo mediante il quale gli inibitori del TNF- α prevengono la progressione della distruzione ossea non è ancora chiaro. Tra i meccanismi principalmente coinvolti nella regolazione del danno osseo in PsA e RA, il sistema RANKL/OPG e le molecole regolatorie del sistema Wnt giocano indubbiamente un ruolo chiave, sebbene in maniera probabilmente differente nelle due malattie. Il trattamento con gli anticorpi anti-TNF- α è in grado di modificare il danno strutturale osseo locale in corso di PsA e RA e molti dati supportano un effetto favorevole di tali farmaci sul danno osseo generalizzato che si osserva in tali patologie.

In questo studio è stato dimostrato che i pazienti con RA e PsA presentano una alterata modulazione dei sistemi RANKL/OPG e delle molecole regolatrici Wnt e che presentano una tendenza alla osteoclastogenesi spontanea che probabilmente gioca un ruolo fondamentale nella patogenesi del danno osseo, locale e sistemico. Inoltre la terapia con anti-TNF- α è in grado di modulare il sistema RANKL/OPG e anche le molecole regolatrici del sistema Wnt (Dkk-1 e sclerostina) e di esercitare un effetto inibitorio sulla osteoclastogenesi. I processi del danno osseo in RA e in SpA (ed in particolare in PsA) sono differenti ed estremamente complessi, in quanto sottointendono una stretta e complessa interazione tra cellule ossee, cellule midollari e cellule del sistema immunitario e probabilmente variano a seconda dello stadio evolutivo della malattia.

Ulteriori studi, clinici e sperimentali, sono comunque necessari al fine di migliorare le conoscenze dei meccanismi molecolari alla base del danno osseo in queste

malattie e favorire la comprensione dei meccanismi d'azione alla base degli effetti positivi dei farmaci utilizzati per il loro trattamento.

BIBLIOGRAFIA

1. Gough AKS, , Lilley J, Eyre S, Holder RL , Emery P. Generalised bone loss in patients with early rheumatoid Arthritis. *The Lancet*, vol. 344, no. 8914, pp. 23–27, 1994.
2. Gladman DD. Psoriatic arthritis. *Rheum Dis North Am.*1998;24:829-44.
3. Teitelbaum, S.L. 2000. Bone resorption by osteoclasts. *Science.* 289:1504–1508.
4. Massey, H.M., and Flanagan, A.M. 1999. Human osteoclasts derive from CD14-positive monocytes. *Br. J. Haematol.* 106:167–170.
5. Colucci S, Brunetti G, Cantatore FP, Oranger A, Mori G, Quarta L, Cirulli N, Mancini L, Corrado A, Grassi FR, Grano M. Lymphocytes and synovial fluid fibroblasts support osteoclastogenesis through RANKL, TNF alpha, and IL-7 in an in vitro model derived from human psoriatic arthritis. *J Pathol.* 2007 May;212(1):47-55.
6. Hardy R and Cooper MS, “Bone loss in inflammatory disorders,” *Journal of Endocrinology*, vol. 201, no. 3, pp. 309–320, 2009
7. Ritchlin CT, Haas-Smith SA, Li P, Hicks DG, Schwarz EM. Mechanisms of TNF-alpha and RANKL-mediated osteoclastogenesis and bone resorption in psoriatic arthritis. *J Clin Invest.* 2003 Mar;111(6):821-31.
8. Redlich K, Hayer S, Ricci R, David JP, Tohidast-Akrad M, Kollias G, et al. Osteoclasts are essential for TNF-alpha -mediated joint destruction. *J Clin Invest* 2002;110:1419–27.
9. Jung SM, Kim KW, Yang CW, Park SH, Ju JH. Cytokine-mediated bone destruction in rheumatoid arthritis. *J Immunol Res.* 2014;2014:263625.
10. Smolen JS, Aletaha D, Redlich K. The pathogenesis of rheumatoid arthritis: new insights from old clinical data? *Nat Rev Rheumatol* 2012;8:235–43.

