



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA**

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA in

Scienze Mediche Cliniche e Sperimentali

INDIRIZZO: Reumatologia Clinica e Sperimentale

CICLO XX

**Effetti dei Microcristalli di Urato Monosodico  
sull'apoptosi spontanea ed induzione di frammenti  
di DNA instabile nei sinoviociti**

**Direttore della Scuola:** Ch.mo Prof. Silvano Todesco

**Supervisore:** Ch.mo Prof. Leonardo Punzi

**Dottorando:** Dott.Roberto Luisetto

31 Gennaio 2008

*Un Grazie Assoluto alla mia collega di Dottorato, la Dr.ssa Anna Scanu, senza la quale, la realizzazione di questa tesi non sarebbe stata possibile.*

*Grazie anche al Dr. Paolo Sfriso ed alla Dr.ssa Francesca Oliviero per la loro professionalità, preparazione e pazienza avuta nei miei confronti in questi tre anni di corso.*

*Un ringraziamento particolare anche alla Prof.ssa Franca Majone del Dip. di Biologia dell'Università di Padova per avermi concesso la disponibilità di realizzare alcuni importanti fasi dello studio nel suo laboratorio di citogenetica.*

# ABBREVIAZIONI

**AP**=Artrite Psoriasica  
**AR**=Artrite Reumatoide  
**BCP**= Fosfato di Calcio Bibasico  
**BSA** = *bovine serum albumin*  
**CPPD**= Pirofosfato di Calcio bi-idrato  
**DIG-11-dUTP** = digossigenina-11-desossi-Uridin-Tri-Fosfato  
**D-MEM** = *Dulbecco's Modified Eagle Medium*  
**EDTA** = acido etilendiaminotetracetico  
**FITC** = Fluoresceina Isotiocianato  
**HBS** = *Hank's Balanced Salt Solution*  
**HEPES** = 4-(idrossietil)-piperazin 1 etansulfonato acido  
**HUMN**= Human Micronucleus Project  
**IL**=Interleuchina  
**IM**=Indice Mitotico  
**LS**=Liquido Sinoviale  
**MN** = Micronucleo/i  
**NBUD**=*Nuclear Bud* (Vescicola Nucleare)  
**NO**= ossido nitrico  
**NPB**=*Nucleoplasmic Bridge* (ponte citoplasmatico)  
**OA**=Osteoartrosi  
**pb** = paia di basi  
**PI** = Ioduro di propidio  
**PBD** = *Phosphate Buffered Detergent*  
**PBS** = *Phosphate Buffered Salt Solution*  
**rpm** = rivoluzioni per minuto  
**SSC** = *Sodium Solution Citrate*  
**TdT** = terminal deossinucleotidil transferasi  
**TRIS** = tris (idrossimetil) aminometano  
**VES**= Velocità di Sedimentazione Eritrocitaria

## INDICE

|  |        |
|--|--------|
| <b>Riassunto</b>   | pag.1  |
| <i>Summary</i>   | pag.2  |
| <b>La cellula ed i meccanismi di controllo della stabilità genomica</b>                                      | pag.5  |
| <b>Danno genotossico e produzione di frammenti di DNA Instabile</b>  | pag.6  |
| Le rotture a doppio filamento DSB ( <i>double strand breaks</i> ) ed i meccanismi di riparazione.            | pag.6  |
| I micronuclei  | pag.9  |
| I Ponti Nucleoplasmatici (NPB)   | pag.9  |
| Le Vescicole Nucleari ( <i>Nuclear Buds</i> )  | pag.10 |
| Formazione dei Micronuclei attraverso il m<br>“Rottura-Fusione-Ponte “( <i>breakage-fusion-bridge</i> ) BFB. | pag.11 |
| <b>Generalità sull’Apoptosi</b>  | pag.14 |
| Infiammazione e via estrinseca dell’apoptosi   | pag.15 |
| Via mitocondriale dell’apoptosi ed infiammazione   | pag.15 |
| Apoptosi e suo ruolo in alcune patologie infiammatorie   | pag.15 |
| <b>L’Osteoartrosi</b>  | pag.18 |
| <b>L’Artrite Psoriasica</b>  | pag.19 |
| <b>I microcristalli di Urato Monosodico e le patologie</b>   |        |
| <b>Infiammatorie articolari</b>  | pag.20 |
| Caratteristiche dei microcristalli di UMS  | pag.20 |
| I microcristalli di UMS e l’insorgenza dell’infiammazione  |        |
| Acuta  | pag.20 |
| L’infiammazione da microcristalli e l’ipotesi dell’inflammasoma  | pag.22 |
| La risoluzione dell’attacco acuto nelle artropatie indotte da microcristalli                                 | pag.23 |
| <b>Scopo della tesi</b>  | pag.26 |
| Articolazione degli esperimenti  | pag.27 |
| <b>Materiali e metodi</b>  | pag.28 |
| Linee cellulari e metodi di coltura  | pag.28 |
| La linea cellulare CHO   | pag.28 |
| Colture primarie di sinoviociti umani  | pag.29 |
| Sintesi di cristalli di Urato Monosodico   | pag.30 |
| Stimolazione delle colture primarie per mezzo dei microcristalli di UMS                                      | pag.30 |
| Allestimento di preparati interfascici   | pag.30 |
| Colorazione di contrasto del DNA cellulare   | pag.31 |
| Incorporazione <i>in situ</i> a fluorescenza per l’evidenziazione di estremità 3'-OH libere di DNA           | pag.31 |
| Criteri applicati nell’analisi delle cellule mediante test di Tunel ed Incorporazione <i>in situ</i>         | pag.32 |
| Analisi dei vetrini  | pag.32 |
| Criteri applicati per l’analisi citologica dei preparati   | pag.33 |
| Criteri applicati nella conta delle Mitosi aberranti   | pag.33 |

