



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Medicina

**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE MEDICHE CLINICHE E SPERIMENTALI**

Indirizzo: Scienze Reumatologiche

XXIV ciclo

STUDIO DEI BIOMARCATORI DELLA SINOVITE

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. GAETANO THIENE

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. LEONARDO PUNZI

Supervisore :Ch.mo Prof. UGO FIOCCO

Dottoranda: Dott.ssa BEATRICE MOLENA

INDICE

ABBREVIAZIONI	III
RIASSUNTO	1
SUMMARY	3
INTRODUZIONE	5
Le Sinoviti.....	5
I Biomarcatori.....	9
I biomarcatori sinoviali.....	10
Le patologie studiate.....	11
SCOPO	13
MATERIALI E METODI	15
Pazienti e Controlli.....	15
Valutazione dei livelli di citochine e chemochine nel LS.....	19
Biopsie Sinoviali.....	20
Immunoistochimica.....	20
Estrazione dell'RNA totale.....	20
Real Time PCR.....	20
Preparazione del campione cellulare.....	22
Conta totale dei leucociti.....	22
Conta differenziale dei leucociti.....	22
Separazione dei linfomonociti da sangue periferico e liquido sinoviale.....	23
Analisi Citofluorimetrica.....	24
Analisi Statistica.....	25
RISULTATI	27
Valutazione dei Biomarcatori Sinoviali in Risposta al Trattamento IntraArticolare con anti-TNF α in pazienti affetti da AP: analisi biochimica e immunocitochimica	27
Valutazione dei Biomarcatori Sinoviali in Risposta al Trattamento IntraArticolare con anti-TNF α in pazienti affetti da Sinovite Villonodulare Pigmentosa Diffusa: analisi biochimica e immunoistochimica.....	32

Espressione del CSF-1 nella Sinovite Villonodulare Pigmentosa Diffusa: analisi biomolecolare.....	34
Espressione delle frazioni cellulari Treg e TH17 nella Sinovite Psoriasica: analisi fenotipica.....	35
DISCUSSIONE.....	39
CONCLUSIONI.....	43
BIBLIOGRAFIA.....	45

ABBREVIAZIONI

AP: artrite psoriasica

AR: artrite reumatoide

CD: cluster differentiation

CSF-1: colony-stimulating factor-1

DAS: disease activity score

E: etanercept

GAPDH: gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi

HAQ: health assessment questionnaire

IL-: interleukin-

INF γ : interferone γ

KJAI: knee joint articular index (range 0 - 14)

LS: liquido sinoviale

MCP1: monocyte chemotactic protein-1

MIP1- α : macrophage inflammatory protein 1 alpha

MIP1- β : macrophage inflammatory protein 1 beta

mRAI: modified Ritchie articular index

mRNA: RNA messaggero

MS: membrana sinoviale

PCR: C-reactive protein(norm<10)

PVNS: sinovite villonodulare pigmentosa diffusa

real time PCR: reazione a catena della polimerasi in tempo reale

RNA: acido ribonucleico

SP: sangue periferico

TH17: linfociti T helper 17

THOMP: Thompson (range 0 - 9)

TNF α : fattore di necrosi tumorale α

Treg: linfociti T regolatori

UNG: uracil N-glicosilasi

VES: erythrocyte sedimentation rate (norm 0–20 mm/hr)

RIASSUNTO

Introduzione: Le sinoviti sono infiammazioni croniche che riguardano tutte le artriti infiammatorie primitive. Spesso resistenti al trattamento farmacologico tradizionale ed alla terapia locale, se non curate, si dimostrano irreversibili.

Scopo dello studio: Individuare biomarcatori utili a determinare il grado di attività di malattia, le risposte ai trattamenti e chiarire i meccanismi coinvolti nel mantenimento della sinovite al fine di poterli considerare nuovi possibili bersagli terapeutici per questa grave patologia.

Materiali e metodi: Campioni di liquido sinoviale (LS), tessuto sinoviale (TS) e/o sangue periferico (SP) sono stati ottenuti da pazienti affetti da artrite psoriasica (AP) e sinovite villonodulare pigmentosa diffusa (PVNS). Sono stati valutati gli indici di attività di malattia locali: knee Thompson articular index (THOMP: range 0 -9), Knee Joint Articular Index (KJAI: range 0 - 14) e sistemici: velocità di eritrosedimentazione (VES: norm 0–20 mm/hr), proteina C-reattiva (PCR: norm<10), e sono stati misurati i livelli di citochine/chemochine nel LS prima e dopo trattamento intra-articolare (IA) con anti-TNF α (E). La caratterizzazione dell'infiltrato cellulare sinoviale e dei vasi sinoviali e la valutazione dell'espressione di frazioni cellulari ad attività funzionale opposta (Treg e TH17) è stata ottenuta marcando con opportuni anticorpi sezioni seriali di biopsie sinoviali e cellule mononucleate separate da SP e LS rispettivamente.

Tutte le analisi sono state eseguite mediante l'utilizzo di tecniche di citofluorimetria, di biologia cellulare e molecolare e di immunistochimica e i dati raccolti dai gruppi di pazienti sono stati confrontati con quelli raccolti da opportuni gruppi di controllo.

Risultati: Abbiamo dimostrato che nell'AP i biomarcatori del liquido sinoviale correlano con l'infiammazione del tessuto sinoviale e gli indici sistemici di attività di malattia e che in risposta al trattamento IA con anti-TNF α il versamento sinoviale e i biomarcatori del liquido e del tessuto sinoviale sono significativamente ridotti rispetto ai livelli basali. Nella PVNS le iniezioni IA hanno portato ad un effettivo miglioramento degli indici locali di attività di malattia e ad una riduzione

delle alterazioni immunoistologiche. Lo studio di espressione del CSF-1 ha evidenziato che esso è maggiormente espresso nelle sinoviti villonodulari rispetto alle sinoviti infiammatorie croniche.

La valutazione dei profili fenotipici delle frazioni cellulari Treg e TH17 nei pazienti affetti da AP ha mostrato che sia a livello sistemico che locale l'equilibrio tra le due frazioni è significativamente spostato verso il fenotipo proinfiammatorio TH17 e che vi sono correlazioni tra l'espressione di alcuni marcatori a livello locale e sistemico.

Conclusioni: La regressione del versamento sinoviale è un indicatore reale della risposta ai farmaci bloccanti il TNF α nei pazienti affetti da AP ed è confermata dalle correlazioni tra i biomarcatori del LS con l'attività di malattia e l'infiammazione del tessuto sinoviale. Le alterazioni conseguenti al trattamento indicano che specifici marcatori sinoviali studiati (CD45+, CD31+, IL-1 β ; IL-6) possano rappresentare potenziali biomarcatori sinoviali della risposta al trattamento con tali farmaci. Il nuovo approccio terapeutico IA anti TNF α nel trattamento della PVNS ha portato ad una rapida regressione della fibrosi e della vasculogenesi. Inoltre si è dimostrato inefficace nel ridurre l'espressione del CSF-1. I più alti livelli di espressione dell'mRNA-CSF-1 riscontrati nella PVNS suggeriscono che il CSF-1 svolge un ruolo chiave nello sviluppo della malattia e che l'interazione tra CSF-1/CSF-1R possa rappresentare un potenziale bersaglio terapeutico per la sinovite villonodulare.

L'elevata espressione della frazione cellulare TH17 rispetto alla frazione Treg riscontrata sia nel liquido sinoviale che nel sangue periferico dei pazienti affetti da AP ci permette di pensare a specifici bersagli molecolari per lo sviluppo di nuovi composti capaci sia di inibire la risposta effettrice, per esempio prevenendo l'attivazione antigene-specifica delle cellule TH17, sia di aumentare quella regolatoria, per esempio inducendo il differenziamento delle cellule Treg.

SUMMARY

Introduction: Synovitis is a chronic inflammation concerning all early inflammatory arthritis. It is often resistant to standard pharmacological treatment and local therapy, and if not treated, the process becomes irreversible.

Aim of the study: To identify biomarkers useful to determine the disease activity level, to evaluate the responses to therapies and to delineate the mechanisms involved in the synovitis process, in order to find new potential therapeutic targets for this severe disease.

Methods: Synovial fluid (SF), synovial tissue (ST) and/or peripheral blood (PB) samples were obtained from patients affected by psoriatic arthritis (PsA) and pigmented villonodular synovitis (PVNS). Local and systemic disease activity indexes: knee Thompson articular index (THOMP: range 0-9), Knee Joint Articular Index (KJAI: range 0-14), erythrocytes sedimentation rate (ERS: norm 0-20 mm/hr), C-reactive protein (CRP: norm <10), and SF cytokine/chemokine expression levels were measured before and after IA TNF α blockade. Characterization of synovial mononuclear cell infiltration and synovial vessels, and the evaluation of the different cellular subset expression (T regulatory and Thelper 17 cells) was carried out in consecutive serial sections obtained from synovial biopsies or in mononuclear cells obtained from SF or PB. Proper antibodies were used for immunostaining.

Analysis were carried out by cellular and molecular biology techniques, cytofluorimetry and immunohistochemistry. Data obtained from the patients were compared to data obtained from proper control groups.

Results: SF biomarkers correlate with synovial tissue inflammation and with local and systemic indexes of disease activity in PsA. The IA TNF α blockade lead to a synovial effusion regression and a ST and SF biomarkers significant reduction compared to baseline. In PVNS affected patients, knee injections lead to a reduction in local indexes of disease activity and in immunohistological

alterations. We detected higher CSF-1mRNA expression level in PVNS compared to chronic inflammatory synovitis.

The evaluation of Treg and TH17 subset cells phenotype in PsA affected patients showed an increased expression of TH17 cells both at local and systemic level. Moreover, we found some correlations between cell markers both at local and systemic level.

Conclusions: Synovial effusion regression is a reliable indicator of the response to IA TNF α blockers in PsA patients and it is confirmed by the correlation between SF biomarkers to disease activity and synovial tissue inflammation. Changes following IA treatment, indicate that ST CD45⁺ MNC and CD31⁺ vessels, along with SF IL-6 and -IL-1 β , may represent candidate biomarkers of the knee synovitis response to IA TNF- α blockade.

The new therapeutic approach concerning serial intraarticular anti-TNF- α injections in pigmented villonodular synovitis resulted in a local clinical improvement accompanied by a rapid regression in synovial stromal fibrosis and vasculogenesis. Moreover, it was ineffective in reducing synovial CSF-1 expression. The detection of higher level of colony-stimulating factor-1 (CSF-1) in synovial tissue of pigmented villonodular synovitis (PVNS) suggests that CSF-1 play an important role in PVNS disease process and supports the idea that CSF-1/CSF-1R interaction may represent a potential therapeutic target of this disease.

The higher expression of TH17 cells in contrast to the lower expression of Treg cells detected in the SF and PB of PsA patients, highlights new specific molecular targets for the development of different pharmacological approaches able to inhibit the effector response, preventing TH17 activity, or enhancing the regulatory response, inducing the differentiation of Treg cells.

INTRODUZIONE

LE SINOVITI

Le sinoviti sono infiammazioni croniche, proliferative, che interessano le articolazioni diartrodiali, coinvolgono la *membrana sinoviale* (MS) ma si possono estendere anche alla cartilagine e ai tendini. Causa di sinovite possono essere traumi, infezioni, malattie croniche come proliferazioni tumorali, o patologie autoimmunitarie come le malattie reumatiche.

In generale le sinoviti infiammatorie riguardano tutti i processi classificati come artriti infiammatorie primitive, non associate cioè ad altre malattie. Spesso resistenti al trattamento farmacologico tradizionale ed alla terapia locale (1-5), se non curate si dimostrano irreversibili.

La sinovite è caratterizzata da tre diversi aspetti patologici: essudazione, infiltrazione e proliferazione cellulare (6).

L'essudazione è dovuta alla congestione vasale, fenomeno tipico dell'infiammazione in fase acuta, e causa l'accumulo di liquidi e proteine nel contesto della membrana sinoviale.

L'infiltrazione cellulare, rappresentata soprattutto da plasmacellule e linfociti sia T che B, è regolata da una serie di mediatori e inibitori (molecole di superficie, citochine, chemochine, microRNA...) a loro volta rilasciati dalle cellule immunitarie (7, 8).

La proliferazione cellulare avviene a carico dei vasi (neoangiogenesi), delle cellule sinoviali e dei fibroblasti contenuti nella membrana sinoviale. Questo porta ad una grave alterazione anatomica dell'articolazione con formazione del "panno sinoviale" (Fig. 1) in cui gli strati cellulari che compongono la membrana sinoviale non sono più 1-4 come in condizioni normali, ma possono arrivare anche a centinaia.

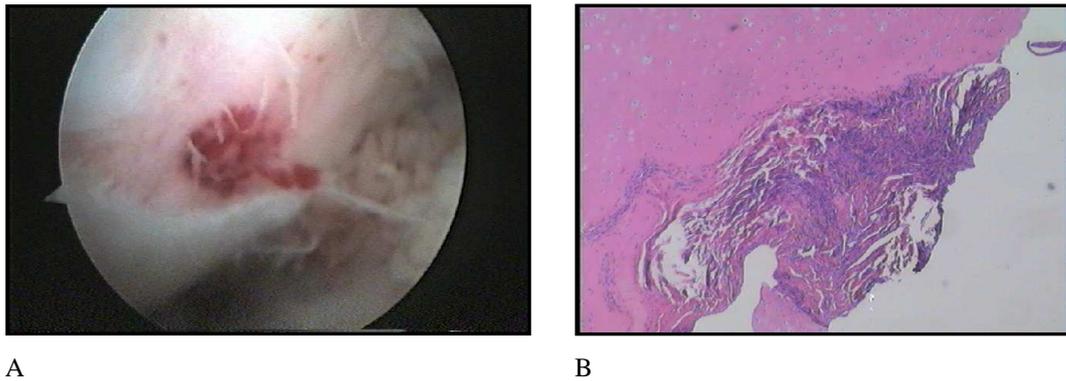


Figura 1: Alterazione anatomica della membrana sinoviale in artroscopia (A) e all'esame istologico (B)

L'iperplasia della membrana sinoviale è supportata dalla neoangiogenesi e dall'accumulo di infiltrati cellulari che in modo selettivo arrivano dal circolo nel *liquido sinoviale* (LS).

