

Palma-Sánchez D¹, Haro-Martínez AC¹, Gallardo Muñoz I², Portero de la Torre M², Mayor González M¹, Peñas E¹, Reyes-García R³

1 Unidad de Reumatología

2 Servicio de Radiología

3 Unidad de Endocrinología

Hospital General Universitario Rafael Méndez - Lorca - Murcia (España)

Cambios inducidos en DKK1 en pacientes con artritis reumatoide que inician tratamiento con terapia biológica

Correspondencia: Rebeca Reyes García - Ctra. Nacional 340, Km 589 - 30800 Lorca - Murcia (España)
Correo electrónico: rebeca.reyes.garcia@gmail.com

Fecha de recepción: 08/10/2015

Fecha de aceptación: 06/02/2016

Trabajo premiado con la beca de Investigación Clínica FEIOMM 2013.

Resumen

Introducción: El objetivo del estudio es evaluar la relación entre la carga inflamatoria, el riesgo cardiovascular y el metabolismo óseo en pacientes con artritis reumatoide que inician tratamiento con terapia biológica.

Pacientes y métodos: Se trata de un estudio de cohortes prospectivo realizado en pacientes con diagnóstico de artritis reumatoide (AR) activa evaluados en la Unidad de Reumatología y que inician terapia biológica. Los pacientes serán seleccionados de forma consecutiva. Presentamos los datos preliminares de 14 pacientes.

Resultados: Encontramos una reducción en las concentraciones de Dickkopf-1 (DKK1) tras el inicio de la terapia biológica (basal: $53,12 \pm 60,43$ pg/ml vs. 6 meses $23,2 \pm 13,5$ pg/ml, $p=0,307$) pero no se alcanzó la significación estadística. Se encontraron cambios en los marcadores de remodelado con aumento en los niveles de osteocalcina y CTX que no alcanzó la significación estadística.

Conclusiones: En pacientes con AR activa tratados con terapia biológica hemos observado un descenso no significativo de las concentraciones séricas de DKK1. La ampliación tanto de los sujetos de estudio como de las determinaciones bioquímicas pendientes nos permitirán en un futuro próximo establecer de forma más precisa esta asociación, así como la relación entre DKK1, remodelado óseo, terapia biológica y enfermedad cardiovascular en pacientes con AR.

Palabras clave: *artritis reumatoide, DKK1, terapia biológica.*

Changes induced by DKK1 in rheumatoid arthritis patients who commence biologic therapy treatment

Summary

Introduction: The aim of this study is to assess the relationship among inflammatory charge, cardiovascular risk and bone metabolism in patients with rheumatoid arthritis initiating biological therapy treatment.

Patients and methods: This is a prospective cohort study conducted in patients diagnosed with active rheumatoid arthritis (RA) assessed in the Rheumatology Unit and initiating biological therapy.

Patients will be selected consecutively, with preliminary data on 14 patients. We present preliminary data from 14 patients.

Results: Reduced Dickkopf-1 (DKK1) concentrations after commencing biological therapy were detected (baseline: 53.12 ± 60.43 pg/ml vs 6 months 13.5 ± 23.2 pg/ml, $p=0.307$) but without statistical significance. Changes were found in markers for bone remodeling with increased osteocalcin levels and CTX which were not statistically significant either.

Conclusions: We observed a nonsignificant decrease in DKK1 serum in patients with active RA treated with biologic therapy. Expanding the scope of study subjects and pending biochemical determinations will allow us, in the near future, to establish more precisely this link and the relationship of DKK1, bone remodeling, biological therapy and cardiovascular disease in RA patients.

Key words: *rheumatoid arthritis, DKK1, biological therapy.*

Introducción

La artritis reumatoide (AR) y otras enfermedades reumáticas inflamatorias, como la espondilitis anquilosante y la artritis psoriásica, presentan una mayor mortalidad cardiovascular debida al desarrollo de aterosclerosis acelerada¹. La inflamación crónica persistente así como factores genéticos se han implicado en el desarrollo de la aterosclerosis acelerada y, consecuentemente, de episodios cardiovasculares².