|  |        |
|--|--------|
| <b>Risultati</b>   | pag.34 |
| Frequenza dell'apoptosi  | pag.34 |
| Analisi dell'Indice Mitotico   | pag.37 |
| Quantificazione degli effetti clastogeni indotti dai Microcristalli di UMS | pag.40 |
| Analisi della frequenza delle cellule micronucleate                        | pag.42 |
| Analisi del numero di Ponti Anafasici NPB e delle Vescicole Nucleari NBUD  | pag.45 |
| <b>Discussione e conclusioni</b>   | pag.51 |
| <b>Tavola 1</b>  | pag.54 |
| <b>Tavola 2</b>  | pag.55 |
| <b>Tavola 3</b>  | pag.56 |
| <b>Bibliografia</b>  | pag.57 |

## Riassunto

La deposizione di cristalli di Urato monosodico (UMS) nei tessuti articolari e periarticolari è causa dell'insorgenza di stati infiammatori associati a gotta acuta. Nonostante siano state proposte numerose e differenti ipotesi patogenetiche, dal punto di vista molecolare il meccanismo che sovrintende all'attacco infiammatorio acuto indotto dai microcristalli rimane ignoto.

In questo studio, mediante un modello di infiammazione acuta *in vitro* mediata dai microcristalli di Urato Monosodico, si è cercato di studiare i possibili effetti cito- e genotossico indotti su colture primarie di sinoviociti ottenuti dal liquido sinoviale di 6 pazienti (3 affetti da Osteoartrite e 3 affetti da Artrite Psoriasica)

Lo scopo di questo studio è quello di verificare se l'infiammazione può influire sull'instabilità del genoma delle cellule coinvolte e quali eventuali conseguenze provochi nei sinoviociti relativamente all'incidenza dell'apoptosi, sugli indici di proliferazione, sulle rotture del DNA cromatinico, sulla possibile formazione di frammenti di DNA instabile ed altre figure aberranti come i micronuclei.

Dal punto di vista sperimentale le colture primarie di sinoviociti sono state stimolate per 24 ore con differenti concentrazioni di microcristalli di UMS (0,01 mg/ml; 0,025 mg/ml; 0,05 mg/ml; 0,075 mg/ml; 0,1 mg/ml, 0,25 mg/ml e 0,5 mg/ml).

Inoltre le stesse modalità sperimentali sono state ripetute su una coltura cellulare di cellule epitelioidei CHO di Hamster che rappresenta uno dei sistemi cellulari più utilizzati e standardizzati per studi di mutagenesi *in vitro*.

Per ogni punto sperimentale sono state applicate le seguenti metodiche:

- a) Test di Tunel per lo studio e la quantificazione delle cellule in apoptosi
- b) Incorporazione *in situ* di digossigenina-dUTP per la rilevazione di rotture al DNA nella cellula in interfase e nei frammenti di DNA instabile
- c) Analisi citologica per la determinazione dell'indice mitotico, delle mitosi difettive e di altri parametri citologici di instabilità genomica come la presenza di micronuclei, vescicole nucleari e ponti anafasici.

La stimolazione per 24 ore della linea cellulare CHO di Hamster ha evidenziato come la presenza dei microcristalli di UMS induca su questa popolazione cellulare un effetto di tipo clastogeno. Infatti l'incidenza delle cellule marcate dalla sonda di digossigenina-dUTP, che evidenziano gruppi ossidrilico liberi in posizione 3'-OH all'interno del DNA, aumenta in funzione della dose di stimolazione con i microcristalli di UMS. Lo stesso tipo di andamento veniva rilevato per altre aberrazioni citogenetiche come i MN, le figure mitotiche aberranti, i NPB ed NBUD. Anche le misure relative all'Indice Mitotico evidenziavano una significativa diminuzione della proliferazione cellulare in funzione della dose di microcristalli di UMS utilizzata.

La stimolazione delle colture primarie di sinoviociti da AP e da OA confermava che la stimolazione da parte dei microcristalli induceva un danno al DNA in maniera analoga a quanto osservato in precedenza nel sistema cellulare di controllo CHO.

Per tutte i tipi di danno al DNA considerato tuttavia, i sinoviociti derivati da liquido sinoviale di pazienti con AP hanno evidenziato, a livello basale come in presenza di crescenti stimolazioni di UMS, un'incidenza di danno genomico significativamente maggiore rispetto ai Sinoviociti derivati da OA. Tale maggiore

sensibilità per gli agenti genotossici potrebbe derivare dal fatto che le colture primarie di sinoviociti da AP originano da un liquido sinoviale e , più in generale, da condizioni di infiammazione locale più significative dal punto di vista clinico rispetto a quelli da OA. In presenza di stimolazione con microcristalli di UMS la frequenza delle cellule in apoptosi per la linea CHO e la coltura primaria di sinoviociti da OA subiva un decremento significativo evidenziando valori inferiori al 1% di incidenza sulla popolazione totale. Aumentando la dose di stimolazione la frequenza delle cellule apoptotiche incrementava in funzione della dose , in maniera lineare per la linea CHO, mentre per i sinoviociti da OA l'apoptosi aumentava, mentre per dosi di UMS pari o superiori a 0,1mg/ml diminuiva lievemente.