La neoangiogenesi gioca un ruolo chiave nella patogenesi della sinovite, sin dalle prime fasi della malattia. L'aumento della vascolarizzazione sembra essere la conseguenza della proliferazione delle cellule endoteliali stimulate da molecole ad attività angiogenetica quali il vascular endothelial growth factor (VEGF) prodotto da fibroblasti, macrofagi e linfociti presenti nella sinovia ipertrofica e dalle angiopoietine 1 e 2 (Ang 1 e 2), che sono prodotte in risposta all'aumento di citochine infiammatorie come il $TNF\alpha$. (7).

Fibroblasti, sinoviociti e linfociti producono numerose citochine (tra le quali $IL-1\beta$ e $TNF\alpha$) alle quali è legata in modo particolare l'attività locale di malattia e che agiscono in sinergismo sugli stessi fibroblasti e sulle cellule sinoviali.

Molti studi infatti evidenziano che i livelli di molte citochine/chemochine sono aumentati nelle articolazioni di pazienti affetti da artrite reumatoide (AR), artrite psoriasica (AP), spondiloartrite (SpA) e sinovite villonodulare pigmentosa (PVNS). (9-14).

Fra le citochine proinfiammatorie il $TNF\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$ e $IL-8$ sono quelle maggiormente implicate nella neoangiogenesi sinoviale.

L'IL-1 β ed il TNF α inducono l'espressione di molecole di adesione sulla membrana delle cellule endoteliali favorendo l'accumulo dei neutrofilo nella fase iniziale della sinovite.

IL-1 β stimola la proliferazione di fibroblasti e cellule sinoviali, evento favorito anche dalla neoangiogenesi, e induce i linfociti T-helper a produrre IL-2. Il TNF α induce la produzione di IL-1 β , chemochine e la liberazione di prostaglandine (PG) e di metalloproteasi. Le metalloproteasi sono in grado di distruggere la matrice proteica della cartilagine articolare e dell'osso subcondrale, mentre PGE₂ e IL-1 β esercitano un'azione osteopenizzante subcondrale e sistemica.

Prodotta da monociti, macrofagi e linfociti, l'IL-6 stimola il differenziamento dei linfociti B, la proliferazione e il differenziamento dei linfociti T-citotossici ed è in grado di down-regolare la produzione di TNF α e IL-1 β .

L'IL-8, capostipite della famiglia delle chemochine, è coinvolta nel processo di chemiotassi e migrazione transetoteliale dei leucociti (15).

Nel processo della sinovite un ruolo chiave è attribuito all'autoimmunità, perciò i meccanismi responsabili della tolleranza immunologica, intesa come la capacità del sistema immunitario di distinguere tra antigeni self e non, giocano un ruolo fondamentale nello sviluppo di questa malattia. La risposta immunitaria coinvolta è quella mediata dai linfociti T, in particolare linfociti TCD4⁺ che comprendono una serie di sotto-frazioni cellulari ad attività regolatoria capaci di attivare o sopprimere la risposta anticorpale e di controllare la proliferazione di cellule effettrici (16).

Due distinte frazioni cellulari, con funzione opposta, sono responsabili dell'equilibrio tra tolleranza e infiammazione e orchestrano la complessa rete di interazioni tra i mediatori nell'ambiente sinoviale (17).

Le prime sono cellule ad azione soppressiva in grado di sopprimere le risposte immuni inibendo la produzione di IL-2 e inducendo l'arresto del ciclo cellulare in cellule TCD4⁺ e CD8⁺ mediante un meccanismo contatto dipendente. Dette T regolatorie (Treg), sono un sottogruppo dei linfociti T

helper CD4⁺ caratterizzato dall'espressione del recettore α dell'IL-2 (CD25), dal fattore di trascrizione nucleare Foxp3 che regola la soppressione mediata da queste cellule, da una bassa o assente espressione del recettore dell'IL-7 (CD127) e dall'espressione del CTLA-4 antagonista della molecola costimolatoria CD28 (18) (Fig. 2).

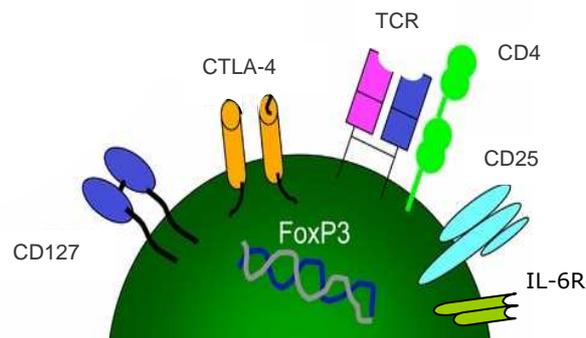


Figura 2: Rappresentazione di un linfocita Treg (modificato da: Dwyer KM *et al.*, Purinergic Signal. 2007)

Per contro, le cellule TH17, di recente scoperta, sono cellule altamente proinfiammatorie che esplicano la loro azione mediante la secrezione di citochine (in particolare IL-17 e IL-22) che a loro volta inducono la produzione di altre citochine e chemochine proinfiammatorie.

Sono anch'esse un sottogruppo dei linfociti T helper CD4⁺ caratterizzato dall'espressione del recettore dell'IL-23 (IL-23R), citochina necessaria alla loro sopravvivenza e al mantenimento del fenotipo proinfiammatorio, dall'espressione della citochina intracitoplasmatica IL-17 e dal fattore di trascrizione RORc responsabile della produzione di IL-17 (19, 20) (Fig. 3).

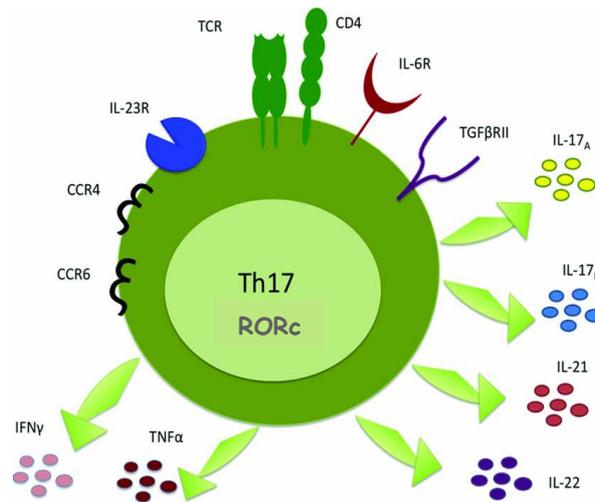


Figura 3: Rappresentazione di un linfocita Thelper17 (modificato da: www.clinsci.org)

E' noto che questi mediatori, sia chimici che cellulari, giocano un ruolo fondamentale nei processi che causano infiammazione, danno articolare, e nelle patologie associate a infiammazione e a proliferazione sinoviale e alcuni di essi sono già stati individuati come *biomarcatori* sia cellulari che tessutali nello sviluppo delle sinoviti (21).

I BIOMARCATORI

In seguito al successo riscontrato dai farmaci bloccanti il TNF- α nel trattamento dell' artrite reumatoide (22), altre molecole/mediatori possono essere oggi considerate come bersagli terapeutici alternativi o come biomarcatori predittivi di malattia.

L' Istituto Nazionale di Sanità Americano (US National Institutes of Health NIH) ha classificato i biomarcatori in 3 categorie:

- Tipo 0: marcatori del decorso naturale di malattia che correlano longitudinalmente con gli indici clinici conosciuti, cioè i sintomi, durante tutti gli stadi di malattia.
- Tipo I: marcatori che interagiscono con il meccanismo d'azione del farmaco sebbene non sia riconosciuto che tale meccanismo sia associato all'esito di malattia.

- Tipo II: marcatori le cui variazioni apportano benefici clinici. Questi marcatori devono essere attinenti al meccanismo d'azione del farmaco e alla fisiopatologia della malattia, per questo sono molto più difficili da sviluppare rispetto al Tipo 0 o Tipo I (23).

I biomarcatori sono importanti nella pratica clinica perchè permettono una valutazione quantitativa della diagnosi, dei processi di malattia e della risposta al trattamento. Sono utili nella scelta di terapie e dosaggi dei farmaci appropriati per minimizzare gli effetti collaterali, la tossicità e sono utili per monitorare l'esito della malattia.

I biomarcatori sinoviali

I biomarcatori sinoviali si possono determinare sia nel liquido sinoviale che nella membrana sinoviale.

Nel primo caso si tratta principalmente di citochine e altri mediatori chimici dell'infiammazione tra cui il TNF α , che induce il differenziamento degli osteoclasti portando all'erosione dell'osso e alla produzione di IL-6, IL-1 β e altre citochine proinfiammatorie (quali INF γ , IL-12, IL-15, IL-17, IL-18) la cui espressione può aumentare nell'ambiente sinoviale nel corso della malattia e che quindi si possono trovare alterati nel LS.

I biomarcatori della MS sono rappresentati da diverse molecole di superficie specifiche di una linea differenziativa cellulare catalogate, sin dai primi anni '80, secondo una nomenclatura unificata in gruppi di differenziamento CD "cluster differentiation". Ogni CD seguito da un numero arabo definisce una molecola di superficie, riconosciuta da almeno due anticorpi monoclonali, anche se rivolti a determinanti diversi della stessa struttura (7). La variazione di alcune di queste molecole di superficie a livello della membrana sinoviale è indice di alterazioni vascolari della sinovia, come il CD31 per la vascolarizzazione, il CD105 per i vasi neoformati, il CD45 per il numero di cellule infiammatorie, e il CD3 e il CD68 marcatori dello spessore del lining.

Altro biomarcatore della membrana sinoviale è il CSF-1 (Fattore di crescita Stimolante le Colonie di monociti-macrofagi) che oltre a causare infiammazione in diversi tipi di artriti, ha un ruolo importante nella proliferazione delle cellule sinoviali. In sinergia al TNF α induce la proliferazione dei monociti/macrofagi e il differenziamento dei fagociti mononucleati (24, 25), regola l'osteoclastogenesi ed induce il trasferimento delle cellule progenitrici endoteliali dal midollo osseo al sangue periferico. Agisce attraverso il recettore tirosin-chinasico di classe III CSF-1R espresso prevalentemente sui fagociti mononucleati (26, 27).

Il “*compartimento sinoviale*”, composto da un lato dalla membrana sinoviale che è il vero e proprio organo bersaglio, dall'altro dal liquido sinoviale, la cui produzione ed il cui manenimento dipendono dalle caratteristiche della membrana sinoviale, si presta quindi bene ad essere esplorato per la ricerca di marcatori che ci aiutino a valutare il grado di attività di malattia, le risposte ai trattamenti farmacologici e per chiarire alcuni aspetti della patogenesi di questa malattia.

LE PATOLOGIE STUDIATE

In questo progetto di tesi sono state studiate sinoviti croniche infiammatorie primitive e sinoviti croniche proliferative con impegno periferico articolare; in particolare:

- Artrite Psoriasica (AP), artropatia cronica infiammatoria associata a psoriasi la cui manifestazione la precede nell'80% dei casi. Normalmente colpisce solo alcune articolazioni periferiche, ma può interessare anche la colonna e le entesi. Manifestazioni cliniche distintive dell'AP sono una prevalente distribuzione asimmetrica dell'infiammazione

articolare, l'interessamento delle articolazioni interfalangee distali, entesite, sacroileite e psoriasi.

Dal punto di vista anatomopatologico si riscontra iperplasia della membrana sinoviale, ipervascolarizzazione e un ricco infiltrato infiammatorio costituito principalmente di linfociti T attivati (28). L'espansione oligoclonale di linfociti T è stata infatti dimostrata sia nella cute che nella membrana sinoviale (29) di pazienti affetti da AP.

Il profilo citochinico rilevato nel liquido e nella membrana sinoviale è dominato da citochine derivanti da monociti e linfociti T quali IL-1 β , IL-2, IL-10, IFN- γ e TNF- α (30, 31).

- Sinovite villonodulare pigmentosa diffusa (PVNS), rara e aggressiva patologia della membrana sinoviale, dal carattere infiltrante, che colpisce prevalentemente le grandi articolazioni in pazienti di giovane età (32, 33).

Dal punto di vista istologico è caratterizzata da istiociti e cellule multinucleate giganti simil-sinoviali, infiltrato linfocitario e macrofagi dal contenuto ricco in lipidi.

La natura infiammatoria di questa patologia. è suggerita dall'espressione di marcatori immunoistochimici in aree della membrana sinoviale contenenti monociti/macrofagi quali CD68, CD163, CD55, metalloproteasi della matrice -2-9 (MMP2-9), CSF-1, CSF-1R, il ligando del recettore dell'attivatore del fattore nucleare kB (RANKL), tipici dei macrofagi attivati, e dall'espressione di marcatori fenotipici delle cellule giganti multinucleate quali RANKL, CSF-1R, CD33, CD31, il recettore della calcitonina e la fosfatasi acida tartrato resistente (TRAP), caratteristici marcatori degli osteoclasti. (34, 35).

L'origine neoplastica della malattia è stata confermata dall'identificazione di aneuploidia, di aberrazione clonale del cariotipo e da intensa attività telomerasica (36, 37). Più di recente è inoltre stata identificata una traslocazione cromosomica che interessa il locus genico del CSF-1 e del collagene VI alpha-3 (COL6A3) (38).

SCOPO DELLO STUDIO

La sinovite psoriasica e la sinovite villonodulare pigmentosa diffusa sono processi cronici spesso resistenti ai farmaci e/o alle terapie chirurgiche la cui patogenesi non è ancora stata del tutto chiarita.