11. Corrado A, Neve A, Maruotti N, Cantatore FP. Bone effects of biologic drugs in rheumatoid arthritis. *Clin Dev Immunol.* 2013;2013.
12. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TWJ (2010) Rheumatoid arthritis. *Lancet* 376:1094–1108
13. Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 2016; S0140-6736 (16): 30173-8.
14. Silman AJ, Pearson JE. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2002;4(Suppl 3):S265–72.
15. Scherer HU, Häuplb T, Burmesterb GR. The etiology of rheumatoid arthritis. *Journal of Autoimmunity.* 110(2020) 102400.
16. de Vries N, Tijssen H, van Riel PL, van de Putte LB. Reshaping the shared epitope hypothesis: HLA-associated risk for rheumatoid arthritis is encoded by amino acid substitutions at positions 67-74 of the HLA-DRB1 molecule. *Arthritis Rheum* 2002;46:921–8
17. Quinn MA, Cox S. The evidence for early intervention. *Rheum Dis Clin North Am.* 2005 Nov;31(4):575-89.
18. Amjadi S, Khanna D, Park GS, Bulpitt KJ, Wong WK, Paulus HE. Dating the "window of therapeutic opportunity" in early rheumatoid arthritis: accuracy of patient recall of arthritis symptom onset. *J Rheumatol.* 2004 Sep;31(9):1686-92. Erratum in: *J Rheumatol.* 2011 Jan;38(1):183. Amjadi-Begvand, Sogol [corrected to Amjadi, Sogol]. PMID: 15338485.
19. Machold KP, Nell V, Stamm T, Aletaha D, Smolen JS. Early rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2006 May;18(3):2828.
20. Young A. Early rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am.* 2005 Nov;31(4):659-79.

21. Zhao J, Li ZG. The challenges of early diagnosis and therapeutic prediction in rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis.* 2018 Dec;21(12):2059-2062.
22. Mjaavatten MD, Bykerk VP. Early rheumatoid arthritis: the performance of the 2010 ACR/EULAR criteria for diagnosing RA. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2013 Aug;27(4):451-66.
23. Saraux A, Berthelot JM, Chalès G, Le Henaff C, Thorel JB, Hoang S, Valls I, Devauchelle V, Martin A, Baron D, Pennec Y, Botton E, Mary JY, Le Goff P, Youinou P. Ability of the American College of Rheumatology 1987 criteria to predict rheumatoid arthritis in patients with early arthritis and classification of these patients two years later. *Arthritis Rheum.* 2001 Nov;44(11):2485-91.
24. Smolen JS, Landewé RBM, Bijlsma JWJ, Burmester GR, Dougados M, Kerschbaumer A, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2019 update. *Ann Rheum Dis.* 2020;79(6):685-99.)
25. Zhao J, Su Y, Li R, Ye H, Zou Q, Fang Y, Liu H, Li X, Guo J, Bi L, Gu F, Sun L, Mei Y, Zhang Z, Chen L, Zhu P, Li G, Zhang Z, Leng X, Zhao Y, Jiang L, Zou H, Zhao Y, Liu Y, Li L, Wang H, Liu X, Li Z. Classification criteria of early rheumatoid arthritis and validation of its performance in a multi-centre cohort. *Clin Exp Rheumatol.* 2014 Sep-Oct;32(5):667-73
26. Ye H, Su Y, Li R, Zhao J, Liu X, Mei Y, Zhang Z, Guo J, Bi L, Liu X, Wang G, Liu J, Leng X, Gu F, Sun L, Zou Q, Fang Y, Jiang Q, Li Z. Comparison of three classification criteria of rheumatoid arthritis in an inception early arthritis cohort. *Clin Rheumatol.* 2016 Oct;35(10):2397-401.
27. Maruotti, N.; Corrado, A.; Cantatore, F.P. Osteoporosis and rheumatic diseases *Reumatismo* 2014, 66, 125–135.