A livello basale l'apoptosi dei sinoviociti da AP risultava molto inferiore rispetto agli altri sistemi; tuttavia questa coltura primaria rispondeva in maniera analoga alle cellule CHO ed ai sinoviociti AP alla presenza di dosi crescenti di microcristalli UMS.

Osservando questi dati si può ipotizzare che, relativamente all'apoptosi, la presenza di microcristalli di UMS , anche già a concentrazioni di 0,01mg/ml agisca con modalità di tipo "switch on/switch off" inibendo una via molecolare dell'apoptosi, per poi attivarne una alternativa successivamente in maniera sensibile alla dose di stimolazione.

I dati proposti in questo studio, ancorché del tutto preliminari, indicano che questo semplice modello sperimentale può risultare utile per valutare il danno al genoma a carico di cellule e tessuti coinvolti nelle patologie infiammatorie articolari e per valutarne il comportamento e l'evoluzione in queste condizioni.

In prospettiva, analoghi test *in vitro* su cellule ottenute dal liquido sinoviale di pazienti potrebbero essere predittivi dal punto di vista clinico nel valutare preventivamente l'evoluzione di una data popolazione cellulare in condizioni di stress infiammatorio cronico ed acuto e nel comprendere il grado di potenziale citotossicità che un determinato trattamento farmacologico potrebbe indurre a livello cellulare in un dato paziente.

## **Summary**

*The deposition of Urate Monosodium crystals (MSU) in the articular and periarticular tissues is cause of the onset of inflammatory states associated to acute gout. Despite several and different pathogenetic hypotheses proposed, the molecular mechanism that controls the acute inflammatory attack induced by the microcrystals is still unknown.*

*The aim of this study, through a model of acute inflammation in vitro mediated by MSU crystals , is verify the possible cito- and genotoxic effects induced on primary cultures of synoviocytes derived from synovial fluid of 6 patients (3 affected by OA and 3 by AP).*

*The purpose of this research is to determinate if the inflammation can influence the instability of genoma of the involved cells and what are the possible consequences in these cells concern the incidence of the apoptoss, proliferation, DNA integrity, formation of DNA unstable fragments and other aberrant figures as micronuclei.*

*Experimentally the synoviocytes primary cultures have been stimulated for 24 hours with different concentrations of MSU crystals (0,01 mg/ml; 0,025 mg/ml; 0,05 mg/ml; 0,075 mg/ml; 0,1 mg/ml, 0,25 mg/ml and 0,5 mg/ml).*

*The same conditions have been repeated on CHO cells cultures, from Chinese Hamster, that represents one of the cellular systems more used and standardized for studies about in vitro mutagenesis..*

*For every experimental point the followings techniques have been applied:*

*t) TUNEL Test in order to analyze and quantify apoptotic cells*

*b) In situ Incorporation of digoxigenin-dUTP for the staining of DNA breaks in the interphase nuclei and within the fragments of unstable DNA.*

*c) cytological analysis for the determination of the mitotic index, of the defective mitoses and of other cytological parameters of genomic instability as presence of micronuclei, nuclear vesicles and anaphasic bridges.*

*The stimulation for 24 hours of the CHO cell lines of Chinese Hamster has underlined as the presence of the MSU crystals induces on this cellular population a clastogenic effect. In fact the incidence of the cells marked by the digoxigenin-dUTP probe, that localizes in correspondence to free 3'-OH inside the DNA, increases in a dose dependent manner. The same results is noticed for other aberrations as the MN, aberrant mitotic figures, NPB and NBUD. Also the Mitotic index shows a meaningful decrease related on the MSU crystals dose used.*

*The stimulation of the OA and AP derived synoviocytes primary cultures from confirm that, under these conditions, the MSU crystals induced a DNA damage in way analogous to how observed in precedence in CHO cell line used as control system.*

*Nevertheless for all the types of DNA damage considered, the synoviocytes derived from synovial fluid of patients with AP shows, from basal level as in presence of increasing stimulations of MSU crystals, a meaningful incidence of DNA damage greater in comparison to the synoviocytes derived from OA. Such greater sensibility for the potentially genotoxic agents could derive from the fact that the primary cultures from AP originate from a synovial liquid, in general, more inflammatory in comparison to OA derived cells. In presence of stimulation with MSU crystals the frequency of apoptotic cells in CHO cells and OA primary cultures shows a meaningful decrement with values inferior to the 1% of incidence on the total population. Increasing the dose of stimulation the frequency of apoptotic cells increases in function of the dose, in linear way for CHO cell line, while for the OA synoviocytes, apoptosis increases. Subsequently for doses of MSU greater than 0,1mg/ml apoptosis slightly decreases.*

*To basal level apoptosis of the AP synoviocytes results very lower in comparison to the other cultures; nevertheless this primary culture cells respond in a very analogous way to the CHO cells and AP synoviocytes in the presence of increasing doses of MSU crystals.*

*Observing these data can be hypothesized that, relatively to apoptosis, the presence of MSU crystals, also already to concentrations of 0,01mg/ml acts with a "switch on/switch off" way, inhibiting a molecular apoptotic pathway for then subsequently activate an alternative for it in sensitive manner to the dose of stimulation.*

*The data proposed in this study, even certainly still preliminary, indicate that this simple experimental model can result very useful to appraise the DNA damage within joint tissues cell populations involved in the articular inflammatory pathologies and to characterize their behavior and evolution of it under these conditions.*

*In perspective, analogous tests in vitro on cells obtained from the synovial fluid of patients with arthropathies could be predictive, also from the clinical point of view, in to preventively appraise the evolution of a date cellular population under conditions of chronic and acute inflammatory stress and in order to understand the degree of potential cytotoxicity that a determined pharmacological treatment could induce to cellular level in a individual patient.*

## LA CELLULA E I MECCANISMI DI CONTROLLO DELLA STABILITA' GENOMICA

Un aspetto fondamentale per la vitalità non solo della singola cellula ma anche dell'intero organismo nel suo insieme riguarda la fedeltà con cui il DNA genomico della cellula viene conservato.