Da tempo il nostro gruppo di ricerca si occupa di studiare gli aspetti clinici e patogenetici delle sinoviti. In particolare questo progetto di ricerca ha sviluppato, grazie ad una collaborazione multidisciplinare, diverse linee di indagine per individuare nuovi potenziali biomarcatori utili a determinare il grado di attività di malattia, valutare le risposte ai trattamenti e per studiare i meccanismi patogenetici della sinovite al fine di poterli considerare nuovi possibili bersagli terapeutici per questa grave patologia.

Gli obiettivi principali di questo studio sono stati:

- valutare la risposta al trattamento intraarticolare (IA) con farmaci biologici bloccanti il $TNF\alpha$, mediante l'impiego di un innovativo approccio terapeutico translazionale basato su misure quantitative, biologiche e cliniche della sinovite e sull'analisi delle relazioni con nuovi biomarcatori immunocitologici sinoviali;
- studiare i meccanismi molecolari e cellulari coinvolti nello sviluppo e nel mantenimento della sinovite.

MATERIALI E METODI

PAZIENTI E CONTROLLI

Nel corso di questi tre anni di lavoro sono stati reclutati in totale 62 (14+17+31) pazienti con sinovite. Di questi, 14 pazienti affetti da artrite psoriasica (AP), 10 uomini e 4 donne di età compresa tra i 21 i 63 anni (Tab. 1), hanno partecipato ad uno studio in cieco volto a valutare il biomarcatori sinoviali in risposta al trattamento intraarticolare (IA) con anti-TNF α . (E). Ai pazienti è stata somministrata una dose IA di farmaco (0,5 ml pari a 12,5 mg di etanercept) oppure di placebo (NaCl) una volta ogni due settimane per un massimo di quattro dosi. Il farmaco o il placebo è stato somministrato dopo aspirazione del liquido sinoviale. A due settimane dalla prima iniezione è stato effettuato, per motivi etici, un crossover tra i due gruppi. La valutazione clinica del ginocchio è stata effettuata prima di ogni iniezione IA e due settimane dopo l'ultima da due medici, uno dei quali cieco rispetto al trattamento effettuato dal paziente. La randomizzazione è stata effettuata utilizzando una lista computerizzata.

La valutazione della risposta al trattamento si è basata sull'utilizzo di indici sistemici biologici: velocità di eritrosedimentazione (VES: norm 0–20 mm/hr) e proteina C-reattiva (PCR: norm<10), e indici locali: knee Thompson articular index (THOMP: range 0 -9); Knee Joint Articular Index (KJAI: range 0 -14) di attività di malattia.

Tabella 1: Caratteristiche cliniche e demografiche e indici sistemici di attività di malattia dei pazienti affetti da AP

n.	Età	Sesso	Lato	Durata malattia (anni)	Durata Sinovite (anni)	VES		PCR		DAS		mRAI	
						PRE	POST	PRE	POST	PRE	POST	PRE	POST
1	29	M	Sx	10.3	10.3	46.4	88.4	1.78	0.33	3.21	3.42	8	8
2	38	M	Dx	8.4	6.4	40.3	29.0	2.77	0.72	3.44	3.33	12	12
3	44	M	Sx	12.5	10.5	23.2	22.2	0.53	0.02	2.33	1.25	3	0
4	52	F	Dx	8.6	8.6	72.5	33.8	0.56	0.56	2.78	2.59	4	4
5	51	M	Sx	22	5.7	12.0	13.0	0.85	0.53	2.88	2.47	6	5
6	51	M	Sx	11	11	15.6	22.7	0.10	0.00	2.69	3.00	7	9
7	36	M	Dx	9	9	15.0	11.0	0.66	0.39	3.18	2.42	12	5
8	63	M	Dx	6.5	4.3	6.0	9.9	0.32	0.80	2.65	1.87	10	2
9	53	M	Sx	4	3.5	18.1	3.6	2.93	0.24	2.52	0.71	5	0
10	39	M	Dx	9	15	30.0	20.0	0.00	0.00	3.01	2.40	2	1
11	44	F	Dx	4.8	4.5	29.4	25.2	0.08	0.08	2.48	1.89	4	1
12	28	F	Sx	2.5	2.5	14.3	6.8	0.70	0.20	3.97	3.40	20	18
13	21	F	Dx	8.5	2	41.2	27.2	0.48	0.14	2.77	1.98	3	1
14	51	M	Dx	5.5	3.5	13.6	2.2	0.26	0.26	3.22	0.75	9	0

L'espressione genica del CSF-1 è stata valutata mediante real-time PCR nel tessuto sinoviale di ginocchia di 17 pazienti afferenti agli ambulatori del Day Surgery dell'U.O.C. di Reumatologia dell'Università-Ospedale di Padova, di cui 5 affetti da PVNS (4 uomini e 1 donna di età compresa tra i 20 e i 35 anni), 6 da gonoartrite persistente (4 uomini e 2 donne di età compresa tra i 38 e i 51 anni) e 6 da meniscopatia (3 uomini e 3 donne di età compresa tra i 34 e i 41 anni) (Tab. 2).

Tabella 2: Caratteristiche cliniche e demografiche dei pazienti affetti da (A) sinovite villonodulare pigmentosa diffusa, (B) gonoartrite attiva persistente e (C) meniscopatia**A) Pazienti affetti da sinovite villonodulare pigmentosa diffusa**

n.	Età	Sesso	Lato	Durata della Sinovite (anni)	Durata della malattia (anni)
1	35	F	Sx	4	12
2	30	M	Sx	4,5	4,5
3	32	M	Dx	4	8
4	31	M	Sx	5	5,8
5	20	M	Sx	2	2
media	29,6			3,9	6,46
sd(±)	5,68			1,14	3,78

B) Pazienti affetti da gonoartrite attiva persistente

n.	Età	Sesso	Lato	Durata della Sinovite (anni)	Durata della malattia (anni)
1	44	M	Sx	11,5	13,5
2	40	F	Sx	8,9	9,1
3	40	F	Sx	8,9	9,1
4	44	M	Sx	11,5	13,5
5	51	M	Sx	5,7	22
6	38	M	Dx	6,4	8,4
media	42,83			8,82	12,6
sd(±)	4,67			2,45	5,14

C) Pazienti affetti da meniscopatia

n.	Età	Sesso	Lato	Durata della Sinovite (anni)	Durata della malattia (anni)
1	40	F	Sx	2	4
2	41	M	Dx	1,8	3
3	34	F	Sx	2	2,9
4	36	M	Sx	1,5	3
5	35	M	Dx	1	1,4
6	38	F	Dx	3	4
media	37,33			1,88	3,05
sd(±)	2,8			0,66	0,95

Quattro pazienti affetti da PVNS sono stati sottoposti a terapia IA con anti TNF α (etanercept): una iniezione (1ml = 25mg) alla settimana per 4 settimane (Tab 3). Il farmaco è stato somministrato dopo aspirazione del liquido sinoviale. L'espressione del CSF-1 è stata valutata pre e post trattamento con analisi immunostochimica. La sinoviectomia è stata effettuata entro due settimane dall'ultima iniezione.

Tabella 3: Caratteristiche cliniche e demografiche dei pazienti affetti da sinovite villonodulare sottoposti a terapia IA con anti TNF α

n.	Sesso	Età	Durata della Sinovite (anni)
1	M	30	4,5
2	F	35	4
3	M	32	4
4	M	64	4
media		40,25	4,13
sd(±)		15,97	0,25

La valutazione dell'espressione fenotipica delle frazioni cellulari Treg e TH17 è stata condotta mediante analisi citofluorimetrica su 31 liquidi sinoviali e 10 periferici di pazienti affetti da artrite psoriasica (27 uomini e 4 donne di età compresa tra i 23 e i 84 anni), reclutati consecutivamente presso il nostro ambulatorio la cui caratteristica era la presenza di un importante versamento al ginocchio (Tab. 4).

Tabella 4: Caratteristiche cliniche e demografiche dei pazienti affetti da AP studiati per il fenotipo Treg/TH17

n.	Età	Sesso	Lato	Durata della Malattia (anni)	Durata della Sinovite (anni)
1	32	M	Dx	15	15
2	39	M	Dx	16	16
3	23	F	Dx	0,33	0,33
4	23	F	Sx	0,33	0,33
5	67	F	Sx	5	5
6	67	F	Dx	5	5
7	83	M	Sx	4	4
8	42	M	Sx	13	9
9	40	M	Sx	4	4
10	26	M	Sx	0,083	0,083
11	39	M	Dx	2	2
12	55	M	Dx	10	10
13	45	M	Sx	15	15
14	38	M	Dx	1	1
15	59	M	Sx	6	6
16	35	M	Sx	29	29
17	54	M	Dx	10	10
18	84	M	Sx	5	5
19	84	M	Dx	5	5
20	61	M	Dx	3	3
21	39	M	Sx	9	9
22	39	M	Dx	5	5
23	23	M	Sx	0,5	0,5
24	43	M	Sx	14	10
25	56	M	Dx	11	11
26	43	M	Dx	14	4
27	43	M	Sx	14	10
28	25	M	Dx	13	11
29	25	M	Sx	13	2
30	43	M	Sx	14	10
31	29	M	Sx	5	5

Al momento dello studio tutti i pazienti erano sottoposti a terapia con DMARD, corticosteroidi, e/o terapia sistemica con biologici per gonoartrite attiva caratterizzata da dolore, dolorabilità e versamento.

Tutti i pazienti con AP compresi nello studio soddisfacevano i criteri CASPAR (CLASsification criteria for Psoriatic ARthritis) per la classificazione della AP (39).

La diagnosi sinovite villonodulare pigmentosa è stata espressa sulla base dell'esame istologico eseguito presso l'Istituto di Anatomia e Istologia Patologica dell'Azienda Ospedaliera - Università di Padova.

Tutte le analisi sono state eseguite mediante l'utilizzo di tecniche di citofluorimetria, di biologia cellulare e molecolare e di immunostochimica e i dati raccolti dai gruppi di pazienti sono stati confrontati con quelli raccolti da opportuni gruppi di controllo.

Il protocollo di studio è stato approvato dal comitato etico e tutti i partecipanti hanno firmato il consenso informato.

VALUTAZIONE DEI LIVELLI DI CITOCINE E CHEMOCINE NEL LS

IL-1 β , IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra), IL-6, IL-17, TNF- α , IFN- γ , la chemochina CXC IL-8, le chemochine CC, CCL2, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), CCL3, macrophage inflammatory protein (MIP-1 α) e CCL4, macrophage inflammatory protein-1 β (MIP-1 β), sono state valutate mediante array immunologico in sospensione per la misura multipla di citochine/chemochine (Fluorokine MAPMultiplex Human Cytokine Panel A, R&D Systems, Minneapolis, USA) su campioni di LS precedentemente centrifugati a 1000g per 20 minuti per rimuovere cellule e detriti.

BIOPSIE SINOVIALI

Le biopsie sinoviali sono state ottenute durante artroscopia da aree di intensa proliferazione iperemica. Campioni di tessuto sinoviale sono stati fissati in formalina, inclusi in paraffina e conservati a -80°C per successiva indagine immunohistochimica, oppure direttamente conservati a -80°C in RNAlater per successiva estrazione di RNA.

IMMUNOISTOCHEMICA

La valutazione dell'infiltrato cellulare sinoviale e dei vasi sinoviali è stata condotta marcando sezioni seriali di biopsie sinoviali dello spessore di 3-4µm con anticorpi anti-CD3 diluito 1:100 (Novocastra), -CD68 diluito 1:50, -CD45 diluito 1:100, -CD31 diluito 1:100, -CD105 diluito 1:50 e CSF-1 diluito 1:50 (Dako). Tutti i parametri sono stati misurati mediante analisi morfometrica al computer (Image Pro-plus version 5) su un'area di 2mm².

ESTRAZIONE DELL'RNA TOTALE

L'estrazione di RNA da campioni di biopsie congelate conservate a -80°C in RNAlater è stata eseguita utilizzando un kit per estrazione disponibile in commercio (RNA Ble, RNA Extraction, Eurobio, France). La qualità dell'RNA estratto è stata valutata allo spettrofotometro considerando buono un valore di assorbanza del rapporto 260/280nm compreso tra 1.6 e 1.8.

L'integrità del campione è stata valutata con corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2% in TBE.

REAL TIME-PCR

L'RNA totale (1µg) è stato retrotrascritto in cDNA per successiva real time-PCR utilizzando il Gene Amp RNA PCR Kit (Applied Biosystems) secondo il seguente protocollo: 15min a 42°C, 5min a 99°C e 5min a 5°C.

Per quantificare i livelli di mRNA di ogni campione è stato adottato un metodo di quantificazione relativa che si riferisce ad una retta standard, costruita tramite diluizioni seriali (1:5, 1:25, 1:125) di un cDNA di controllo; nel nostro caso sono state utilizzate cellule CD14+ purificate da buffy coat e in seguito stimulate con PMA e ionomicina.

Per ogni campione è stata eseguita l'amplificazione in duplice copia del gene d'interesse, CSF-1 e di un gene espresso costitutivamente in tutte le cellule, avente la funzione di normalizzatore interno, il GAPDH. Per le reazioni di *Real Time*-PCR è stato impiegato lo strumento 7000 *Sequence Detection System* (SDS, Applied Biosystems).

Il protocollo utilizzato per l'amplificazione del GAPDH prevede che per ogni campione da analizzare si utilizzi una miscela di reazione (25 µl totali) composta da:

- 3,5 µl cDNA
- 7,5 µl H₂O priva di RNasi
- 1,5 µl mix di sonda e primer per GAPDH (Applied Biosystems)
- 12,5 µl TaqMan PCR Master Mix 2X (Applied Biosystems)

Il protocollo utilizzato per l'amplificazione del CSF-1 prevede che per ogni campione da analizzare si utilizzi una miscela di reazione (25 µl totali) composta da:

- 3,5 µl cDNA
- 7,7 µl H₂O priva di RNasi
- 1,3 µl mix di sonda e primer per CSF1 (Applied Biosystems)
- 12,5 µl TaqMan PCR Master Mix (Applied Biosystems)

Il protocollo di reazione utilizzato per eseguire la *Real Time*-PCR prevede un primo passaggio ad una temperatura di 50°C per 2 minuti per indurre l'attivazione dell'enzima UNG che permette di degradare eventuali contaminazioni costituite da amplificati precedenti che presentano l'uracile (U)

al posto della timidina (T). Un secondo passaggio avviene a 95°C per 10 minuti e porta alla disattivazione dell'enzima e alla denaturazione del cDNA stampo. A questo punto inizia la reazione di polimerizzazione che consiste in 45 cicli in cui si ripetono, in sequenza, le fasi di denaturazione (a 95°C per 15 secondi), appaiamento dei primer al cDNA ed estensione (a 60°C per 1 minuto).