28. van der Heijde DM (1995) Joint erosions and patients with early rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 34(Suppl 2):74–78
29. Visser H, le Cessie S, Vos K, Breedveld FC, Hazes JM (2002) How to diagnose rheumatoid arthritis early: a prediction model for persistent (erosive) arthritis. *Arthritis Rheum* 46:357–365
30. Rossini M, Adami G, Viapiana O, Idolazzi L, Orsolini G, Fassio A, Giollo A, Gatti D (2017) Osteoporosis: an independent determinant of bone erosions in rheumatoid arthritis? *J Bone Miner Res* 32:2142–2143
31. Rossini M, Bagnato G, Frediani B, Iagnocco A, G LAM, Minisola G, Caminiti M, Varenna M, Adami S (2011) Relationship of focal erosions, bone mineral density, and parathyroid hormone in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 38:997–1002
32. Poddubnyy, D.; Sieper, J. Current Unmet Needs in Spondyloarthritis. *Curr.Rheumatol.Rep.* 2019,21,43.
33. Cici D, Corrado A, Rotondo C, Cantatore FP. Wnt Signaling and Biological Therapy in Rheumatoid Arthritis and Spondyloarthritis. *International Journal of Molecular Sciences.* 2019 Nov; 20(22): 5552.
34. Gruppo di lavoro multidisciplinare in reumatologia e dermatologia Regione Emilia Romagna. Trattamento sistemico dell'Artrite Psoriasica nell'adulto, con particolare riferimento ai farmaci biologici. Linee guida terapeutiche n. 7, Aggiornamento Gennaio 2016. Assessorato alla Sanità e alle Politiche Sociali e per l'Integrazione Regione Emilia Romagna.
35. Gladman DD. Clinical Features and Diagnostic Considerations in Psoriatic Arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 2015 Nov;41(4):569-79

36. Congi L, Roussou E. Clinical application of the CASPAR criteria for psoriatic arthritis compared to other existing criteria. *Clin Exp Rheumatol*. 2010 May-Jun;28(3):304-10. Epub 2010 Jun 23.
37. Punzi L, Podswiadek M, Oliviero F, Lonigro A, Modesti V, et al. Laboratory findings in psoriatic arthritis. *Reumatismo* 2007;59 Suppl 1:52-5.
38. Kwon, S.R.; Lim, M.J.; Suh, C.H.; Park, S.G.; Hong, Y.S.; Yoon, B.Y.; Kim, H.A.; Choi, H.J.; Park,W. Dickkopf-1 level is lower in patients with ankylosing spondylitis than in healthy people and is not influenced by anti-tumor necrosis factor therapy. *Rheumatol. Int.* 2012, 32, 2523–2527.
39. Osta, B.; Benedetti, G.; Miossec, P. Classical and paradoxical effects of TNF- α on bone homeostasis. *Front. Immunol.* 2014,5, 48.
40. Magrey, M.N.; Khan, M.A. The Paradox of Bone Formation and Bone Loss in Ankylosing Spondylitis: Evolving New Concepts of Bone Formation and Future Trends in Management. *Curr. Rheumatol. Rep.* 2017, 19, 17.
41. Schett, G. Bone formation in psoriatic arthritis: Areport from the GRAPPA2013 Annual Meeting. *J. Rheumatol.*2014, 41, 1218–1219.
42. Chandran S, Aldei A, Johnson SR, Cheung AM, Salonen D, Gladman DD (2016) Prevalence and risk factors of low bone mineral density in psoriatic arthritis: a systematic review. *Semin Arthritis Rheum* 46:174–182
43. Gulati AM, Michelsen B, Diamantopoulos A, Grandaunet B,Salvesen O, Kavanaugh A, Hoff M, Haugeberg G (2018) Osteoporosis in psoriatic arthritis: a cross-sectional study of an outpatient clinic population. *RMD Open* 4:e000631
44. Ogdie A, Harter L, Shin D, Baker J, Takeshita J, Choi HK, Love TJ, Gelfand JM (2017) The risk of fracture among patients with psoriatic arthritis and psoriasis: a population-based study. *Ann Rheum Dis* 76:882–885

45. Raggatt, L.J.; Partridge, N.C. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J. Biol. Chem.* 2010, 285, 25103–25108.
46. Baum R, Gravallesse EM (2014) Impact of inflammation on the osteoblast in rheumatic diseases. *Curr Osteoporos Rep* 12:9–16
47. Boyce BF, Xing L (2008) Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys* 473:139–146
48. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL (2003) Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423:337–342
49. Cheon YH, Kim JY, Baek JM, Ahn SJ, Jun HY, Erkhembaatar M, Kim MS, Lee MS, Oh J (2016) WHI-131 promotes osteoblast differentiation and prevents osteoclast formation and resorption in mice. *J Bone Miner Res* 31:403–415
50. Corrado A, Sanpaolo ER, Di Bello S, Cantatore FP (2017) Osteoblast as a target of anti-osteoporotic treatment. *Postgrad Med* 129:858–865
51. Maruotti N, Corrado A, Cantatore FP (2017) Osteoblast role in osteoarthritis pathogenesis. *J Cell Physiol* 232:2957–2963
52. Sanpaolo ER, Rotondo C, Cici D, Corrado A, Cantatore FP. JAK/STAT pathway and molecular mechanism in bone remodeling *Molecular Biology Reports* volume 47, 9087–9096 (2020)
53. Corrado A, Neve A, Macchiarola A, Gaudio A, Marucci A, Cantatore FP (2013) RANKL/OPG ratio and DKK-1 expression in primary osteoblastic cultures from osteoarthritic and osteoporotic subjects. *J Rheumatol* 40:684–694
54. Maruotti N, Grano M, Colucci S, d’Onofrio F, Cantatore FP. Osteoclastogenesis and arthritis. *Clin Exp Med* (2011) 11:137–145
55. Sambrook P, “The skeleton in rheumatoid arthritis: common mechanisms for bone erosion and osteoporosis?” *Journal of Rheumatology*, vol. 27, no. 11, pp. 2541–2542, 2000.

56. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ (1997) Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89:309–319
57. Harre U, Schett G (2017) Cellular and molecular pathways of structural damage in rheumatoid arthritis. *Semin Immunopathol* 39:355–363
58. Sambrook P, “Tumour necrosis factor blockade and the risk of osteoporosis: back to the future,” *Arthritis Research and Therapy*, vol. 9, no. 4, article 107, 2007
59. Shim JH, Stavre Z, Gravallesse EM (2018) Bone loss in rheumatoid arthritis: basic mechanisms and clinical implications. *Calcif Tissue Int* 102:533–546
60. G. Kruppa, B. Thoma, T. Machleidt, K. Wiegmann, and M. Krönke, “Inhibition of tumor necrosis factor (TNF)-mediated NF- κ B activation by selective blockade of the human 55-kDa TNF receptor,” *Journal of Immunology*, vol. 148, no. 10, pp. 3152–3157, 1992.
61. Corrado A, Neve A, Maruotti N, Cantatore FP. Bone Effects of Biologic Drugs in Rheumatoid Arthritis. *Clinical and Developmental Immunology*. 2013, Article ID 945945, 7 pages
62. Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E et al., “Tumor necrosis factor α stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction,” *Journal of Experimental Medicine*, vol. 191, no. 2, pp. 275–285, 2000.
63. Gilbert L, He X, Farmer P et al., “Inhibition of osteoblast differentiation by tumor necrosis factor- α ,” *Endocrinology*, vol.141, no. 11, pp. 3956–3964, 2000.

64. Gilbert L, He X, Farmer P et al., “Expression of the osteoblast differentiation factor RUNX2 (Cbfa1/AML3/Pebp2alpha A) is inhibited by tumor necrosis factor-alpha,” *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 4, pp. 2695–2701, 2002.
65. Diarra D, Stolina M, Polzer K et al., “Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling,” *Nature Medicine*, vol. 13, no. 2, pp. 156–163, 2007.
66. Komiya Y.; Habas R. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis* 2008, 4, 68–75.
67. Heiland G.R.; Zwerina K.; Baum W.; Kireva T.; Distler J.H.; Grisanti M.; Asuncion F.; Li X.; Ominsky M.; Richards W.; et al. Neutralisation of Dkk-1 protects from systemic bone loss during inflammation and reduces sclerostin expression. *Ann. Rheum. Dis.* 2010, 69, 2152–2159.
68. Di Munno, O.; Ferro, F. The effect of biologic agents on bone homeostasis in chronic inflammatory rheumatic diseases. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2019, 37, 502–507.
69. Singh, A.; Gupta, M.K.; Mishra, S.P. Study of correlation of level of expression of Wnt signaling pathway inhibitors sclerostin and dickkopf-1 with disease activity and severity in rheumatoid arthritis patients. *Drug Discov. Ther.* 2019, 13, 22–27.
70. Seror, R.; Boudaoud, S.; Pavy, S.; Nocturne, G.; Schaefferbeke, T.; Saraux, A.; Chanson, P.; Gottenberg, J.E.; Devauchelle-Pensec, V.; Tobón, G.J.; et al. Increased Dickkopf-1 in Recent-onset Rheumatoid Arthritis is a New Biomarker of Structural Severity. Data from the ESPOIR Cohort. *Sci. Rep.* 2016, 6, 18421.
71. Garnero, P.; Tabassi, N.C.; Voorzanger-Rousselot, N. Circulating Dickkopf-1 and radiological progression in patients with early Rheumatoid Arthritis treated with etanercept. *J. Rheumatol.* 2008, 35, 2313–2315.
72. Fassio, A.; Gatti, D.; Rossini, M.; Idolazzi, L.; Giollo, A.; Adami, G.; Gisoni, P.; Girolomoni, G.; Viapiana, O. Secukinumab produces a quick increase in WNT