Tale fedeltà nel preservare la stabilità genomica è molto elevata nei mammiferi ed è garantita dalla presenza di accurati sistemi di controllo e di correzione che preservano stabilmente e in maniera efficace il genoma a fronte degli inevitabili danni derivati dall'azione di agenti genotossici esogeni (radiazioni, mutageni, virus) , endogeni (molecole potenzialmente tossiche derivanti dal normale metabolismo cellulare) oppure per rimediare agli errori dovuti all'attività di sintesi del DNA da parte delle polimerasi, che sono stimabili statisticamente nell'ordine di 1 nucleotide incorporato in maniera errata ogni miliardo di basi incorporate.

Questo controllo della stabilità genomica negli eucarioti è affidato a vari complessi enzimatici impegnati in diversi processi biochimici che interagiscono a volte in maniera anche ridondante fra loro.

La cellula impiega ha affinato nel corso dell'evoluzione differenti dispositivi che operano da veri e propri "guardiani" del genoma; le strutture coinvolte possono essere così riassumibili:

- a) Le DNA polimerasi, che attraverso il *pathway* "enzyme fidelity and proof reading" controllano che la duplicazione del DNA avvenga in maniera esatta e possono intervenire a correggere la sequenza se riconosciuta come non corretta.
- b) I telomeri per il mantenimento dell'integrità strutturale delle terminazioni del cromosoma.
- c) I meccanismi di riparazione delle rotture del DNA (*mismatch repair*, *nucleotide excision repair*, e *base excision repair* per le rotture a singolo filamento, *non homologous end joining* (NHEJ) e la ricombinazione omologa (HR) per le rotture a doppio filamento (DSB).
- d) I *checkpoint* del ciclo cellulare.
- e) I centromeri e il cinetocore per assicurare una corretta segregazione dei cromosomi alle cellule figlie durante la replicazione cellulare.

Qualsiasi agente genotossico che perturbi in maniera rilevante questi meccanismi di controllo ha buone possibilità di provocare effetti disastrosi per la singola cellula e nell'eventualità che il danno venga "fissato" al DNA e in qualche modo generalizzato può essere compromessa la vitalità dell'intero organismo.

## **DANNO GENOTOSSICO E PRODUZIONE DI FRAMMENTI DI DNA INSTABILE**

Dal punto di vista funzionale gli effetti di un danno genotossico si manifestano in alterazioni dell'espressione genica e del ciclo cellulare e conseguentemente del turnover tissutale potenzialmente così dannosi da indurre trasformazione neoplastica delle cellule interessate. Un altro effetto confermato soprattutto da numerosi modelli *in vivo* è quello che riguarda la perturbazione del fisiologico rinnovo tissutale e l'induzione di fenomeni generalizzati di senescenza cellulare (Schmitt et al, 2007). Per molto tempo l'instabilità genomica è stata associata al cancro ed alle patologie virali; solo recentemente si è ritenuto riferire questo fenomeno anche alle malattie reumatiche anche se non è chiaro se l'ambiente infiammatorio sia in grado di indurre un danno di questo tipo.

Il danno al DNA si manifesta dal punto di vista strutturale con la rottura del cromosoma che si concreta con mutazioni puntiformi, anomalie cromosomiche di numero e di struttura quali trisomie, aneusomie, riarrangiamenti e micronuclei.

La rottura del cromosoma o la perdita di parte o dell'intero cromosoma stesso presuppone differenti "disfunzioni" a livello cellulare e molecolare. E' stato dimostrato come in genere il verificarsi di rotture a doppio filamento, DSB, (*double strand breaks*) induca la formazione di frammenti di DNA instabile ed in particolare i MN.

### **Le rotture a doppio filamento DSB (*double strand breaks*) ed i meccanismi di riparazione.**

Le rotture a doppio filamento o DSB (*double strand breaks*) sono le più frequenti rotture del DNA. Questo danno interessa entrambi i filamenti complementari di DNA grossomodo nella stessa posizione e si manifesta in genere a causa dell'esposizione del DNA a svariati agenti genotossici oppure anche in conseguenza a normali processi cellulari come la ricombinazione V(D)J nelle cellule del sistema immunitario dei mammiferi o nella ricombinazione meiotica in tutti gli eucarioti.

Altre eventi che causano DSB sono i fenomeni di trasposizione di elementi mobili presenti nel genoma, i fenomeni di integrazione virale e soprattutto quel fenomeno ancora poco studiato che consiste nell'alternarsi di eventi di blocco e ripristino dei processi di sintesi del DNA in cellule in attiva replicazione (Seigneur et al., 1998). In genere le rotture di tipo DSB sono rilevabili per via indiretta, cioè per mezzo di apposite sonde di DNA coniugate con un cromoforo che si leghino e riconoscano gruppi ossidrilici liberi in posizione 3' nel filamento di DNA.