La vía Wnt se ha involucrado no sólo en la alteración del metabolismo óseo³ sino también en la patología cardiovascular^{4,5}, por lo que podría ser el nexo común entre estas enfermedades. La implicación de la artritis reumatoide en esta vía se ha explicado a través de las citoquinas proinflamatorias involucradas en su patogénesis, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), que tiene un papel relevante en el proceso de diferenciación osteoclástica aumentando el ligando del receptor activador del factor nuclear kB (RANKL) así como Dickkopf-1 (DKK1) y esclerostina, ambos inhibidores de la vía Wnt⁶. Por tanto, el control de la actividad en pacientes con AR debería suponer no solo un aumento de la densidad mineral ósea sino también una reducción del riesgo cardiovascular.

El objetivo del estudio es evaluar la relación entre la carga inflamatoria, el riesgo cardiovascular y el metabolismo óseo en pacientes con artritis reumatoide que inician tratamiento con terapia biológica. Para ello se ha analizado la relación entre la actividad inflamatoria, las concentraciones séricas de antagonistas de la vía Wnt (DKK1), la enfermedad cardiovascular determinada por el método SCORE modificado para AR, el grosor íntima-media carotídea y la enfermedad ósea en pacientes con AR, al inicio de tratamiento con

terapia biológica y a los 6 y 12 meses de tratamiento. En el presente trabajo se presentan los datos preliminares del estudio.

Pacientes y métodos

Se trata de un estudio cohortes prospectivo de pacientes con diagnóstico de AR activa evaluados en la Unidad de Reumatología, y que inician terapia biológica. Para el diagnóstico de AR se aplicarán los criterios ACR 1987. Los criterios de inclusión fueron los siguientes: diagnóstico de AR, edad mayor de 18 años, presencia de actividad de la enfermedad (DAS >2,4) a pesar de tratamiento con fármacos modificadores sintéticos de la enfermedad, y firma de consentimiento informado. Se excluyeron pacientes con eventos cardiovasculares previos, fracturas osteoporóticas previas, enfermedad metabólica ósea distinta a osteoporosis, enfermedad renal crónica, hepatopatía crónica, diabetes *mellitus* tipo 1 y 2, enfermedad neoplásica, embarazo y lactancia.

El estudio fue presentado y aceptado por el Comité de Ética para la Investigación Clínica del Hospital General Universitario Rafael Méndez. Todos los participantes fueron informados del tipo de estudio y de sus procedimientos, y proporcionaron su consentimiento informado antes de realizar cualquier procedimiento del estudio. El estudio se diseñó y se realizó de acuerdo a las normas éticas de la declaración de Helsinki.

Se recogieron las siguientes variables: niveles séricos de DKK-1, características sociodemográficas, tensión arterial (TA), DAS-28 con VSG, Escala analógica visual (EVA) de la enfermedad por el paciente medida de 0 a 10, duración de la enfermedad determinada en años, respuesta de la enfermedad al tratamiento valorada mediante respuesta EULAR, valores de

Tabla 1. Características sociodemográficas y clínicas

N	14
Edad, media \pm DE	47,14 \pm 14,06
Mujer, n (%)	9 (64,3)
IMC, media \pm DE	29,89 \pm 7,41
HTA, n (%)	3 (21,4)
DLP, n (%)	3 (21,4)
Toma de alcohol, n (%)	2 (14,3)
Hábito tabáquico, n (%)	9 (64,3)

DE: desviación estándar; IMC: índice de masa corporal; HTA: hipertensión arterial; DLP: dislipemia.

factor reumatoide y anticuerpos antipéptido citrulinado, hemograma, bioquímica general con función hepatorenal, perfil lipídico (colesterol total, HDL, LDL, triglicéridos), proteína C reactiva (PCR), calcio y fosforo sérico, parathormona (PTH), 25-hidroxivitamina D3 (25-OH vitamina D3), marcadores del remodelado óseo (fosfatasa alcalina ósea, osteocalcina, telopéptido C-terminal del colágeno tipo I -CTX-), grosor de la íntima-media carotídea (c-IMT), modelo SCORE (*Systematic Coronary Risk Evaluation*, Evaluación sistemática del riesgo coronario), modelo SCORE modificado para AR, y densidad mineral ósea en columna lumbar y cadera medida mediante absorciometría dual de rayos X (DXA).

Determinaciones bioquímicas

El análisis de parámetros bioquímicos habituales se realizó a través de técnicas estandarizadas.

Las concentraciones de hormonas calciotropas se determinaron por HPLC para 25-OH vitamina D3 y ELECSYS para PTH intacta. Los marcadores bioquímicos de remodelado se determinaron de forma automatizada (Roche Elecsys 2010).