Per ogni campione, è stato eseguito il rapporto tra la quantità iniziale di cDNA relativa a CSF-1 e quella relativa al GAPDH.

PREPARAZIONE DEL CAMPIONE CELLULARE

Conta totale dei leucociti

In una pipetta contaglobuli il liquido sinoviale è stato diluito 1:20 con una soluzione salina di blu di metilene allo 0,3%, mentre per la diluizione del sangue periferico è stata usata la stessa soluzione con l'aggiunta di qualche goccia di acido acetico. La prima colora i bianchi come per il liquido sinoviale, l'acido acetico invece produce la lisi del globulo rosso con fuoriuscita di emoglobina. La miscela ottenuta è stata quindi immessa nella camera di Burker pronta per la conta.

Conta differenziale dei leucociti

1 ml di liquido May-Grunwald (blu di metilene-eosina) è stato versato sullo striscio di liquido sinoviale o sangue periferico preventivamente disseccato su un vetrino per 3 minuti e successivamente diluito con 2 ml di acqua distillata per 5 - 6 minuti. Dopo aver gettato il colorante, senza sciacquare, il vetrino è stato coperto con 3 ml di acqua distillata con l'aggiunta di 3 gocce di soluzione Giemsa (azzurro-eosina) per 7 minuti. Il vetrino così colorato è stato lavato con abbondante acqua sotto il getto di un rubinetto. Al microscopio ottico ad immersione ad olio con obiettivo 100X sono state contate 100 cellule consecutive e le diverse sottopopolazioni leucocitarie espresse in %. Un esempio è riportato in figura 4.

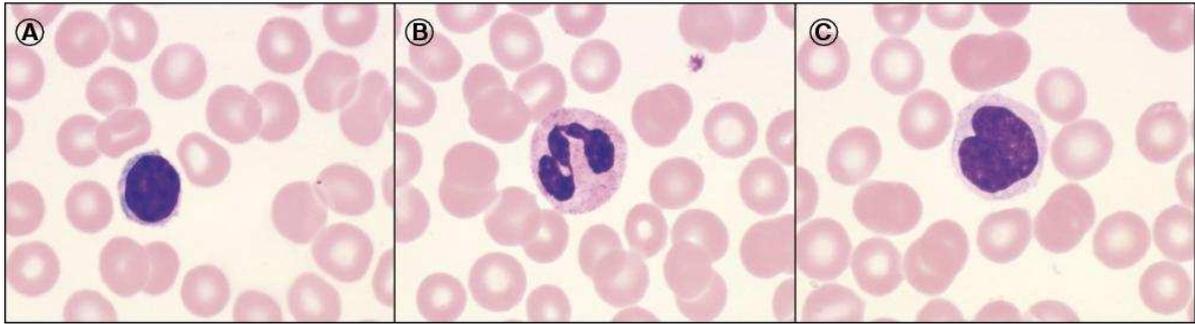


Figura 4: Leucociti in colorazione May-Grunwald Giemsa. Ingrandimento 100X. A, linfocita; B, Neutrofilo; C, Monocita.

Separazione dei linfomonociti da sangue periferico e liquido sinoviale

Le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) e del liquido sinoviale (SFMC) sono state ottenute da campioni di sangue fresco eparinato e liquido sinoviale fresco mediante centrifugazione su gradiente di Ficoll/HypaqueTM (F/H, *GE Healthcare*, Uppsala, Svezia)⁶¹. Tale metodica sfrutta la diversa densità delle cellule mononucleate (linfociti e monociti) rispetto agli altri elementi corpuscolati del sangue e del liquido sinoviale. Le cellule mononucleate e gli elementi a minore densità, si concentrano sopra lo strato di F/H; viceversa, i globuli rossi (RBC) e i granulociti (PMN) si raccolgono sul fondo della provetta (Fig.5).

Il sangue periferico e il LS sono stati prima diluiti in rapporto 1:2 con sodio cloruro 0,9% (p/v) (soluzione fisiologica, *Bieffe Medical*, Italia) a temperatura ambiente ed agitati delicatamente; in seguito sono stati stratificati lentamente sopra la soluzione di F/H. Si centrifuga a 900g per 20 minuti a 20°C, senza freno. L'anello di cellule mononucleate formatosi all'interfaccia F/H viene aspirato e sottoposto a due successivi lavaggi con soluzione fisiologica mediante centrifugazione a 400g per 10 minuti a 20°C con freno per eliminare gli elementi contaminanti; il pellet cellulare viene risospeso in una quantità adeguata di soluzione fisiologica; 10 microlitri della sospensione cellulare vengono diluiti 1:2 con Trypan Blue, colorante in grado di colorare selettivamente le cellule morte, e le cellule contate nella camera di Burker. Per verificare la pulizia del campione cellulare ottenuto, uno striscio cellulare su vetrino viene colorato come sopra descritto.

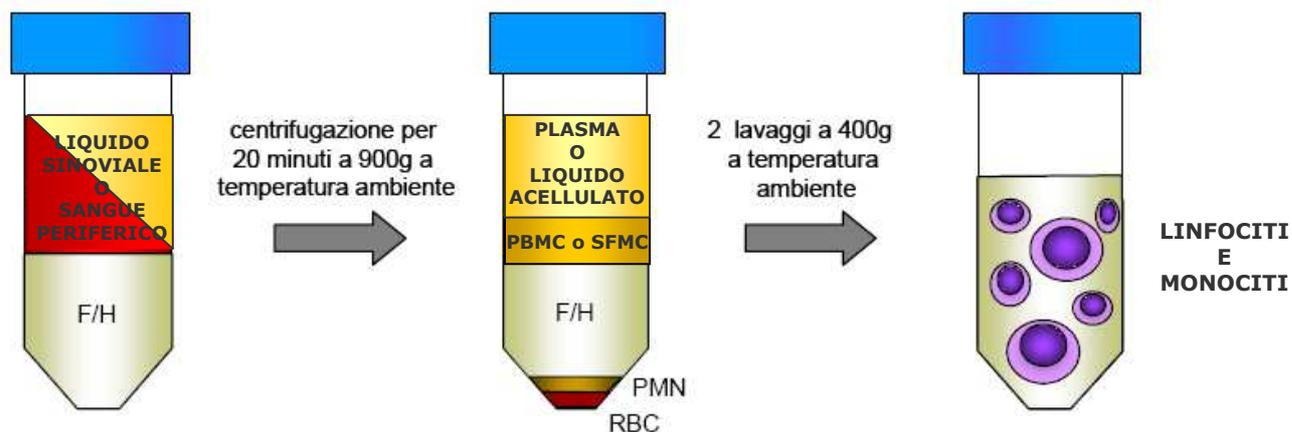


Figura 5: Separazione delle cellule mononucleate dal sangue periferico e liquido sinoviale mediante stratificazione su Ficoll-Hypaque (F/H). PBMC: cellule mononucleate del sangue periferico; SFMC: cellule mononucleate del liquido sinoviale; PMN: cellule polimorfonucleate; RBC: globuli rossi.

ANALISI CITOFUORIMETRICA

Le cellule mononucleate ottenute dal sangue periferico e dal liquido sinoviale dei pazienti affetti da AP e dei controlli normali sono state caratterizzate mediante analisi citofluorimetrica utilizzando anticorpi monoclonali (AcMo), coniugati covalentemente ad opportuni fluorocromi, diretti verso i linfociti T. Per l'analisi è stato impiegato il citofluorimetro FACSCalibur (Becton Dickinson, Sunnyvale, CA, USA) ed i dati sono stati processati utilizzando il programma CELLQuest (Becton Dickinson). Per la caratterizzazione di ogni campione cellulare sono stati acquisiti almeno 1×10^4 eventi e l'analisi è stata condotta sovrapponendo gli istogrammi dei campioni ottenuti con i diversi anticorpi diretti contro gli antigeni di superficie e citoplasmatici di interesse all'istogramma ottenuto con il rispettivo controllo isotipico.

Per la caratterizzazione immunofenotipica è stato costruito un pannello di AcMo comprendente anti-CD4, anti-CD25, anti-CD127 e anti-Foxp3 coniugati con i fluorocromi FITC, PE e PE-Cy5 mentre la valutazione dei linfociti Th17 è avvenuta mediante gli AcMo anti-IL23R e anti-IL-17 coniugati PE.

Le cellule ottenute dopo separazione in gradiente di densità di *Ficoll* dal sangue periferico e dal liquido sinoviale vengono aliquotate in una quantità pari a $0,5 \times 10^6$ cellule per ciascuna marcatura di superficie oppure $1,5 \times 10^6$ cellule per la marcatura intracitoplasmatica.

Per valutare l'espressione del marcatore nucleare Foxp3 le cellule, dopo essere state marcate con gli AcMo anti-CD4 e anti-CD25 per l'individuazione della sottopopolazione linfocitaria da analizzare, sono fissate e permeabilizzate con 1ml della soluzione Fix & Perm reagent (Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA) per 30 minuti in ghiaccio al buio, e poi marcate con 5 μ l di anticorpo anti-FoxP3 per un'ora in ghiaccio al buio .

Per la valutazione del marcatore intracitoplasmatico IL-17, le cellule vengono marcate con l'AcMo anti-CD4, lavate in PBS e fissate con 70 μ l di una soluzione a base di paraformaldeide per 10 minuti a temperatura ambiente. Vengono quindi lavate e permeabilizzate con 70 μ l una soluzione a base di saponina e colorate con 7 μ l di anti-IL17 al buio per 10 minuti. Al termine tutti i campioni vengono lisati con una soluzione a base di cloruro d'ammonio, centrifugati, risospesi in 250 μ l PBS e letti al citofluorimetro.

Il numero assoluto delle cellule appartenenti ad una specifica frazione cellulare viene calcolato sulla base delle percentuali ottenute dall'analisi citofluorimetrica e delle conte totali e differenziali del campione di partenza.

ANALISI STATISTICA

Per l'analisi statistica è stato utilizzato il software SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) e i dati sono stati espressi come media \pm deviazione standard (DS).

I risultati ottenuti dalla real time PCR sono stati analizzati con il Kruskal-Wallis test e i confronti tra gruppi sono stati ottenuti utilizzando il test Mann-Whitney per campioni non appaiati seguito da correzione di Bonferroni (40).

I cambiamenti nel tempo dei biomarcatori in risposta a terapia intraarticolare con anti-TNF α sono stati valutati col test non parametrico dei ranghi di Wilcoxon.

Le differenze nell'espressione fenotipica delle frazioni cellulari nel LS sono state valutate utilizzando il test Mann-Whitney.

Tutte le correlazioni sono state valutate utilizzando il test di correlazione per ranghi di Spearman.

Sono stati considerati significativi valori di $p < 0.05$.

RISULTATI

VALUTAZIONE DEI BIOMARCATORI SINOVIALI IN RISPOSTA AL TRATTAMENTO INTRA-ARTICOLARE CON ANTI-TNF α IN PAZIENTI AFFETTI DA ARTRITE PSORIASICA: analisi biochimica e immunocitochimica

Nonostante esistano diversi studi di letteratura riguardo ai biomarcatori nella psoriasi, in particolare nell'ambito di trials clinici con biologici, sono invece pochi, ad oggi, quelli che riguardano i biomarcatori nell'artrite psoriasica (AP) (21, 41, 42). Una prima parte del lavoro è stata impiegata per valutare i biomarcatori biologici della sinovite psoriasica in risposta a terapia IA con bloccanti il TNF α (E = etanercept) in relazione agli indici clinici biologici, sistemici e locali di attività di malattia.

Campioni di liquido sinoviale e tessuto sinoviale sono stati ottenuti da 14 pazienti affetti da AP sottoposti a successive iniezioni intra-articolari di Etanercept dopo artrocentesi una volta ogni due settimane per 10 settimane.

I risultati ottenuti mostrano che il versamento sinoviale scompare in ben 10 ginocchia dopo la quinta iniezione intraarticolare (Fig. 6) e che la risposta al trattamento IA-anti TNF α determina una significativa riduzione del numero dei leucociti (Fig. 7a), una significativa riduzione degli indici clinici biologici, sistemici e locali di attività di malattia (Tab.5, Fig. 7 b-c) e dei biomarcatori del liquido sinoviale rispetto ai livelli basali (Fig. 8), e una down-regolazione dei biomarcatori tissutali (Tab. 5). Inoltre, a livello basale, alcuni indici biologici correlano con gli indici sistemici di attività di malattia (Tab. 6) (43) e con i biomarcatori dell'infiammazione del tessuto sinoviale (Tab.7).