Una rottura DSB se non viene riparata prontamente dalla cellula può essere potenzialmente letale per la cellula stessa e causare gravi problemi all'organismo intero a causa di riarrangiamenti e aberrazioni cromosomiche, che possono provocare alterazioni nel dosaggio genico e altri fenomeni di instabilità genomica che possono anche essere stabilmente trasmessi alla progenie.

Per mantenere l'integrità del genoma e prevenire la formazione di anomalie cromosomiche gli eucarioti hanno escogitato tre strategie principali ampiamente conservate a livello evolutivo.

Queste strategie consistono nell'unione delle estremità non omologhe o NHEJ (*non homologous end joining*), nella ricombinazione omologa o HR (*homologous recombination*) e nel sistema SSA o *single strand annealing*.

La ricombinazione omologa HR è il sistema di riparazione preferito nel lievito, mentre i mammiferi si affidano alla ricombinazione omologa o alla NHEJ, a seconda del contesto in cui la rottura sia riconosciuta.

Il sistema SSA può essere considerato come una variante di HR e fu per la prima volta proposto per spiegare fenomeni di ricombinazione intramolecolare in plasmidi introdotti in oociti di *Xenopus laevis* e in linee cellulari di mammifero (Lin et al., 1990).

La riparazione mediata da SSA implica l'eliminazione di estremità 5' non omologhe e l'*annealing* di sequenze omologhe, che eventualmente affianchino la DSB e la successiva ligazione (fig.1).

I fattori che regolano lo SSA sono stati individuati solo in *S. Cerevisiae* e appare che il processo sia strettamente dipendente dal complesso Rad50-XRS2-MRE11 (Pastink et al., 2001).

La ricombinazione omologa coinvolge molte proteine altamente conservate in tutti gli eucarioti e correlate evolutivamente con la proteina RecA di *Escherichia Coli*. Nel processo HR la proteina RAD51 ha un ruolo essenziale; infatti *in vitro* questa proteina manifesta attività simili a RecA e se mutata rende le cellule incapaci di effettuare tale ricombinazione (Shinohara et al., 1998).

Il primo stadio della riparazione DSB con il sistema HR implica la formazione di terminazioni a singolo filamento all'estremità 3'.

Una di queste estremità invade un filamento non danneggiato costituendo un eteroduplex con il filamento ricevente. Successivamente entrano in azione vari complessi enzimatici, che correggono gli appaiamenti non corretti in modo che il filamento ricevente divenga perfettamente complementare al filamento donatore.

La successiva replicazione del filamento ricevente e successivi eventi di ligazione completano il processo di ricombinazione omologa.

L'unione di estremità non omologhe coinvolge due complessi multiproteici : la proteinchinasi DNA dipendente composta dalle proteine Ku 80, Ku 70 e DNA PKcs (*DNA phosphokynase catalytic subunit*) che è attivata dopo che l'eterodimero Ku 80- Ku 70 ha riconosciuto la DSB e il complesso XRCC4-DNA ligasi 4 che interviene invece nelle azioni di ligazione (Jeggo et al., 1998).

Nella figura 8 è stato schematizzato il modello di riparazione NHEJ in seguito a rottura dovuta ad agenti genotossici.

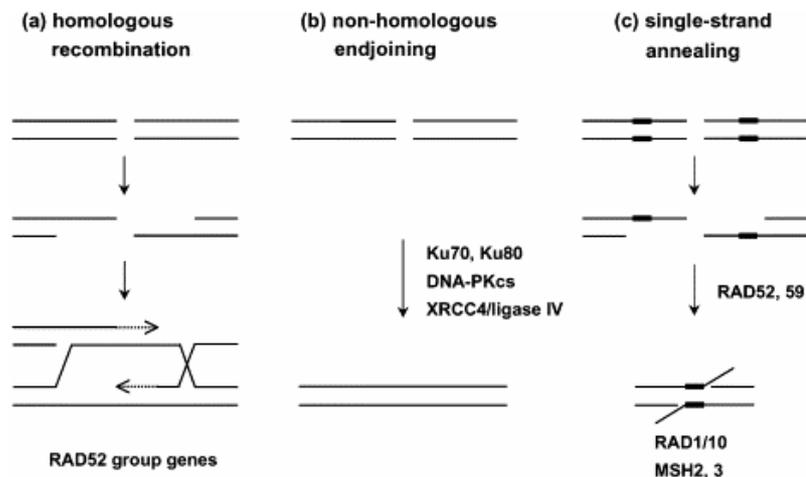
In questo modello le DSB sono riconosciute dall'eterodimero Ku80-Ku70 e dalla DNAPKcs. Il complesso multiproteico Ku80-Ku70-DNAPKcs agisce come "ancora" per il complesso XRCC4-DNA ligasi 4 che con modalità ancora sconosciute dovrebbe portare alla riparazione della struttura.

Fig. 1 Strategie utilizzate dalle cellule eucariotiche per affrontare le rotture DSB.

a) Nel processo HR si costituiscono due estremità 3' sporgenti; una estremità invade una sequenza omologa non danneggiata e attraverso un meccanismo di conversione genica viene restaurata la sequenza originale del DNA danneggiato.

b) NHEJ e fattori implicati (vedi figura 8).

c) il *pathway* SSA implica l'esposizione di regioni omologhe durante l'azione delle esonucleasi in 5'. La successiva azione di RAD52 e MSH2/3 porta all'eliminazione dei segmenti non omologhi ed alla ligazione (Sedelnikova et al., 2003).