Las concentraciones de DKK1 se evaluaron a través de ELISA (Biomedica Medizinprodukte GmbH and Co. KG, Viena, Austria) según las instrucciones del fabricante. Para el resto de determinaciones bioquímicas pendientes disponemos de muestras congeladas a -80 °C.

Evaluación de densidad mineral ósea

La densidad mineral ósea en columna lumbar y cuello femoral se evaluó a través de densitometría dual de rayos X (DXA) (Norland XR-800).

Para pacientes postmenopáusicas y varones >50 años se utilizó el T-score para clasificar la DXA central en normal, osteopenia y osteoporosis. En el resto de los casos se utilizó la Z-score, considerándose baja masa ósea una Z-score <-2.

Evaluación de c-IMT

La evaluación ultrasonográfica de las arterias carótidas se realizó a través de eco-doppler (Philips iU22) con una sonda lineal de 9-3 MHz. Se valoró el c-IMT y la existencia de placas. El c-IMT se midió en el ter-

cio distal de ambas arterias carótidas primitivas, 1 cm antes del bulbo. La placa se definió como un engrosamiento focal mayor de 0,5 mm dentro de la luz arterial o un engrosamiento >50% del espesor de la íntima adyacente o un grosor de la íntima >1,5 mm.

Evaluación de riesgo cardiovascular

El riesgo cardiovascular de los pacientes se determinó mediante el modelo SCORE y SCORE modificado para AR. Aquellos pacientes que en la ecografía carotídea presentaban placas y/o c-IMT >0,9 se clasifican como pacientes de muy alto riesgo cardiovascular independientemente del SCORE obtenido.

Análisis estadístico

Los datos de variables continuas se expresan como media \pm desviación estándar. Los datos para las variables categóricas se presentan como porcentajes. Los cambios en las variables cuantitativas antes y después del tratamiento se han comparado con el test de Student para muestras apareadas. Las variables categóricas se han comparado a través del test χ^2 .

Los análisis de correlación se han realizado mediante la correlación de Pearson (distribución normal) o de Spearman (distribución no normal). Los valores de P<0,05 se han considerado significativos. Para el análisis estadístico se ha utilizado el programa SPSS, versión 18.0, software (SPSS, Chicago, IL).

Resultados

Hasta septiembre de 2015 se han incluido 14 pacientes *naives* a terapia biológica. En este artículo presentamos los resultados a 6 meses.

Variables demográficas-clínicas

La edad media de los 14 pacientes fue de 47 \pm 14 años. El 64,3% fueron mujeres. El 21,4% de los pacientes incluidos eran hipertensos y el 64,3% eran fumadores. Los valores del resto de variables se muestran en la tabla 1.

Variables relacionadas con la enfermedad

La duración media de la enfermedad fue de 68 \pm 71 meses (IC 10-240). El DAS 28-VSG basal medio fue de 4,41 \pm 1, el número de articulaciones tumefactas medio de 3 \pm 2, el número de articulaciones dolorosas medio de 4 \pm 3 y la escala visual analógica (EVA) de la enfermedad determinada por el paciente de 7 \pm 2.

El 71,5% presentaron factor reumatoide positivo y anticuerpos antipéptido citrulinado. El 64,3% de los pacientes incluidos en el estudio tomaban fármacos modificadores de la enfermedad (FAMES) asociados a la terapia biológica. La dosis media de prednisona fue de 3,7 \pm 2,5 mg.

Sólo el 44,4% de los pacientes presentaron respuesta EULAR al tratamiento a los 6 meses.