- signalling antagonists in patients with psoriatic arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2019, 37, 133–136.
73. Uluçkan, Ö.; Jimenez, M.; Karbach, S.; Jeschke, A.; Graña, O.; Keller, J.; Busse, B.; Croxford, A.L.; Finzel, S.; Koenders, M.; et al. Chronic skin inflammation leads to bone loss by IL-17-mediated inhibition of Wnt signaling in osteoblasts. *Sci. Transl. Med.* 2016, 8, 330ra37.
74. Tam, L.S.; Gu, J.; Yu, D. Pathogenesis of ankylosing spondylitis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2010, 6, 399–405.
75. Osta, B.; Benedetti, G.; Miossec, P. Classical and paradoxical effects of TNF on bone homeostasis. *Front. Immunol.* 2014, 5, 48.
76. Szentpétery, Á.; Horváth, Á.; Gulyás, K.; Pethö, Z.; Bhattoa, H.P.; Szántó, S.; Szücs, G.; FitzGerald, O.; Schett, G.; Szekanecz, Z. Effects of targeted therapies on the bone in arthritides. *Autoimmun. Rev.* 2017, 16, 313–320.
77. Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med.* 1996;334:1717.
78. Aggarwal BB, Gupta SC, Kim JH, Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood.* 2012;119(3):651–665.
79. Croft M, Siegel RM, Beyond TNF. TNF superfamily cytokines as targets for the treatment of rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol.* 2017;13(4):217–233.
80. McInnes, I.B.; Schett, G. Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis. *Lancet* 2017, 389, 2328–2337.
81. Kondo, N.; Kuroda, T.; Kobayashi, D. Cytokine Networks in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 10922.
82. Okamoto, K.; Takayanagi, H. Osteoimmunology. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2019, 9, a031245.

83. Murdaca G, Gulli R, Spanò F et al. TNF- α gene polymorphisms: association with disease susceptibility and response to anti-TNF- α treatment in psoriatic arthritis. *J Invest Dermatol*. 2014;134(10):2503-2509.
84. Murdaca G, et al. Impact of pharmacogenomics upon the therapeutic response to etanercept in psoriasis and psoriatic arthritis. *Expert Opin Drug Saf*. 2017;16(10):1173-1179.
85. Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, et al. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Ther*. 2008;117(2):244–279.
86. European Medicines Agency. Summary of Product Characteristics-Kineret. Available online: https://www.ema.europa.eu/documents/productinformation/kineret-epar-product-information_en.pdf
87. Briot K, Garnero P, Le Henanff A, Dougados M, Roux C. Body weight, body composition, and bone turnover changes in patients with spondyloarthritis receiving anti-tumor necrosis factor treatment. *Ann Rheum Dis* 2005;64:1137-40.
88. Torikai E, Kageyama Y, Takahashi M et al., “The effect of infliximab on bone metabolism markers in patients with rheumatoid arthritis,” *Rheumatology*, vol. 45, no. 6, pp. 761–764, 2006.
89. Vis M, Havaardsholm EA, Haugeberg G et al., “Evaluation of bone mineral density, bone metabolism, osteoprotegerin and receptor activator of the NF κ B ligand serum levels during treatment with infliximab in patients with rheumatoid arthritis,” *Annals of the Rheumatic Diseases*, vol. 65, no. 11, pp. 1495–1499, 2006.
90. Lange U, Teichmann J, Müller-Ladner U, and Strunk J, “Increase in bone mineral density of patients with rheumatoid arthritis treated with anti-TNF- α

antibody: a prospective openlabel pilot study,” *Rheumatology*, vol. 44, no. 12, pp. 1546–1548, 2005.

91. Saidenberg-Kermanac’h N, Corrado A, Lemeitera D, deVernejoul J, Boissiera MC, Cohen-Solal ME. TNF- α antibodies and osteoprotegerin decrease systemic bone loss associated with inflammation through distinct mechanisms in collagen-induced arthritis. *Bone* 2004 Nov;35(5):1200-7

92. Orsolini G, Fassio A, Rossini M, Adami G, Giollo A, Caimmi C, Idolazzi L, Viapiana O, Gatti D. Effects of biological and targeted synthetic DMARDs on bone loss in rheumatoid arthritis. *Pharmacol Res* 2019 Sep;147:104354.