DANNO GENOTOSSICO

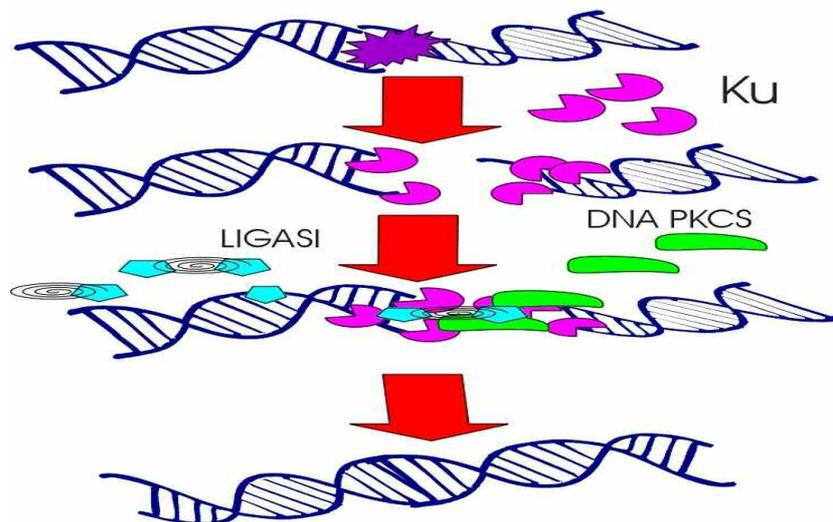


Fig. 2. Nel processo NHEJ l'estremità rotte vengono riconosciute dall'eterodimero Ku70-Ku80, che ne impedisce la degradazione ed il coinvolgimento in riarrangiamenti; la proteina DNAPKcs si lega all'eterodimero ed al DNA solo in un momento successivo e va a costituire una piattaforma proteica che può essere riconosciuta dalla XRCC4-Ligasi4, che salderà infine le molecole di DNA.

## **I Micronuclei**

Una delle strutture aberranti che più frequentemente si osservano in caso di danno al DNA è rappresentata dai micronuclei (MN).

Osservati per la prima volta da Howell nel 1891, i micronuclei sono costituiti da frammenti cromosomici avvolti da membrana nucleare e, in condizioni normali, rappresentano un evento abbastanza eccezionale; mentre possono essere indotti *in vivo* e *in vitro* dall'azione di svariati agenti genotossici. In genere i MN si trovano in prossimità del nucleo interfascio da cui presumibilmente derivano e si generano in ragione di rotture cromosomiche di tipo DSB oppure da disfunzioni a carico del fuso mitotico o da errori che intercorrono durante la fase M nella segregazione dei cromosomi. Nel 1971 Boller e Schmid pubblicano i primi studi in cui si propone la caratterizzazione dei MN insieme alle altre aberrazioni genomiche come metodo per valutare l'instabilità genomica.

La formazione dei micronuclei (MN) è ritenuta informativa nei modelli di epidemiologia molecolare come marcatore attendibile di danno cromosomico ed di instabilità genomica tanto da essere estensivamente utilizzato negli studi di tossicologia (Iarmarcovai et al, 2008). Recenti considerazioni che hanno preso in considerazione 35 studi policentrici di ambito citotossicologico hanno sottolineato come i polimorfismi genetici possano condizionare il grado di danno cromosomico associato con le esposizioni intra- ed extra-cellulare degli agenti genotossici. Altri fattori di ordine metodologico quali la numerosità del campione, stile di vita dei soggetti considerati, età, genere, etnicità ed il tempo/dose di esposizione allo stimolo hanno confermato la validità del MN e delle altre aberrazioni cromosomiche come indicatori di danno genomico; più contraddittori invece gli studi che hanno tentato di associare il danno genomico con il genotipo (Bonassi et al, 2005).

Nonostante diverse ipotesi il destino dei MN e del DNA genomico in essi contenuto rimane scarsamente compreso, anche se, alcune indicazioni sperimentali eseguite precedentemente a questo studio indicano che il DNA contenuto nel MN possa andare incontro ad uno o più cicli di sintesi/replicazione dopo l'espulsione del nucleo (Dati non pubblicati).

## **I Ponti Nucleoplasmatici (NPB)**

Si ritiene che gli NPB si originino quando i centromeri di un cromosoma di centrico sono spinti ai poli opposti della cellula durante l'anafase. E' praticamente impossibile osservare un NPB prima che la membrana nucleare si riformi in quanto l'anafase e la telofase procedono rapidamente e solo con il completamento della citocinesi con la formazione delle due cellule figlie si può rilevare la formazione del NPB. Successivamente l'NPB si può rompere portando alla formazione di uno o più MN. La rilevazione di questa aberrazione è ritenuta significativa di cattiva riparazione di danno genomico e di eventuale fusione telomerica (fusione di tipo *end to end* fra cromosomi diversi con estremità

adesive). La conta degli NPB è stata recentemente valicata come indice di instabilità genomica *in vitro* in varie linee cellulari trattate con diversi radicali liberi dell'ossigeno (Fenech, 2000).