Variables analíticas y relacionadas con el metabolismo óseo

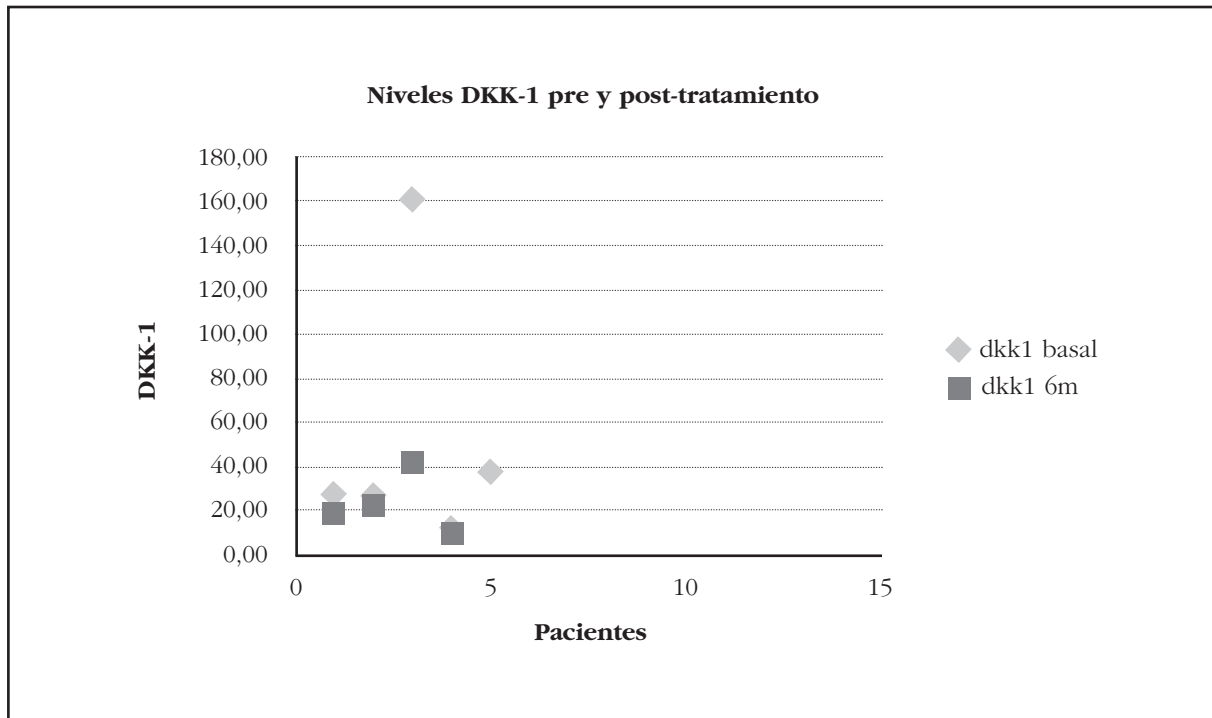
Los valores de estas variables se representan en la tabla 2.

Tabla 2. Variables bioquímicas y relacionadas con el metabolismo óseo, actividad de la enfermedad y riesgo cardiovascular basal y a los 6 meses

	Basal (N=14)	6 meses (N= 9)
Colesterol total (mg/dl), media \pm DE	198,85 \pm 37,09	195 \pm 55,91
HDL-colesterol (mg/dl), media \pm DE	62,71 \pm 24,32	52 \pm 24,06
LDL- colesterol (mg/dl), media \pm DE	129,57 \pm 34,24	138 \pm 59,07
Triglicéridos (mg/dl), media \pm DE	117,85 \pm 43,95	154 \pm 76,80
PCR (mg/L), media \pm DE	8,62 \pm 10,50	6,66 \pm 9,34
PTH-i (pg/ml), media \pm DE	37,85 \pm 12,76	52,01 \pm 14,88
25-OH vitamina D (ng/dl), media \pm DE	18,70 \pm 6,89	28,40 \pm 19,51
FAO (μ g/dl), media \pm DE	11,82 \pm 4,20	11,50 \pm 4,13
Osteocalcina (ng/ml), media \pm DE	13,73 \pm 6,75	19,27 \pm 11,54
CTX (ng/ml), media \pm DE	0,26 \pm 0,11	0,37 \pm 0,21
DXA central		
- Normal, n (%)	11 (78,6)	
- Osteopenia, n (%)	0 (0)	
- Osteoporosis, n (%)	1 (7,1)	
DAS 28-VSG, media \pm DE	4,41 \pm 0,99	3,38 \pm 1,51
EVA-enfermedad, media \pm DE	7 \pm 2	3,66 \pm 2,82
SCORE		
- Bajo, n (%)	6 (42,9)	5 (55,6)
- Moderado, n (%)	8 (57,1)	3 (33,3)
- Alto, n (%)	0 (0)	1 (11,1)
- Muy alto, n (%)	0 (0)	0 (0)
SCORE modificado		
- Bajo, n (%)	6 (42,9)	5 (55,6)
- Moderado, n (%)	6 (42,9)	2 (22,2)
- Alto, n (%)	2 (14,3)	1 (11,1)
- Muy alto, n (%)	0 (0)	1 (11,1)
SCORE-ecografía		
- Bajo, n (%)	5 (35,7)	5 (55,6)
- Moderado, n (%)	1 (7,1)	2 (22,2)
- Alto, n (%)	1 (7,1)	1 (11,1)
- Muy alto, n (%)	7 (50)	1 (11,1)
c-IMT derecha (mm), media \pm DE	0,54 \pm 0,18	0,51 \pm 0,10
c-IMT izquierda (mm), media \pm DE	0,64 \pm 0,20	0,49 \pm 0,08
Placas carotideas, n (%)	7 (50)	2 (25)