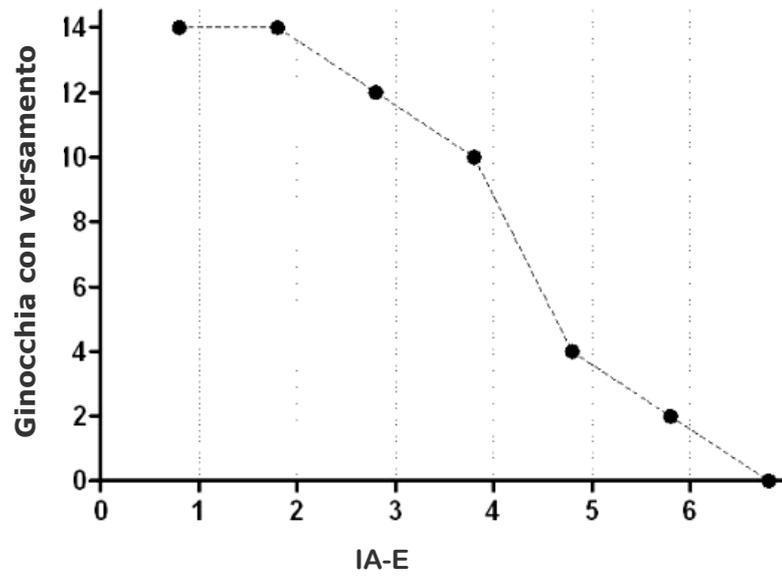
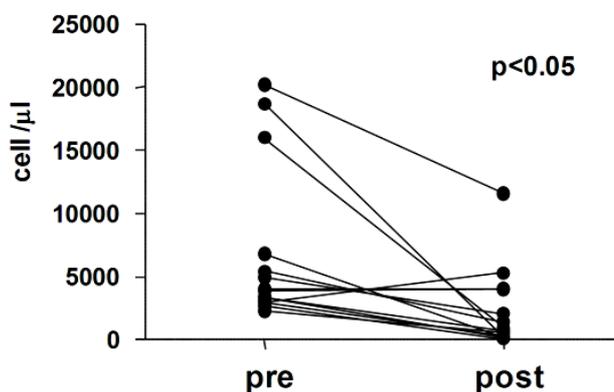
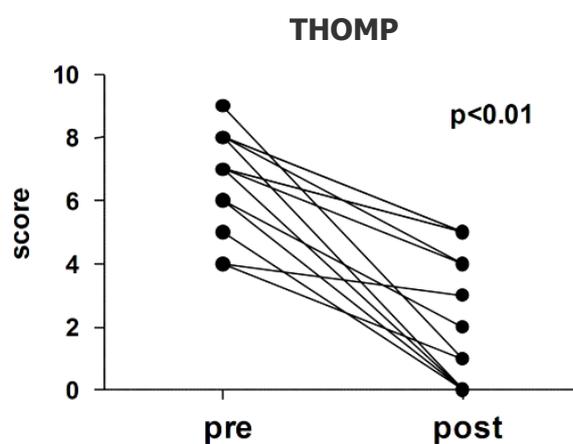


Figura 6: Follow-up del versamento sinoviale durante il trattamento IA con anti TNF α .

(a) Leucociti totali del liquido sinoviale



(b)



(c)

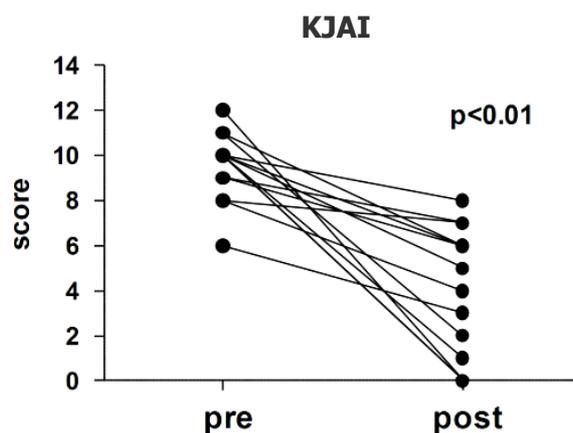


Figura 7: Differenze significative per leucociti totali del LS e indici clinici locali pre e post terapia intraarticolare con anti TNF- α . Leucociti totali del liquido sinoviale **(a)** Thompson Articular Knee Index **(b)** e Knee Joint Articular Index **(c)** in 14 pazienti affetti da AP prima e dopo trattamento intraarticolare con anti-TNF α : pre, livello basale; post, ultima aspirazione disponibile di LS dopo una o più iniezioni intraarticolari. La significatività è stata calcolata con il test non parametrico dei ranghi di Wilcoxon. Differenze significative per $p < 0.05$.

Tabella 5: Differenze significative tra gli indici clinici sistemici e locali di attività di malattia e i biomarcatori sinoviali prima e dopo trattamento IA con anti TNF α .

Indici Clinici (mean \pm SD)	Pre IA anti-TNF-α (n=14)	Post IA anti-TNF-α (n=14)	P
THOMPscore	6.71 \pm 1.54	2.07 \pm 2.20	p=0.0010
KJAI score	9.51 \pm 1.50	2.92 \pm 2.70	p<0.0010
HAQ score	0.58 \pm 0.51	0.38 \pm 0.56	p=0.0517
PCR (mg/dl)	0.85 \pm 0.95	0.30 \pm 0.26	p<0.0142
Tessuto Sinoviale: (mean \pm SD)	(n=5)	(n=5)	
CD45+(cell/ 2 mm ²)	1295 \pm 886	481 \pm 230	p=0.0431
CD31+(cell/ 2 mm ²)	94.3 \pm 27.8	46.1 \pm 41.1	p=0.0499
CD105+(cell/ 2 mm ²)	126.2 \pm 60.1	58.8 \pm 50.1	p=0.225
Liquido Sinoviale: (mean \pm SD)	(n=14)	(n=14)	P
IL-1Ra, pg/ml	11284 \pm 10582	4376 \pm 3918	p=0.006
IL-6, pg/ml	5109 \pm 5560	1810 \pm 3482	p=0.018
IL-1 β , pg/ml	8.78 \pm 10.85	4.28 \pm 0.61	p=0.006

Significatività del test per ranghi di Wilcoxon. Differenze significative per p < 0.05.

Tabella 6: Correlazioni significative, a livello basale, tra i biomarcatori del LS e gli indici sistemici di attività di malattia

coefficienti di correlazione di Spearman		
	CRP	ESR
IL-1β	0.61*	0.57*
IL-1Ra	0.57*	0.54*
IL-6	0.69**	ns
IL-8	ns	0.54*
MIP1-α	ns	0.67**
TNF-α	ns	ns
IL-17	ns	ns
IL-22	ns	ns

Significatività del test per ranghi di Spearman: *p < 0.05; ** p < 0.01; ns: non significativo

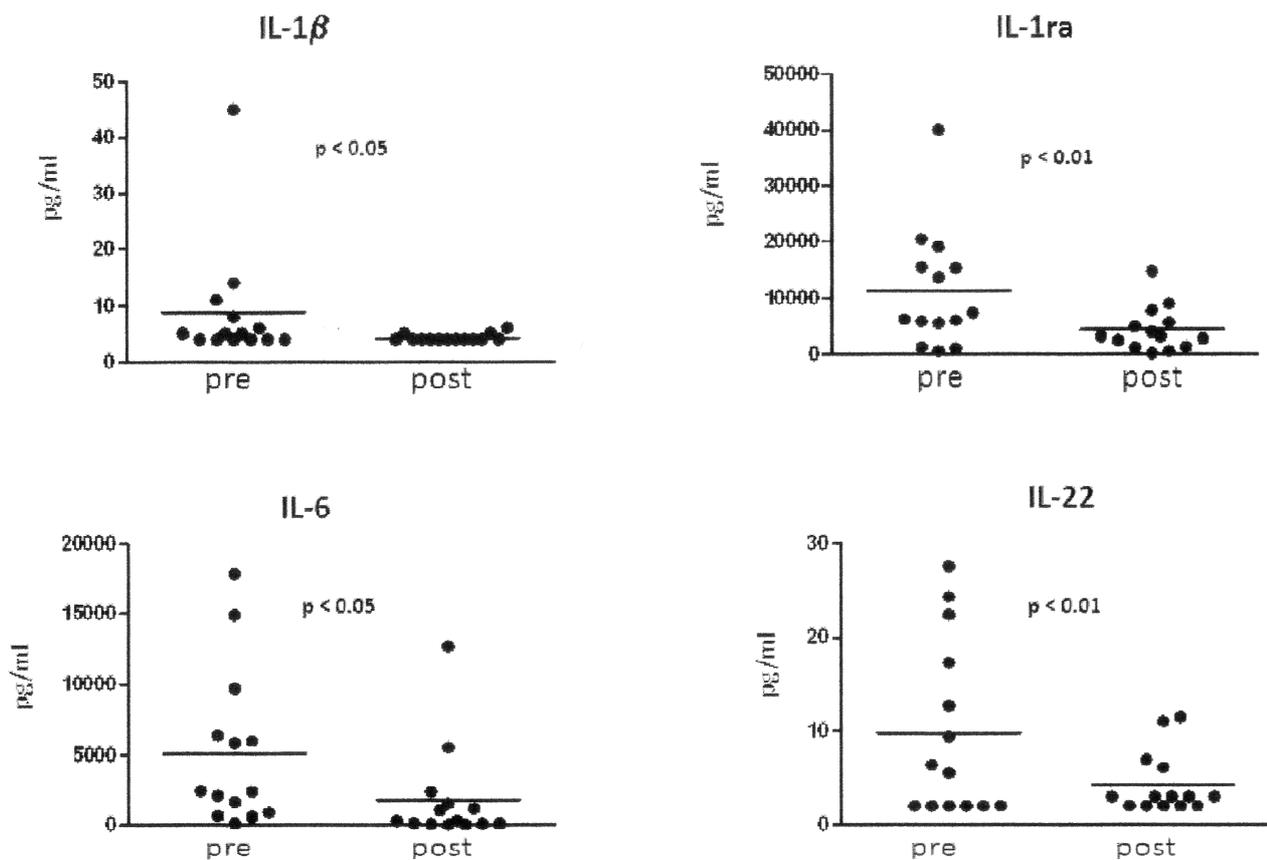


Figura 8: differenze significative dei livelli di citochine nel LS di 14 ginocchia affette da AP prima e dopo trattamento intraarticolare con anti TNF- α . pre, livello basale; post, ultima aspirazione disponibile di LS dopo una o più iniezioni intraarticolari. La significatività è stata calcolata con il test non parametrico dei ranghi di Wilcoxon. Sono stati considerati significativi valori di $p < 0.05$.

Tabella 7: Correlazioni significative, a livello basale, tra i biomarcatori del liquido e del tessuto sinoviale:

	CD3	CD45	CD31
IL-1β	ns	0.812*	0.900*
IL-1Ra	ns	ns	ns
IL-6	ns	ns	0.900*
IL-8	ns	ns	ns
CCL3	ns	ns	ns
CCL4	0.900*	ns	ns

Significatività del test per ranghi di Spearman: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; ns: non significativo

VALUTAZIONE DEI BIOMARCATORI SINOVIALI IN RISPOSTA AL TRATTAMENTO INTRA-ARTICOLARE CON ANTI-TNF α IN PAZIENTI AFFETTI DA SINOVITE VILLONODULARE PIGMENTOSA DIFFUSA: analisi biochimica e immunoistochimica

Il complesso processo che porta allo sviluppo della PVNS, sia di natura infiammatoria che neoplastica, è caratterizzato da meccanismi molecolari ad oggi ancora poco conosciuti. E' dunque molto difficile individuare una nuova strategia terapeutica per questa rara patologia.

L'effetto sinergico dimostrato per TNF α e CSF-1 sulla proliferazione dei monociti/macrofagi e la differenziazione osteoclastica e l'esistenza di un loop paracrino mediato da TNF α e CSF-1 coinvolto nell'attivazione macrofagica (24-26), ci hanno spinti a valutare gli effetti locali indotti da terapia intraarticolare con anti-TNF α e a studiare il livello di espressione del CSF-1 nel tessuto sinoviale di articolazioni affette dalla malattia rispetto ad altre forme di artrite.

A sei mesi dal trattamento con anti-TNF α nei pazienti affetti da PVNS abbiamo riscontrato un effettivo miglioramento degli indici locali di attività di malattia rispetto ai livelli basali, una consistente riduzione della fibrosi, una ridotta vascolarizzazione (CD31+) e una ridotta neoangiogenesi (CD105+). Nessuna differenza è stata invece riscontrata nel numero di cellule infiammatorie (CD45+) pre e post trattamento. Anche l'espressione del CSF-1 non ha mostrato differenze (Tab. 8, Fig. 9) (44). La conta delle cellule positive per CSF-1 non è stata possibile a causa della diffusa siderosi sinoviale e la forte colorazione di fondo.