93. Adami, G.; Orsolini, G.; Adami, S.; Viapiana, O.; Idolazzi, L.; Gatti, D.; Rossini, M. Effects of TNF Inhibitors on Parathyroid Hormone and Wnt Signaling Antagonists in Rheumatoid Arthritis. *Calcif. Tissue Int.* 2016, 99, 360–364.

94. Fassio, A.; Adami, G.; Gatti, D.; Orsolini, G.; Giollo, A.; Idolazzi, L.; Benini, C.; Vantaggiato, E.; Rossini, M.; Viapiana, O. Inhibition of tumor necrosis factor- α (TNF α) in patients with early rheumatoid arthritis results in acute changes of bone modulators. *Int. Immunopharmacol.* 2019, 67, 487–489.

95. Wang, S.Y.; Liu, Y.Y.; Ye, H.; Guo, J.P.; Li, R.; Liu, X.; Li, Z.G. Circulating dickkopf-1 is correlated with bone erosion and inflammation in Rheumatoid Arthritis. *J. Rheumatol.* 2011, 38, 821–827.

96. Salvarini C, Olivieri I, Cantini F, Marchesoni A, Punzi L, Scarpa R, Matucci Cerin M. Recommendations for the appropriate use of anti-TNF α therapy in patients with psoriatic arthritis *Reumatismo*, 2004; 56(3):133-138

97. Rahman P, Nguyen E, Cheung C, Schentag CT, Gladman DD. Comparison of radiological severity in psoriatic arthritis and rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2001;28:1041–1044

98. Lubrano E, Scriffignano S, Perrotta M (2019): TNF alpha inhibitors for the six treatment targets of psoriatic arthritis, *Expert Review of Clinical Immunology*. 2019 Dec;15(12):1303-1312.
99. Heiland, G.R.; Appel, H.; Poddubnyy, D.; Zwerina, J.; Hueber, A.; Haibel, H.; Baraliakos, X.; Listing, J.; Rudwaleit, M.; Schett, G.; et al. High level of functional dickkopf-1 predicts protection from syndesmophyte formation in patients with ankylosing spondylitis. *Ann. Rheum. Dis.* 2012, 71, 572–574.
100. Uderhardt, S.; Diarra, D.; Katzenbeisser, J.; David, J.P.; Zwerina, J.; Richards, W.; Kronke, G.; Schett, G. Blockade of Dickkopf (DKK)-1 induces fusion of sacroiliac joints. *Ann. Rheum. Dis.* 2010, 69, 592–597.
101. Zhao, Z.; Wang, G.; Wang, Y.; Yang, J.; Wang, Y.; Zhu, J.; Huang, F. Correlation between magnetic resonance imaging (MRI) findings and the new bone formation factor Dkk-1 in patients with spondyloarthritis. *Clin. Rheumatol.* 2019, 38, 465–475.
102. Daoussis, D.; Lioussis, S.N.; Solomou, E.E.; Tsanakti, A.; Bounia, K.; Karampetsou, M.; Yiannopoulos, G.; Andonopoulos, A.P. Evidence that Dkk-1 is dysfunctional in Ankylosing Spondylitis. *Arthritis Rheum.* 2010, 62, 150–158.
103. Xie W, Zhou L, Li S, Hui T, Chen D. Wnt/ β -catenin signaling plays a key role in the development of spondyloarthritis *Ann N Y Acad Sci.* 2016 Jan;1364(1):25-31.
104. Boussoualim K, Amouzougan A, Pallot-Prades B, Denarié D, Collet P, Marotte H, Thomas T Evaluation of bone quality with trabecular bone score in active spondyloarthritis. *Joint Bone Spine.* 2018 Dec;85(6):727-731.
105. Toussiro E, Mourot L, Wendling D, et al. Trabecular bone score in rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis and changes during long term treatment with TNF α blocking agents. *J. Bone Miner Res* 2012;27:381.