DE: desviación estándar; PCR: proteína C reactiva; FAO: fosfatasa alcalina ósea; CTX: telopéptido C-terminal del colágeno tipo I; c-IMT: grosor íntima-media carotídea.

Figura 1. Cambios en las concentraciones de DKK1 tras el tratamiento biológico



Correlación entre remodelado óseo, DKK1, actividad de la enfermedad y c-IMT

No se encontró correlación significativa entre la actividad de la enfermedad medida mediante DAS 28-VSG y los niveles de fosfatasa alcalina, osteocalcina, CTX o DKK1. Tampoco observamos ninguna relación entre los marcadores de remodelado o las concentraciones de DKK1 y el grosor de la íntima media.

No encontramos asociación entre la actividad de la enfermedad medida por DAS 28-VSG y el riesgo cardiovascular evaluado mediante SCORE y SCORE modificado.

Cambios en DKK1 tras el tratamiento y relación con parámetros de la enfermedad

Encontramos disminución en los niveles de DKK1 tras el inicio de la terapia biológica (basal: $53,12 \pm 60,43$ pg/ml vs. 6 meses $23,2 \pm 13,5$ pg/ml, $p=0,307$) que no alcanzó significación estadística (Figura 1). No encontramos asociación estadísticamente significativa entre la disminución de los niveles de DKK-1 y respuesta EULAR de la enfermedad al tratamiento. En cuanto a los marcadores de remodelado óseo, se detectó un aumento en los niveles de osteocalcina y CTX que no alcanzó la significación estadística.

Discusión

Diferentes estudios epidemiológicos han demostrado una asociación entre la pérdida de densidad mineral ósea, la calcificación vascular y la morbimortalidad cardiovascular⁷⁻⁹. La vía Wnt está implicada en la regulación de la calcificación vascular y en la diferenciación de las células musculares lisas a osteoblastos¹⁰. Se ha demostrado un aumento en

la expresión de DKK1 en placas ateroscleróticas carotídeas^{11,12} así como un aumento de las concentraciones séricas de esclerostina en pacientes con enfermedad aterosclerótica y diabetes tipo 2¹⁵.

Por otra parte, en pacientes con AR se han demostrado niveles circulantes de DKK1 elevados que se han relacionado con daño radiológico¹⁴⁻¹⁸, y la expresión de esclerostina parece correlacionarse de manera positiva con los niveles de DKK1¹⁹.

Nuestro estudio mostró una disminución en los niveles de DKK-1 a los 6 meses de tratamiento, lo que está en concordancia con lo publicado recientemente por Briot y cols.²⁰. En este artículo, los pacientes con AR activa tratados con tocilizumab experimentaron un descenso de las concentraciones de DKK1 así como un descenso de los marcadores de formación. Sin embargo, en nuestro estudio encontramos un aumento en los marcadores de formación y de resorción post-tratamiento, aunque no alcanzó significación estadística. Nuestro limitado tamaño muestral sin duda ha influido en nuestros resultados.

Como conclusión, podemos decir que en pacientes con AR activa tratados con terapia biológica hemos observado un descenso no significativo de las concentraciones séricas de DKK1 y un aumento significativo de la resorción. La ampliación tanto de los sujetos de estudio como de las determinaciones bioquímicas pendientes nos permitirán en un futuro próximo establecer de forma más precisa esta asociación, así como la relación entre DKK1, remodelado óseo, terapia biológica y enfermedad cardiovascular en pacientes con AR.

Conflicto de intereses: los autores declaran no tener conflictos de intereses en relación con este artículo.