### **Le Vescicole Nucleari (*Nuclear Buds*)**

I Mn possono originare anche dalle vescicole nucleari o *Nuclear Buds* (NBUD). Queste strutture sono state osservate *in vitro* in condizioni fortemente stressanti ed in caso di infezione da retrovirus in fase litica. Shimizu e colleghi hanno evidenziato come la formazione di tali gemmazioni, del tutto assenti in condizioni normali, è indice di danno generico al DNA ma anche di amplificazione del DNA. Questa osservazione è derivata dal fatto che nelle colture che presentano NBUD il contenuto di DNA è sempre maggiore in maniera significativa rispetto ai controlli. Pertanto si è recentemente ipotizzato che la presenza di NB siano indicative anche di una probabile alterazione dell'espressione genica a carico delle cellule che manifestano tali strutture, considerando che uno degli effetti più significativi e più deleteri per il genoma in seguito a danno al DNA è l'amplificazione delle sequenze. (Shimizu et al, 2005, Fenech et al, 2006). In particolare l'amplificazione genica riveste un ruolo importante oltre che nell'alterazione dell'espressione genica e del ciclo cellulare anche nella progressione tumorale e nella resistenza a farmaci come ad esempio il metotrexate.

Mediante studi effettuati attraverso ibridazione *in situ* e di citologia in microscopia elettronica che il DNA amplificato per errore o in seguito a danno genomico, sia selettivamente localizzato in siti specifici alla periferia del nucleo oppure eliminato attraverso la formazione delle vescicole nucleari fino a formare MN durante la fase S della mitosi. Il DNA così amplificato potrebbe essere eliminato o attraverso la ricombinazione omologa analogamente a quanto avviene per le rotture DSB oppure essere exciso e segregato in specifiche regioni all'interno del nucleo. A questo punto con la successiva replicazione il DNA sovranumerario verrebbe eliminato a formare un MN.

Questa ipotesi è stata recentemente avvalorata dal fatto che i MN rilevati in linee cellulari con una significativa incidenza di NB esibivano una morfologia ed una positività del tutto identica a quella osservata per i corpi apoptotici nella cellula in apoptosi. (Shimizu et al, 2000; Serrano Garcia e Montero Montaya, 2001).

Anche se l'esatto meccanismo molecolare che fa originare alcuni MN dalle NBUD non è ancora conosciuto, tuttavia è ormai accettato che la presenza di NBUD fornisce quindi 3 tipi di indicazioni così riassumibili:

- 1) l'effettiva presenza di danno al DNA
- 2) la presenza concomitante di amplificazione di DNA genomico
- 3) l'azione efficace di meccanismi di riparazione del danno.

## **Formazione dei Micronuclei attraverso il meccanismo “Rottura-Fusione-Ponte” (*breakage-fusion-bridge*) BFB.**

Secondo il modello denominato BFB (da *breakage-fusion-bridge*) un danno al DNA (ad esempio una rottura di tipo DSB) può indurre la formazione di 3 frammenti di DNA instabile: un cromosoma dicentrico (cioè dotato di 2 centromeri) formato dall'attaccamento delle estremità adesive adiacenti dei due cromosomi e dai due frammenti distali rispetto al centromero separati dal cromosoma di fusione neoformato (Fig .3). Durante la fase S in cui avviene la replicazione del DNA il cromosoma dicentrico viene anch'esso normalmente replicato e con la successiva entrata in fase M del ciclo cellulare e più precisamente durante l'anafase il cromosoma di fusione subirà la tensione delle fibre del fuso per cui ognuno dei due centromeri viene attirato ai poli opposti della cellula in divisione come avviene in una divisione cellulare normale.

Chiaramente, essendo ora fusi in un unico cromosoma aberrante i due cromatidi non sono più in grado di separarsi completamente e segregare fra le future cellule figlie ma daranno origine al ponte nucleoplasmatico NPB.

Con il procedere della citocinesi ed il completo compimento della divisione cellulare le due cellule figlie tenderanno a separarsi completamente per cui il ponte NPB sarà sottoposto ad una tensione per cui , molto probabilmente arriverà a spezzarsi in maniera asimmetrica. Il risultato sarà quindi che entrambe le cellule figlie possiederanno 2 cromosomi con almeno un'estremità adesiva; ed in una delle due cellule figlie un cromosoma avrà acquisito sequenze geniche; mentre nell'altro caso si osserverà una delezione delle sequenze o una vera e propria situazione di aneuploidia.

A questo punto la cellula il cui DNA ha acquisito sequenze dalla rottura del ponte NPB ,non solo per l'azione della nuova estremità adesiva potrà dare origine ad un nuovo ciclo BFB , ma probabilmente incorrerà in un primo ciclo di amplificazione delle sequenze acquisite. E' noto infatti che alla base dell'amplificazione genica sta il principio per cui sequenze eterologhe ma simili o identiche per composizione nucleotidica hanno maggior probabilità di apparirsi erroneamente fra loro e di endoreduplicarsi in fase S formando così sequenze genomiche sovrannumerarie. E' stato ragionevolmente proposto che questo ciclo BFB possa avere termine mediante la formazione di un cromosoma ad anello acentrico (che quindi non verrà riconosciuto dalle fibre del fuso in fase M) o nella formazione di frammenti instabili del tipo *double minutes* ed eliminati alla mitosi successiva a formare micronuclei passando per una NBUD.

Il ciclo BFB come fonte di produzione di frammenti di DNA instabile è stato validato e standardizzato stimolando la linea cellulare CHO di Hamster in alcune significative situazioni di stress genotossico come infezione virale litica, stress da radiazioni ionizzanti *high energy*, da radicali liberi dell'ossigeno e da carenza nutrizionale (IAEA 1986; Toledo et al, 1992; Shimura et al, 1999; Ma et al, 1993).