106. Casabella A, Serio C, Botticella G, Molfetta L. Trabecular bone score (TBS) as a innovative parameter evaluation for Rheumatic Diseases. *Giornale Italiano di Ortopedia e Traumatologia* 2016;42:268-276
107. Pradeep K, Dagur and J. Philip McCoy, Jr. Collection, Storage, and Preparation of Human Blood Cells. *Curr Protoc Cytom.* 2015; 73: 5.1.1–5.1.16.
108. Nam JL, Ramiro S, Gaujoux-Viala C, Takase K, Leon-Garcia M, Emery P, Gossec L, Landewe R, Smolen JS, Buch MH (2014) Efficacy of biological disease-modifying antirheumatic drugs: a systematic literature review informing the 2013 update of the EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 73:516–528.
109. Goulabchand R, Mouterde G, Barnetche T, Lukas C, Morel J, Combe B (2014) Effect of tumour necrosis factor blockers on radiographic progression of psoriatic arthritis: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Ann Rheum Dis* 73:414–419
110. Keystone EC, Kavanaugh AF, Sharp JT, Tannenbaum H, Hua Y, Teoh LS, Fischkoff SA, Chartash EK (2004) Radiographic, clinical, and functional outcomes of treatment with adalimumab (a human anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody) in patients with active rheumatoid arthritis receiving concomitant methotrexate therapy: a randomized, placebo-controlled, 52-week trial. *Arthritis Rheumatol* 50:1400–1411
111. Maruotti N, d'Onofrio F, Corrado A, Cantatore FP. Why TNF- α inhibition is not sufficient to avoid juxta-articular erosions in chronic arthritis? *Intern Emerg Med.* 2012;7(1):15-20.
112. Güler-Yüksel M, Bijsterbosch J, Goekoop-Ruiterman YPM et al. Changes in bone mineral density in patients with recent onset, active rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2008;67(6):823-8.

113. Kilic E, Ozgocmen S. Bone mass in axial spondyloarthritis: A literature review. *World J Orthop* 2015;6(2):298-310. 15. Kilic E, Ozgocmen S. Bone mass in axial spondyloarthritis: A literature review. *World J Orthop* 2015;6(2):298-310.
114. Silva BC, Leslie WD, Resch H, Lamy O, Binkley N, McCloskey EV, Kanis JA, Bilezikian JP. Trabecular bone score: a noninvasive analytical method based upon the DXA image. *J Bone Miner Res.* 2014 Mar;29(3):518-30
115. Orsolini G, Adami G, Adami S, Viapiana O, Idolazzi L, Gatti D, Rossini M. Short-Term Effects of TNF Inhibitors on Bone Turnover Markers and Bone Mineral Density in Rheumatoid Arthritis. *Calcif Tissue Int.* 2016 Jun;98(6):580-5
116. Haugeberg G, Conaghan PG, Quinn M, Emery P. Bone loss in patients with active early rheumatoid arthritis: infliximab and methotrexate compared with methotrexate treatment alone. Explorative analysis from a 12-month randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Annals of the Rheumatic Diseases.* 2009;68(12):1898–1901.
117. Chopin F, Garnero P, le Henanff A, et al. Long-term effects of infliximab on bone and cartilage turnover markers in patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2008;67(3):353–357.
118. Eekman DA, Vis M, Bultink IEM, et al. Stable bone mineral density in lumbar spine and hip in contrast to bone loss in the hands during long-term treatment with infliximab in patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases.* 2011;70(2):389–390.
119. Wijbrandts CA, Klaasen R, Dijkgraaf MGW, Gerlag DM, van Eck-Smit BLF, Tak PP. Bone mineral density in rheumatoid arthritis patients 1 year after adalimumab therapy: arrest of bone loss. *Annals of the Rheumatic Diseases.* 2009;68(3):373–376.