Tabella 8: Indici locali di attività di malattia e risultati immunoistochimici e istochimici pre e post trattamento con anti TNF α

n.	THOMP		KJAI		CD45+		CD31+		CD105+		Fibrosi	
	pre	post	pre	post	pre	post	pre	post	pre	post	pre	post
1	8	2	11	4	117	121	37	27	5	2	60.3	41.2
2	3	0	4	0	239	220	28	20	25	14	46.2	28.1
3	5	1	7	2	125	116	47	34	77	30	47.0	29.4
4	8	5	7	3	179	198	46	26	44	23	38.3	14.8
Media	6.00	2.00	7.75	2.25	165	163.75	39.5	26.75	37.75	17.25	47.95	28.38
sd(\pm)	0.00	2.12	2.83	0.71	43.84	54.45	6.36	0.71	27.58	14.85	9.12	10.80

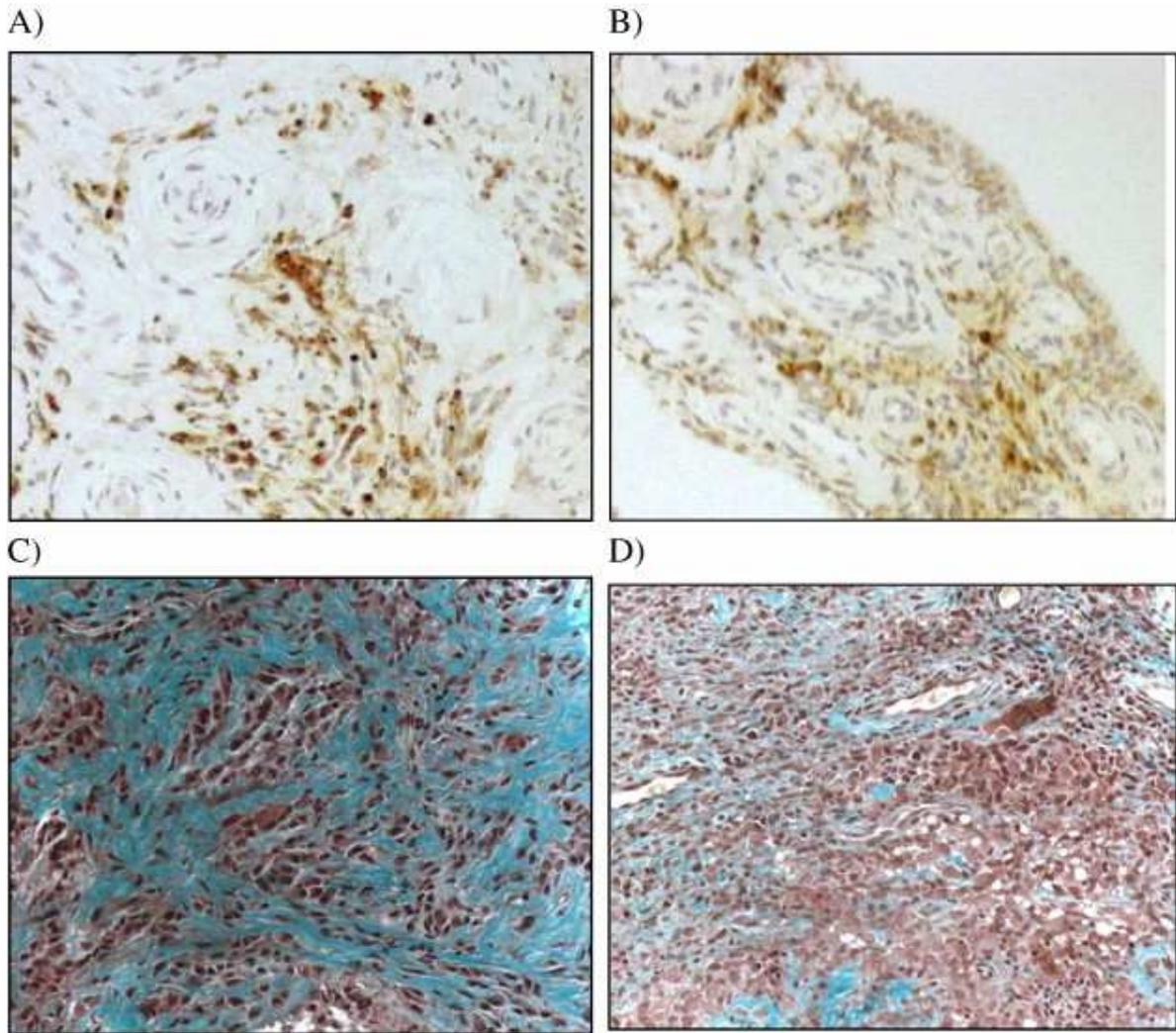


Figura 9: Analisi immunoistochimica per CSF-1 in un campione di biopsia villonodulare pre (A) e post (B) trattamento con anti-TNF α : si nota il numero simile di cellule marcate (rosso) per CSF-1. Colorazione tricromica di Masson per lo stesso paziente pre (C) e post (D) trattamento con anti-TNF α : si nota la minore fibrosi (blu) dopo trattamento (D).

**ESPRESSIONE DEL CSF-1 NELLA SINOVITE VILLONODULARE PIGMENTOSA DIFFUSA:
analisi biomolecolare**

Lo studio dell'espressione genica del colony-stimulating factor-1 (CSF-1) in biopsie sinoviali del ginocchio ottenute da pazienti affetti da PVNS, gonoartrite attiva persistente e meniscopatia, ha mostrato livelli significativamente più elevati di CSF-1-mRNA nel tessuto sinoviale dei pazienti affetti da PVNS rispetto a quelli rilevati negli altri due gruppi di pazienti considerati (Fig. 10) (45).

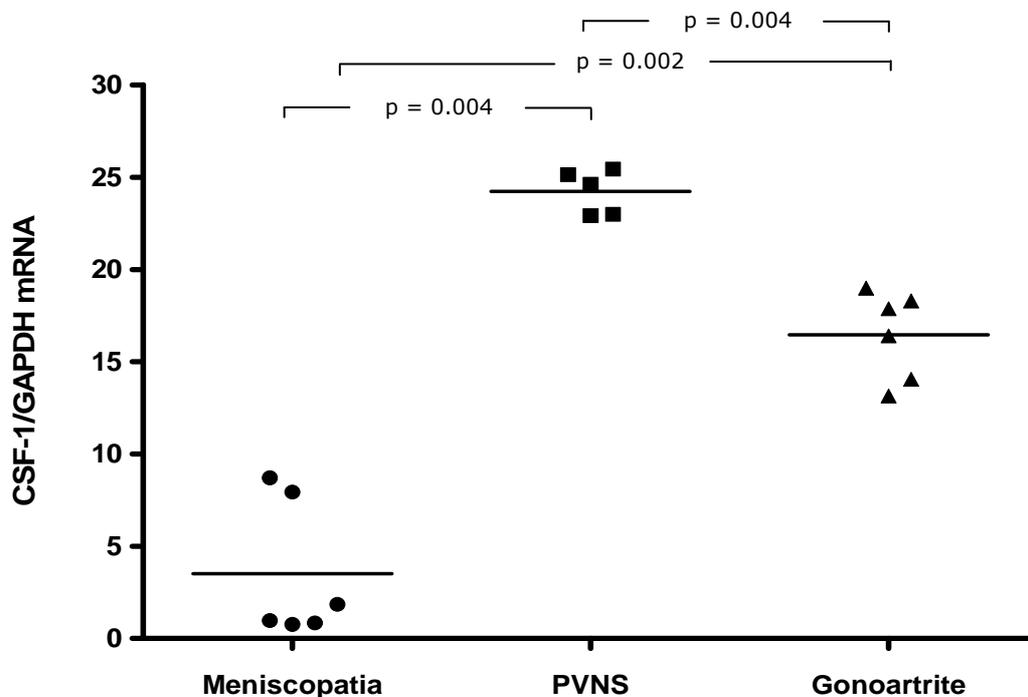


Figura 10: confronto tra l'espressione genica del CSF-1 valutata mediante real-time PCR nel tessuto sinoviale di ginocchia di pazienti affetti da PVNS (n.5), meniscopatia (n.6) e gonoartrite persistente (n.6).

I risultati sono stati analizzati utilizzando il test non-parametrico Kruskal-Wallis ($p=0.0008$) seguito dal test Mann-Whitney con correzione di Bonferroni. Tutti i confronti sono risultati significativi. Le linee orizzontali rappresentano i valori medi di ogni gruppo. La quantificazione relativa dell'espressione del gene CSF-1 è stata determinata in rapporto all'espressione quantitativa del gene di riferimento GAPDH.

**ESPRESSIONE DELLE FRAZIONI CELLULARI TREG E TH17 NELLA SINOVITE PSORIASICA:
analisi fenotipica**

Dati gli aspetti evidenziati solo di recente sulla capacità di alcune citochine (IL-6; IL-17; IL-22) e chemochine (IL-8 e MIP-1; 2; 3 α) di partecipare alla patogenesi dell'infiammazione dei processi autoimmuni a livello sistemico e tissutale, ed in particolare sulla loro capacità di indurre la differenziazione di frazioni cellulari con attività funzionale opposta (Treg e TH17) (21, 46, 47), abbiamo studiato l'espressione dei marcatori che definiscono queste frazioni cellulari nel processo della sinovite persistente psoriasica sia a livello locale che sistemico.

Attraverso l'analisi in citometria a flusso, abbiamo ottenuto dati rappresentativi dei profili fenotipici delle cellule Treg e TH17 nei pazienti affetti da AP. Complessivamente sono stati analizzati i linfociti di 31 LS e 10 periferici (SP) di pazienti, e di 16 SP di individui sani utilizzati come controlli normali (Tab. 9).

Tabella 9: Caratteristiche cliniche dei pazienti affetti da Artrite Psoriasica e dei Controlli Normali

	LS AP (n = 31)	SP AP (n = 10)	SP NC (n = 16)
Sesso (M/F)	27/4	10/0	6/10
Età	45.29 \pm 17.88	49.90 \pm 13.44	39.63 \pm 12.25
Durata della malattia (anni)	8.43 \pm 6.51	7.10 \pm 1.41	—
Durata della sinovite (anni)	7,17 \pm 6.08	6.10 \pm 4.95	—

NC: Controlli Normali; SP: sangue periferico; AP: Artrite Psoriasica; LS: liquido sinoviale

I risultati mostrano che sia i marcatori della frazione cellulare TH17 sia alcuni marcatori della frazione cellulare Treg sono in percentuale significativamente più espressi nel LS dei pazienti rispetto al SP dei controlli (Fig. 11).

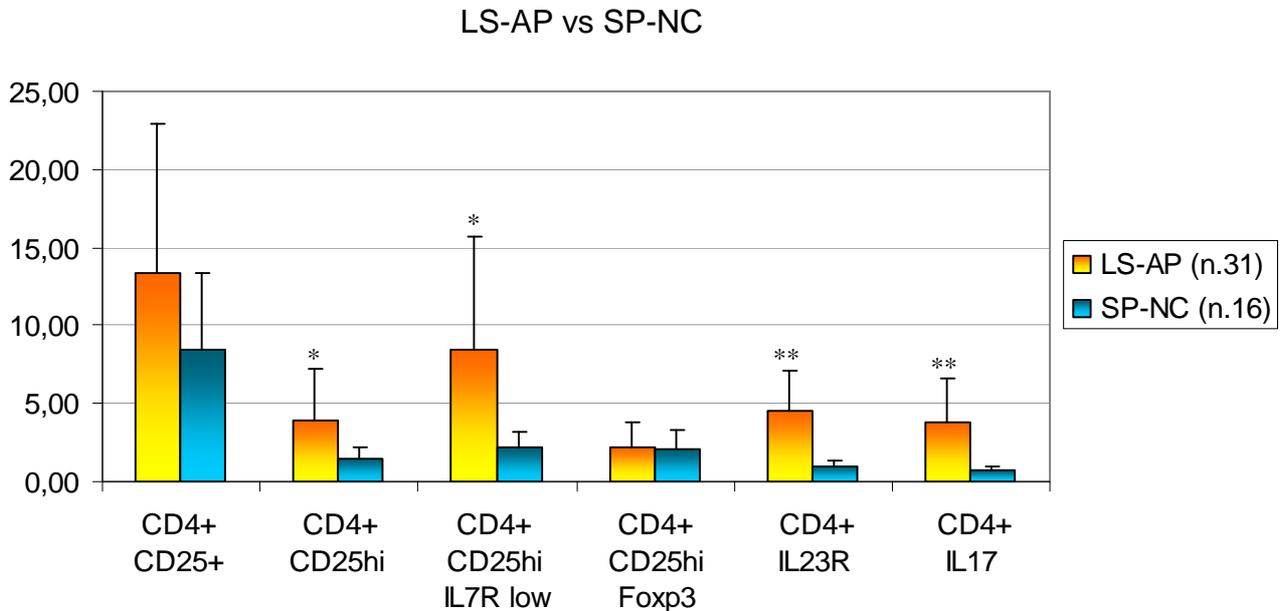


Figura 11: Differenze significative dei marcatori delle frazioni cellulari TH17 e Treg tra il LS dei pazienti e il SP dei controlli (test Mann-Whitney: * $p < 0,01$; ** $p < 0,0001$)

Abbiamo quindi deciso di valutare l'espressione del rapporto tra le due frazioni cellulari, dato più indicativo dell'equilibrio tra le due popolazioni.

Il rapporto CD25hi/Foxp3 (cellule regolatorie attivate su cellule ad attività soppressiva), è stato trovato significativamente ($p < 0,01$) più alto nel LS dei pazienti rispetto al sangue dei controlli così come il rapporto IL-17/Foxp3 (cellule ad attività proinfiammatoria su cellule ad attività soppressiva) ($p < 0,001$). Possiamo dunque affermare che nel LS dei pazienti l'equilibrio è spostato verso il fenotipo proinfiammatorio TH17 (Fig. 12).

LS-AP vs SP-NC (ratio)

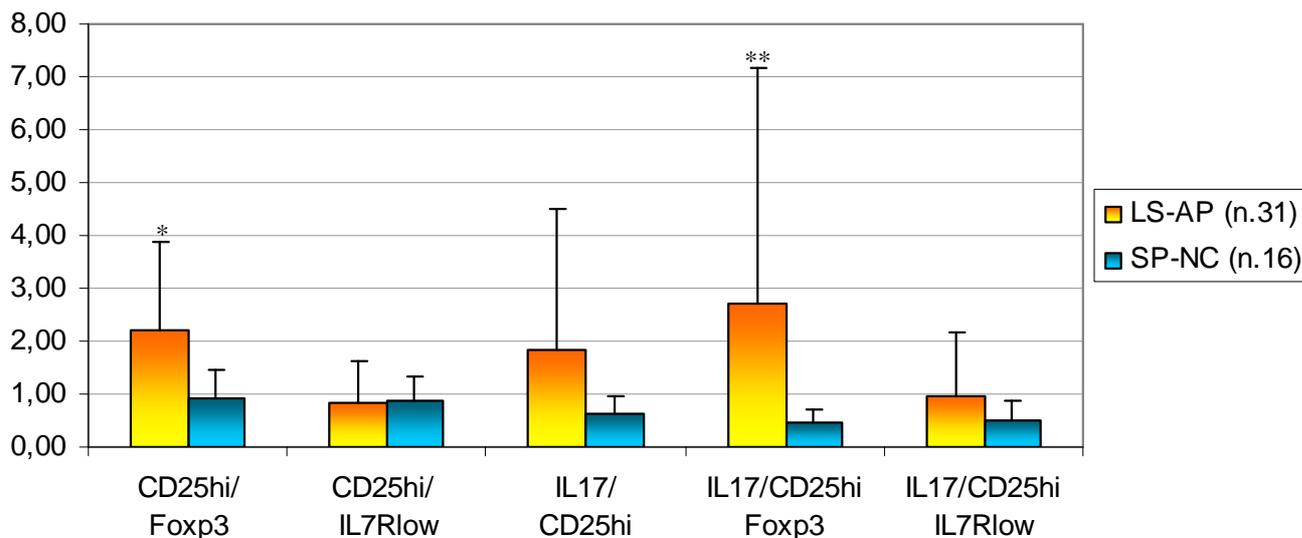


Figura 12: Differenze significative del rapporto tra i marcatori delle frazioni cellulare TH17 e Treg tra il LS dei pazienti e il SP dei controlli (test Mann-Whitney: * $p < 0,01$; ** $p < 0,0001$)

I rapporti IL-17/CD25hi, IL-17/Foxp3, IL-17/IL-7Rlow (frazione TH17 su frazione Treg) sono significativamente ($p < 0,01$) più alti nel sangue dei pazienti rispetto al sangue dei controlli e quindi possiamo dire che anche a livello sistemico l'equilibrio tra le due frazioni è spostato verso il fenotipo proinfiammatorio TH17 (Fig 13).