Bibliografía

1. González-Gay M, González-Juanatey C, Martín J. Rheumatoid arthritis: A disease associated with accelerated atherogenesis. *Semin Arthritis Rheum* 2005;35:8-17.
2. González-Gay M, González-Juanatey C, López-Díaz MJ, Piñeiro A, García-Porrua C, Miranda-Fillooy JA, et al. HLA-DRB1 and persistent chronic inflammation contribute to cardiovascular events and cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2007;57:125-32.
3. Baron R, Rawadi G. Targeting the Wnt/beta-catenin pathway to regulate bone formation in the adult skeleton. *Endocrinology* 2007;148:2635-43.
4. Towler DA, Shao JS, Cheng SL, Pingsterhaus JM, Loewy OP. Osteogenic regulation of vascular calcification. *Ann NY Acad Sci* 2006;1068:327-33.
5. Shao JS, Cheng SL, Pingsterhaus JM, Charlton-Kachigian N, Loewy OP, Towler DA. Msx2 promotes cardiovascular calcification by activating paracrine Wnt signals. *J Clin Invest* 2005;115:1210-20.
6. Walsh C, Gravallese EM. Bone loss in inflammatory arthritis: mechanisms and treatment strategies. *Curr Opin Rheumatol* 2004;16:419-27.
7. Tanko LB, Christiansen C, Cox DA, Geiger MJ, Mc Nabb MA, Cummings SR. Relationship between osteoporosis and cardiovascular disease in postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 2005;20:1912-20.
8. Hyder JA, Allison MA, Wong N, Papa A, Lang TF, Sirlin C, et al. Association of coronary artery and aortic calcium with lumbar bone density: the MESA Abdominal Aortic Calcium Study. *Am J Epidemiol* 2009;169:186-94.
9. Naves M, Rodriguez-Garcia M, Diaz-Lopez JB, Gomez-Alonso C, Cannata-Andia JB. Progression of vascular calcifications is associated with greater bone loss and increased bone fractures. *Osteopor Int* 2008;19:1161-6.
10. Tsaousi A, Mill C, George SJ. The Wnt pathways in vascular disease: lesson from vascular development. *Curr Opin Lipidol* 2011;22(5):350-7.
11. Towler DA, Shao JS, Cheng SL, Pingsterhaus JM, Loewy AP. Osteogenic regulation of vascular calcification. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1068:327-33.
12. Ueland T, Otterdal K, Lekva T, et al. Dickkopf-1 enhances inflammatory interaction between platelets and endothelial cells and shows increased expression in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:1228-34.
13. Morales-Santana S, García-Fontana B, García-Martín A, Rozas-Moreno P, García-Salcedo JA, Reyes-García R, Muñoz-Torres M. Atherosclerotic disease in type 2 diabetes is associated with an increase in sclerostin levels. *Diabetes Care* 2013;36:1667-74.
14. Voorzanger-Rousselot N, Ben-Tabassi NC, Garnero P. Opposite relationships between circulating DKK1 and cartilage breakdown in patients with rheumatoid arthritis and knee osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2009;68:1513-4.
15. Diarra D, Stolina M, Polzer K, Zwerina J, Ominsky MS, Dwyer D, et al. Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat Med* 2007;13:156-63.
16. Wang SY, Liu YY, Ye H, Guo JP, Li R, Liu X, et al. Circulation Dickkopf-1 is correlated with bone erosion and inflammation in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2011;38:821-7.
17. Liu YY, Long L, Wang SY, Guo JP, Ye H, Cui LF, et al. Circulation Dickkopf-1 and osteoprotegerin in patients with early and longstanding rheumatoid arthritis. *Chin Med J (Eng)* 2010;123:1407-12.
18. Garnero P, Tabassi NC, Voorzanger-Rousselot N. Circulating dickkopf-1 and radiological progression in patients with early rheumatoid arthritis treated with etanercept. *J Rheumatol* 2008;35:2313-15.
19. Heiland GR, Zwerina K, Baum W, Kireva T, Distler JH, Grisanti M, et al. Neutralisation of DKK1 protects from systemic bone loss during inflammation and reduces sclerostin expression. *Ann Rheum Dis* 2010;69:2152-9.
20. Briot K, Rouanet S, Schaefferbeke T, Etchepare F, Gaudin P, Perdriger A, et al. The effect of tocilizumab on bone mineral density, serum levels of Dickkopf-1 and bone remodeling markers in patients with rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 2015;82:109-15.