120. Vis M, Voskuyl AE, Wolbink GJ, Dijkmans BAC, Lems WF. Bone mineral density in patients with rheumatoid arthritis treated with infliximab. *Annals of the Rheumatic Diseases*.2005;64(2):336–337.
121. Marotte H, Pallot-Prades B, Grange L, Gaudin P, Alexandre C, Miossec P. A 1-year case-control study in patients with rheumatoid arthritis indicates prevention of loss of bone mineral density in both responders and nonresponders to infliximab. *Arthritis Research and Therapy*.2007;9
122. Jura-Poltorak A, Szeremeta A, Olczyk K, Zoń-Giebel A, Komosińska-Vassev K. Bone Metabolism and RANKL/OPG Ratio in Rheumatoid Arthritis Women Treated with TNF- α Inhibitors. *J Clin Med*. 2021 Jun 29;10(13):2905.
123. Juhász B, Gulyás K, Horváth Á, Végh E, Pusztai A, Szentpétery Á, Pethó Z, Bodnár N, Hamar A, Bodoki L, Bhattoa HP, Szekanecz É, Hodosi K, Domján A, Szamosi S, Horváth C, Szántó S, Szűcs G, Raterman HG, Lems WF, FitzGerald O, Szekanecz Z. Peripheral quantitative computed tomography in the assessment of bone mineral density in anti-TNF-treated rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis patients. *BMC Musculoskelet Disord*. 2021 Sep 23;22(1):817.
124. Killinger Z, Gajdarova L, Kuzma M, Krajcovicova A, Brazdilova K, Jackuliak P, et al. Biologic treatment in comparison to methotrexate has positive effect on trabecular bone score in rheumatoid arthritis patients: 1-year follow-up. *Acta Clin Belg*. 2019;74(2):121–5.
125. Xu, S.; Wang, Y.; Lu, J.; Xu, J. Osteoprotegerin and RANKL in the pathogenesis of rheumatoid arthritis-induced osteoporosis. *Rheumatol. Int*. 2012, 32, 3397–3403
126. Ziolkowska, M.; Kurowska, M.; Radzikowska, A.; Luszczkiewicz, G.; Wiland, P.; Dziewczopolski, W.; Filipowicz-Sosnowska, A.; Pazdur, J.; Szechinski, J.; Kowalczewski, J.; et al. High levels of osteoprotegerin and soluble

receptor activator of nuclear factor kappa B ligand in serum of rheumatoid arthritis patients and their normalization after anti-tumor necrosis factor alpha treatment. *Arthritis Rheum.* 2002, 46, 1744–1753.

127. Fadda, S.; Hamdy, A.; Abulkhair, E.; Elsify, H.M.; Mostafa, A. Serum levels of osteoprotegerin and RANKL in patients with rheumatoid arthritis and their relation to bone mineral density and disease activity. *Egypt. Rheumat.* 2015, 37, 16.

128. Hofbauer LC, Schoppet M, Christ M, Teichmann J, Lange U. Tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and osteoprotegerin serum levels in psoriatic arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2006 Oct;45(10):1218-22.

129. Grisar J, Bernecker PM, Aringer M et al. Ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis, and reactive arthritis show increased bone resorption, but differ with regard to bone formation. *J Rheumatol* 2002;29:1430–6.

130. Dhooria, A.; Pandurangan, N.; Mahesh, K.V.; Sachdev, S.; Sharma, A.; Sharma, S.; Gupta, N.; Dhir, V. Circulating levels of osteoprotegerin and sRANKL and the effect of methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. *Indian J. Rheumatol.* 2018, 13, 90–94.

131. González-Alvaro, I.; Ortiz, A.M.; Tomero, E.G.; Balsa, A.; Orte, J.; Laffon, A.; García-Vicuña, R. Baseline serum RANKL levels may serve to predict remission in rheumatoid arthritis patients treated with TNF antagonists. *Ann. Rheum. Dis.* 2007, 66, 1675–1678.

132. Wechalekar M.D., Lester S., Nagpal S., Cole S., Das A., Hissaria P., Crotti T., Spargo L., Walker J.G., Smith M.D., et al. THU0070 RANKL, OPG and OSCAR but not Dkk-1 predict radiographic progression in an inception cohort of seropositive rheumatoid arthritis (RA) treated-to-target with combination conventional DMARD therapy. *Ann. Rheumat. Dis.* 2016;75:204.

133. Montagnana, M.; Lippi, G.; Danese, E.; Guidi, G.C. The role of osteoprotegerin in cardiovascular disease. *Ann. Med.* 2013, 45, 254–264.
134. Dovio, A.; Allasino, B.; Palmas, E.; Ventura, M.; Pia, A.; Saba, L.; Aroasio, E.; Terzolo, M.; Angeli, A. Increased osteoprotegerin levels in Cushing's syndrome are associated with an adverse cardiovascular risk profile. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2007, 92, 1803–1808
135. 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
136. Korkosz M., Gasowski J., Leszczyński P., Pawlak-Buś K., Jeka S., Siedlar M., Grodzicki T. Effect of tumour necrosis factor- α inhibitor on serum level of dickkopf-1 protein and bone morphogenetic protein-7 in ankylosing spondylitis patients with high disease activity. *Scand. J. Rheumatol.* 2014;43:43–48.