SP-AP vs SP-NC (ratio)

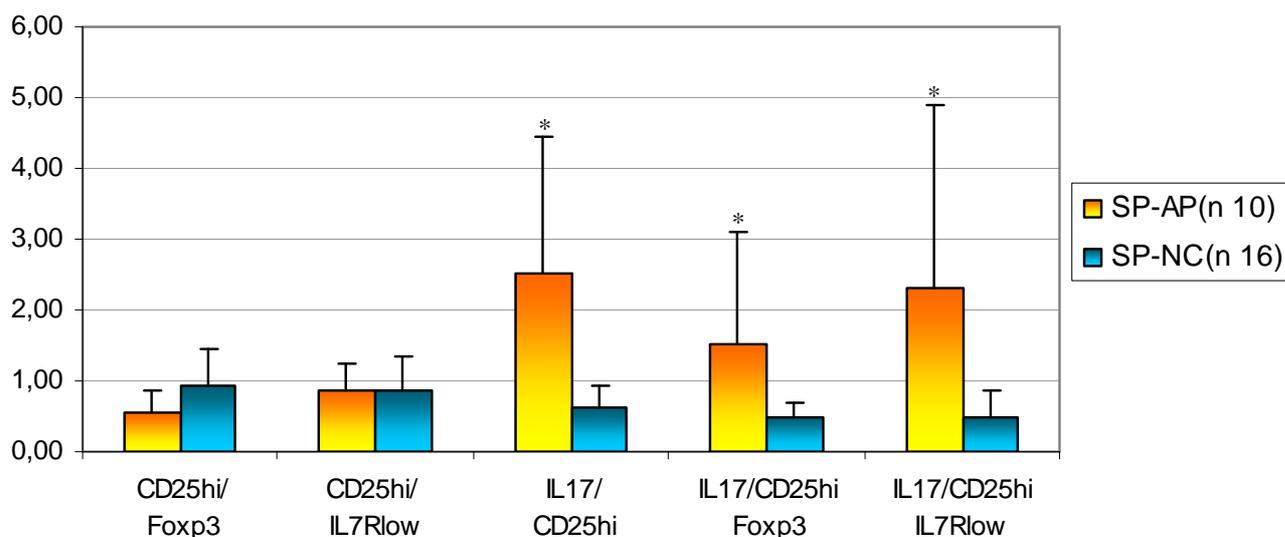


Figura 13: Differenze significative del rapporto tra i marcatori delle frazioni cellulare TH17 e Treg tra il SP dei pazienti e il SP dei controlli (test Mann-Whitney: * $p < 0,01$; ** $p < 0,0001$)

Infine abbiamo valutato le possibili correlazioni tra l'espressione dei marcatori cellulari del liquido sinoviale e del sangue periferico dello stesso paziente. Abbiamo trovato una correlazione di Spearman significativa tra LS e SP per la % di cellule CD4+CD25+ (linfociti T-helper attivati) e CD4+IL-17 (linfociti T-effettori ad attività proinfiammatoria) (Tab. 10).

Tabella 10: Correlazione di Spearman significativa per la % di cellule CD4+CD25+ e CD4+IL-17 presente nel LS e nel SP dello stesso paziente

n.10	LS	SP	p
CD4+ CD25+	10,86 ± 0,99	9,08 ± 8,49	0.015
CD4+ CD25hi	2,43 ± 1,77	1,00 ± 0,73	ns
CD4+ CD25hi IL7R low	3,51 ± 0,94	1,13 ± 0,70	ns
CD4+ CD25hi Foxp3	2,10 ± 0,87	1,90 ± 2,47	ns
CD4+ IL23R	6,32 ± 3,48	1,42 ± 1,70	ns
CD4+ IL17	3,15 ± 2,92	1,88 ± 3,85	0.046

Significatività del test per ranghi di Spearman: *p < 0.05; ** p < 0.01; ns: non significativo

DISCUSSIONE

Questo progetto di ricerca ha sviluppato diverse linee di indagine per individuare nuovi potenziali biomarcatori utili a determinare il grado di attività di malattia, valutare le risposte ai trattamenti e per studiare i meccanismi coinvolti nello sviluppo e nel mantenimento della sinovite al fine di poterli considerare nuovi possibili bersagli terapeutici per questa grave patologia.

In relazione alle risposte ai trattamenti possiamo affermare che nei pazienti affetti da AP la terapia IA con anti TNF α ha portato alla scomparsa del versamento sinoviale, indicandone l'efficacia. Inoltre, la riduzione significativa della concentrazione delle citochine proinfiammatorie e del numero dei globuli bianchi nel LS indica che le iniezioni intra-articolari di E hanno avuto un effetto locale sull'infiammazione sinoviale.

L'espressione di citochine e chemochine proinfiammatorie rilevata a livello basale nel liquido e nel tessuto sinoviale di questi pazienti è in accordo con precedenti risultati (11-13, 48-51). Anche le alterazioni riscontrate per CD45, CD31 e CD105 sono in accordo con la diminuzione dell'infiltrato cellulare globale e dei linfociti T così come già osservato dopo trattamento sistemico con anti-TNF α sia nell'AR che AP (42, 52-55). Nessuno studio precedente ha però valutato la correlazione tra i biomarcatori sinoviali e sistemici e gli indici locali di attività di malattia in pazienti affetti da AP. Lo studio condotto in questo progetto di ricerca indica che i biomarcatori del LS correlano con i marcatori dell'infiammazione del tessuto sinoviale e con gli indici sistemici e locali di attività di malattia nell'AP.

La presenza di significative modificazioni in risposta al trattamento IA e di significative correlazioni fra i biomarcatori sinoviali tra loro e con gli indici di attività di malattia sistemica e locale suggerisce che i biomarcatori sinoviali studiati (cellule mononucleate CD45+ e vasi sinoviali CD31+ nel tessuto sinoviale) e le citochine nel liquido sinoviale (IL-1 β ; IL-6; IL-1Ra) possano

rappresentare nuovi potenziali biomarcatori sinoviali della risposta della sinovite al trattamento con farmaci bloccanti il TNF α .

Per quanto riguarda il trattamento della PVNS, la terapia IA con anti-TNF α ha portato ad un effettivo miglioramento degli indici locali di attività di malattia e ad una regressione della fibrosi e della neoangiogenesi. E' stato dimostrato che TNF α e CSF-1 hanno un effetto sinergico sulla proliferazione dei monociti/macrofagi e il differenziamento osteoclastico, e che esiste un loop paracrino mediato da TNF α e CSF-1 coinvolto nell'attivazione macrofagica, sia in condizioni infiammatorie che neoplastiche (24-26, 56). Tuttavia la terapia anti TNF α non è risultata efficace nel ridurre l'espressione del CSF-1, e non ha portato, almeno al termine dello studio, ad una remissione stabile della malattia. I risultati immunohistochimici suggeriscono piuttosto un possibile impegno della terapia come "pre-trattamento" alla sinoviectomia artroscopica. Gli elevati livelli di espressione di CSF-1-mRNA che abbiamo riscontrato nella sinovite villonodulare pigmentosa diffusa rispetto alle sinoviti infiammatorie croniche, sono in accordo con precedenti risultati (57, 58). Ma, a nostra conoscenza, questa è la prima valutazione del confronto diretto dell'espressione del CSF-1 tra PVNS, gonoartrite e meniscopatia. Questi risultati ci permettono di affermare che il CSF-1 svolge un importante ruolo nel processo che porta allo sviluppo della PVNS e che possa giocare un importante ruolo anche nell'infiammazione da gonoartrite attiva persistente. Ad oggi possiamo affermare che i nostri risultati evidenziano la possibilità di considerare il CSF-1 come potenziale biomarcatore utile alla diagnosi di PVNS, ed è ipotizzabile che l'interazione tra il CSF-1 e il suo recettore (CSF-1R) possa rappresentare un possibile bersaglio terapeutico per questa rara malattia (45).

Nelle malattie autoimmuni, in cui si osserva un eccesso di risposta effettrice, l'induzione di una tolleranza antigene-specifica è auspicabile in alternativa a un'immunosoppressione

farmacologica generalizzata, per questo diversi lavori di letteratura si sono occupati dell'espressione di frazioni linfocitarie ad attività effettrice e/o soppressiva nelle malattie reumatiche (46, 59-61). Pochi dati sono però ad oggi disponibili sull'AP (62, 63).

I nostri risultati sull'analisi fenotipica delle frazioni cellulari ad attività funzionale opposta nel liquido sinoviale e nel sangue periferico di pazienti affetti da AP, hanno evidenziato un significativo squilibrio a favore della frazione cellulare a funzione effettrice TH17, significativamente espansa, rispetto alla frazione cellulare ad attività soppressiva Treg, significativamente ridotta. Non sorprendono le correlazioni significative trovate tra l'espressione dei marcatori che definiscono queste frazioni sia a livello locale e che sistemico poiché abbiamo visto come, in corso di sinovite, la membrana sinoviale sia molto vascolarizzata e sia quindi possibile un abbondante scambio tra periferia e ambiente sinoviale.

Sulla base di diversi studi di letteratura (47, 64, 65) e dei nostri precedenti risultati sull'aumentata espressione dei mediatori chimici proinfiammatori nel liquido sinoviale, possiamo ipotizzare che ci siano specifici marcatori del microambiente citochinico sinoviale che concorrono allo *shift* verso le cellule effettrici.

È auspicabile che i nostri attuali studi sui meccanismi responsabili dell'induzione di tolleranza permettano di definire specifici target molecolari per lo sviluppo di nuovi composti immunomodulanti in grado sia di inibire la risposta effettrice, per esempio prevenendo l'attivazione antigene-specifica delle cellule T, sia di aumentare quella regolatoria, per esempio inducendo la differenziazione di cellule T regolatorie.

CONCLUSIONI

Sulla base dei più importanti risultati emersi da questo studio possiamo concludere che:

- Nella sinovite psoriasica esiste una stretta correlazione tra i biomarcatori del liquido sinoviale, quelli dell'inflammazione tessutale e gli indici di attività di malattia e che tutti sono sensibili a variazioni in risposta al trattamento IA con anti-TNF α (43),
- Il trattamento IA della sinovite villonodulare pigmentosa diffusa con anti-TNF α porta ad un effettivo miglioramento degli indici locali di attività di malattia rispetto ai livelli basali, ad una consistente riduzione di fibrosi, una ridotta vascolarizzazione (CD31+) e una ridotta neoangiogenesi (CD105+) (44); non ha alcun effetto sull'espressione del CSF-1,
- Nel tessuto sinoviale dei pazienti affetti da PVNS il livello di espressione del CSF-1-mRNA è significativamente più elevato rispetto a quello rilevato nei pazienti affetti da meniscopatia e gonartrite persistente (45),
- Sia nel sangue che nel liquido sinoviale dei pazienti affetti da AP la frazione linfocitaria Treg è significativamente ridotta mentre la frazione TH17 è significativamente espansa rispetto ai valori riscontrati nel sangue dei controlli normali.

BIBLIOGRAFIA

1. El-Gabalawy H: The preclinical stages of RA: lessons from human studies and animal models. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2009; 23:49-58
2. Paget S. Recurrent synovitis of the knee in rheumatoid arthritis. In: *Rheumatology*. Klippel JH, Dieppe PA eds CV Mosby Publ, London, 1998: pp 16.16–16.17
3. Blyth T, Stirling A, Coote J, Land D, Hunter JA: Injection of the rheumatoid knee: does intra-articular methotrexate or rifampicin add to the benefits of triamcinolone hexacetonide? *Br J Rheumatol* 1998; 37:770-772
4. Heuft-Dorenbosch LLJ, Vet HCW, Linder SV: Yttrium radiosynoviorthesis in the treatment of knee arthritis in rheumatoid arthritis: a systematic review. *Ann Rheum Dis* 2000;59:583-586
5. Bird AH: Management of rheumatic diseases – pharmacological approaches - Intra-articular and intralesional therapy. In: *Rheumatology*. Klippel JH, Dieppe PA eds CV Mosby Publ, London, 1994: pp16.1-16.6
6. Doria A, U Fiocco, PF Gambari: Reumatismi infiammatori (artriti) In: *Malattie Reumatiche*. Todesco S, Gambari PF, Punzi L eds McGraw-Hill Publ, Milano, 2007, pp 137-148
7. Fiocco U, Ostuni PA, Punzi L, Ruffatti A, Schiavon F: Principali basi anatomo-funzionali e fisiopatologia delle malattie reumatiche. In: *Malattie Reumatiche*. Todesco S, Gambari PF, Punzi L eds McGraw-Hill Publ, Milano, 2007, pp 2-53
8. Filer A, Pitzalis C, Buckley CD. Targeting the stromal microenvironment in chronic inflammation. *Curr Opin Pharmacol*. 2006 Aug;6(4):393-400. Epub 2006 May 8.
9. Kokkonen H, Söderström I, Rocklöv J, Hallmans G, Lejon K, Rantapää Dahlqvist S. Up-regulation of cytokines and chemokines predates the onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2010 Feb;62(2):383-91.
10. Sweeney SE, Firestein GS. Rheumatoid arthritis: regulation of synovial inflammation. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Mar;36(3):372-8.
11. Ritchlin C, Haas-Smith SA, Hicks D, Cappuccio J, Osterland CK, Looney RJ. Patterns of cytokine production in psoriatic synovium. *J Rheumatol*. 1998 Aug;25(8):1544-52.
12. Van Kuijk AW, Reinders-Blankert P, Smeets TJ, Dijkmans BA, Tak PP. Detailed analysis of the cell infiltrate and the expression of mediators of synovial inflammation and joint destruction in the

synovium of patients with psoriatic arthritis: implications for treatment. *Ann Rheum Dis.* 2006 Dec;65(12):1551-7. Epub 2006 May 25.

13. Partsch G, Steiner G, Leeb BF, Dunky A, Bröll H, Smolen JS. Highly increased levels of tumor necrosis factor-alpha and other proinflammatory cytokines in psoriatic arthritis synovial fluid. *J Rheumatol.* 1997 Mar;24(3):518-23.

14. Cupp JS, Miller MA, Montgomery KD, Nielsen TO, O'Connell JX, Huntsman D, van de Rijn M, Gilks CB, West RB. Translocation and expression of CSF1 in pigmented villonodular synovitis, tenosynovial giant cell tumor, rheumatoid arthritis and other reactive synovitides *Am J Surg Pathol.* 2007 Jun;31(6):970-6.

15. Pujol JP: Interleukin 1, prostaglandin E2 and articular inflammation. *Rev Rhum Mal Osteoartic* 1989; 56:12-6.

16. Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature.* 2003 May 15;423(6937):356-61.

17. McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol.* 2007 Jun;7(6):429-42.

18. Liu H, Leung BP. CD4+CD25+ regulatory T cells in health and disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2006 May-Jun;33(5-6):519-24.

19. Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol.* 2007 Dec;19(6):652-7.

20. Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, Maggi L, Liotta F, Mazzinghi B, Parente E, Filì L, Ferri S, Frosali F, Giudici F, Romagnani P, Parronchi P, Tonelli F, Maggi E, Romagnani S. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med.* 2007 Aug 6;204(8):1849-61. Epub 2007 Jul 16.

21. de Vlam K, Gottlieb AB, Fitzgerald O. Biological biomarkers in psoriatic disease. A review. *J Rheumatol.* 2008 Jul;35(7):1443-8.

22. Choy E. Clinical trial outcome of anti-tumour necrosis factor alpha therapy in rheumatic arthritis. *Cytokine.* 2004 Nov 21-Dec 7;28(4-5):158-61.

23. www.nih.gov

24. Oster W, Lindemann A, Horn S, Mertelsmann R, Herrmann F. Tumor necrosis factor (TNF)- α but not TNF- β induces secretion of colony stimulating factor for macrophages (CSF-1) by human monocytes. *Blood* 1987;70:1700–1703.
25. Branch DR, Turner AR, Guilbert LJ. Synergistic stimulation of macrophage proliferation by the monokines tumor necrosis factor-alpha and colony stimulating factor 1. *Blood* 1989;73:307–311.
26. Chitu V, Stanley ER. Colony-stimulating factor-1 in immunity and inflammation. *Curr Opin Immunol* 2006;18:39–48.
27. Douglass TG, Driggers L, Zhang JG, Hoa N, Delgado C, Williams CC, et al. Macrophage colony stimulating factor: not just for macrophages anymore! A gateway into complex biologies. *Int Immunopharmacol* 2008;8:1354–1376.
28. Panayi G. Immunology of psoriasis and psoriatic arthritis. *Baillière's Clin Rheumatol* 1994;8:419-27
29. Tassioulas I, Duncan SR, Centola M, Theofilopoulos AN, Boumpas DT. Clonal characteristics of T cell infiltrates in skin and synovium of patients with psoriatic arthritis. *Hum Immunol*. 1999 Jun;60(6):479-91.
30. Ritchlin C, Haas-Smith SA, Hicks D, Cappuccio J, Osterland CK, Looney RJ. Patterns of cytokine production in psoriatic synovium. *J Rheumatol* 1998;25:1544-52
31. Danning CL, Illei GG, Hitchon C, Greer MR, Boumpas DT, McInnes IB. Macrophage-derived cytokines and nuclear factor kappa B p65 expression in synovial membrane and skin of patients with psoriatic arthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43:1244-56
32. Jaffe HL, Lichtenstein L, Sutro CJ. Pigmented villonodularis synovitis: bursitis and tenosynovitis. *Arch Pathol* 1941;31:731–765.
33. Abdul-Karim FW, el-Naggar AK, Joyce MJ, Makley JT, Carter JR. Diffuse and localized tenosynovial giant cell tumor and pigmented villonodular synovitis: a clinicopathologic and flow cytometric DNA analysis. *Hum Pathol* 1992;23:729–735.
34. Darling JM, Goldring SR, Harada Y. Multinucleated cells in pigmented villonodular synovitis and giant cell tumor of tendon sheath express features of osteoclasts. *Am J Pathol* 1997;150:1383–1393.
35. Yoshida W, Uzuki M, Kurose A, Yoshida M, Nishida J, Shimamura T, et al. Cell characterization of mononuclear and giant cells constituting pigmented villonodular synovitis. *Hum Pathol* 2003;34:65–73.

36. Brandal P, Bjerkehagen B, Heim S. Molecular cytogenetic characterization of tenosynovial giant cell tumors. *Neoplasia* 2004;6:578–583.
37. Yudoh K, Matsuno H, Nezuka T. Different mechanisms of synovial hyperplasia in rheumatoid arthritis and pigmented villonodular synovitis. *Arthritis Rheum* 1999;42:669–677.
38. West BR, Rubin BP, Miller MA, Subramanian S, Kaygusuz G, Montgomery K, et al. Landscape effect in tenosynovial giant-cell tumor from activation of CSF1 expression by a translocation in a minority of tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:690–695.
39. Taylor W, Gladman D, Helliwell P, Marchesoni A, Mease P, Mielants H, CASPAR Study Group: Classification criteria for psoriatic arthritis: development of new criteria from a large international study. *Arthritis Rheum* 2006, 54:2665-2673.
40. Altman D.G.: Practical statistics for medical research. London: Chapman and Hall, 1991: 211-2.
41. Gladman DD: Effectiveness of psoriatic arthritis therapies. *Semin Arthritis Rheum*, 2003, 33:29-37.
42. van Kuijk AW, Gerlag DM, Vos K, Wolbink G, de Groot M, de Rie MA et al. A prospective, randomised, placebo-controlled study to identify biomarkers associated with active treatment in psoriatic arthritis: effects of adalimumab treatment on synovial tissue. *Ann Rheum Dis* 2009; 68(8):1303-9.
43. Fiocco U, Sfriso P, Oliviero F, Roux-Lombard P, Scagliori E, Cozzi L, Lunardi F, Calabrese F, Vezzù M, Dainese S, Molena B, Scanu A, Nardacchione R, Rubaltelli L, Dayer JM, Punzi. Synovial effusion and synovial fluid biomarkers in psoriatic arthritis to assess intraarticular tumor necrosis factor- α blockade in the knee joint. *L.Arthritis Res Ther*. 2010;12(4):R148.
44. Fiocco U. et al.: Molecular pathways involved in synovial cell inflammation and tumoral proliferation in diffuse pigmented villonodular synovitis. *Autoimmun Rev* 2010; 9: 780-4.
45. Molena B, Sfriso P, Oliviero F, Pagnin E, Teramo A, Lunardi F, Stramare R, Scanu A, Nardacchione R, Rubaltelli L, Calabrese F, Punzi L, Fiocco U. Synovial colony-stimulating factor-1 mRNA expression in diffuse pigmented villonodular synovitis. *Clin Exp Rheumatol*. 2011 May-Jun;29(3):547-50.
46. Nistala K, Wedderburn LR. Th17 and regulatory T cells: rebalancing pro- and anti-inflammatory forces in autoimmune arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2009 Jun;48(6):602-6. Epub 2009 Mar 5. Review.

47. Kimura A, Kishimoto T. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur J Immunol*. 2010 Jul;40(7):1830-5. Review.
48. Punzi L, Bertazzolo N, Pianon M, Rizzi E, Rossini P, Gambari PF: Value of synovial fluid interleukin-1 beta determination in predicting the outcome of psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis* 1996, 55:642-644.
49. Danning CL, Illei GG, Hitchon C, Greer MR, Boumpas DT, McInnes IB: Macrophage-derived factor kB p65 expression in synovial membrane and skin of patients with psoriatic arthritis. *Arthritis Rheum* 2000, 43:1244-1256.
50. Kane D, FitzGerald O: Tumour necrosis factor alpha in psoriasis and psoriatic arthritis: a clinical genetic, and histopathologic perspective. *Curr Rheumatol Rep* 2004, 6:292-298.
51. Canete JD, Martinez SE, Farres J, Sanmarti R, Blay M, Gomez A, Salvador G, Muñoz-Gómez J: Differential Th1/Th2 cytokine patterns in chronic arthritis: interferon-gamma is highly expressed in synovium of rheumatoid arthritis compared with seronegative spondyloarthropathies. *Ann Rheum Dis* 2000, 59:263-268.
52. Kruithof E, De Rycke L, Roth J, Mielants H, Van den Bosch F, De Keyser F, Veys EM, Baeten D: Immunomodulatory effects of etanercept on peripheral joint synovitis in the spondylarthropathies. *Arthritis Rheum* 2005, 52:3898-3909.
53. Rooney T, Roux-Lombard P, Veale DJ, Fitzgerald O, Dayer JM, Bresnihan B: Synovial tissue and serum biomarkers of disease activity therapeutic response and radiographic progression. Analysis of a proof-of-concept randomized clinical trial of cytokine blockade. *Ann Rheum Dis* 2010, 69:706-714.
54. Mease PJ: Assessment tools in psoriatic arthritis. *J Rheumatol* 2008, 35:1426-1430.
55. Maksymowych WP, Fitzgerald O, Wells GA, Gladman DD, Landewé R, Ostergaard M, Taylor WJ, Christensen R, Tak PP, Boers M, Syversen SW, Bathon JM, Ritchlin CJ, Mease PJ, Bykerk VP, Garnero P, Geusens P, El-Gabalawy H, Aletaha D, Inman RD, Kraus VB, Kvien TK, van der Heijde D: Proposal for levels of evidence schema for validation of a soluble biomarker reflecting damage endpoints in rheumatoid arthritis psoriatic arthritis and ankylosing spondylitis and recommendations for study design. *J Rheumatol* 2009, 36:1792-1799.
56. Zins K. et al.: Colon cancer cell-derived tumor necrosis factor- α mediates the tumor growth-promoting response in macrophages by up-regulating the colony-stimulating factor-1 pathway. *Cancer Res* 2007; 67: 1038-45.

57. Nakano K, Okada Y, Saito K, Tanikawa R, Sawamukai N, Sasaguri Y, Kohro T, Wada Y, Kodama T, Tanaka Y. Rheumatoid synovial endothelial cells produce macrophage colony-stimulating factor leading to osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2007 Apr;46(4):597-603. Epub 2006 Oct 24.
58. Paniagua RT, Chang A, Mariano MM, Stein EA, Wang Q, Lindstrom TM, Sharpe O, Roscow C, Ho PP, Lee DM, Robinson WH. c-Fms-mediated differentiation and priming of monocyte lineage cells play a central role in autoimmune arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(1):R32. Epub 2010 Feb 24.
59. van Amelsfort JM, Jacobs KM, Bijlsma JW, Lafeber FP, Taams LS. CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in rheumatoid arthritis: differences in the presence, phenotype, and function between peripheral blood and synovial fluid. *Arthritis Rheum*. 2004 Sep;50(9):2775-85.
60. de Kleer IM, Wedderburn LR, Taams LS, Patel A, Varsani H, Klein M, de Jager W, Pugayung G, Giannoni F, Rijkers G, Albani S, Kuis W, Prakken B. CD4+CD25bright regulatory T cells actively regulate inflammation in the joints of patients with the remitting form of juvenile idiopathic arthritis. *J Immunol*. 2004 May 15;172(10):6435-43.
61. Appel H, Wu P, Scheer R, Kedor C, Sawitzki B, Thiel A, Radbruch A, Sieper J, Syrbe U. Synovial and Peripheral Blood CD4+FoxP3+ T Cells in Spondyloarthritis. *J Rheumatol*. 2011 Nov;38(11):2445-51. Epub 2011 Sep 15.
62. Leipe J, Grunke M, Dechant C, Reindl C, Kerzendorf U, Schulze-Koops H, Skapenko A. Role of Th17 cells in human autoimmune arthritis. *Arthritis Rheum*. 2010 Oct;62(10):2876-85.
63. Raychaudhuri SP, Raychaudhuri SK, Genovese MC. IL-17 receptor and its functional significance in psoriatic arthritis. *Mol Cell Biochem*. 2012 Jan;359(1-2):419-29. Epub 2011 Sep 6.
64. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006 May 11;441(7090):235-8. Epub 2006 Apr 30.
65. Goodman WA, Levine AD, Massari JV, Sugiyama H, McCormick TS, Cooper KD. IL-6 signaling in psoriasis prevents immune suppression by regulatory T cells. *J Immunol*. 2009 Sep 1;183(5):3170-6.

RINGRAZIAMENTI

Al termine di questi tre anni di lavoro ringrazio il Prof. Leonardo Punzi per avermi accolta nella sua Scuola di Dottorato e il Prof. Ugo Fiocco per avermi dato l'opportunità di sviluppare questo progetto di ricerca,

Un particolare ringraziamento alla Prof.ssa Amelia Ruffatti per la sua disponibilità e l'affetto dimostratomi,

Grazie di cuore ai cari colleghi Paolo Sfriso e Francesca Oliviero per i loro consigli e il prezioso aiuto nella realizzazione di questa tesi,

Grazie infine a tutti i colleghi della Reumatologia per l'amicizia e le allegre risate.