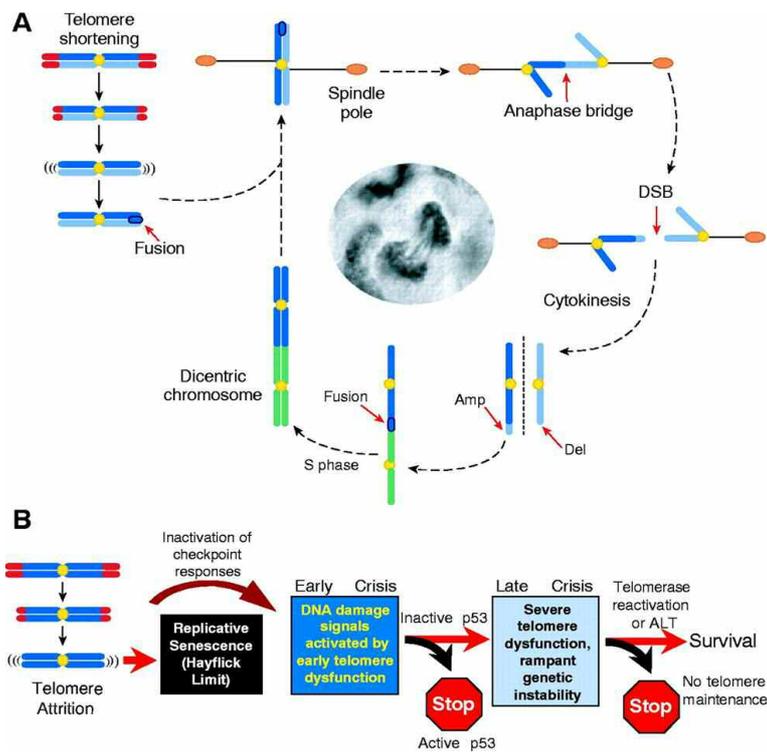


Figura 4. parte A. Schema riassuntivo della formazione dei frammenti di DNA instabile, riarrangiamenti cromosomici ed NPB, delezioni ed amplificazioni di materiale genico.. Da *The Age of Cancer* a cura di De Pinho (2004)

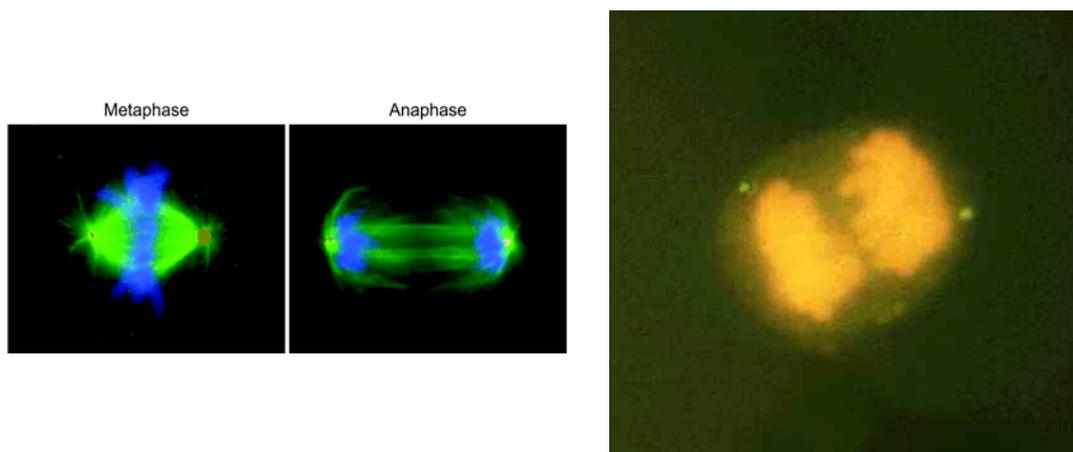


Figura 5. Confronto fra figure mitotiche normali ed anomale. Sulla sinistra immagine di Metafasi ed Anafase normali. I cromosomi (in azzurro) appaiono segregare perfettamente guidati dalle fibre del fuso. Da AAVV. *Biologia Molecolare della Cellula*, 1995. Sulla destra metafase in cui appaiono due frammenti di DNA instabile frutto di ciclo BFB; (da Majone et al, 2004).



induttore mentre la formazione dell'eterodimero Bax-Bcl-2 inibisce l'apoptosi. (Antonsson et al, 1997; Brady e Gil Gomez, 2008).

Dal punto di vista della dinamica dell'infiammazione due *pathway* biochimici appaiono preponderanti: la via estrinseca dell'apoptosi altrimenti denominata anche come “*death receptor pathway*” e la via intrinseca o dell'apoptosi mitocondriale.

### **Infiammazione e via estrinseca dell'apoptosi**

La via estrinseca può essere innescata dalla presenza di citochine pro-infiammatorie come il TNF-alpha, IFN-gamma e FasL. (Bodmer et al, 2002; Ashkenazi et Dixit, 1999; Varfolomeev et Ashkenazi, 2004; Brave et al, 2005; Adam-Klages et al, 2005).

Nel caso del TNF-alpha questa citochina si lega in forma trimerica al proprio recettore della cellula bersaglio. L'associazione ligando-recettore porta al reclutamento di TRADD, una proteina cosiddetta adattatrice che interagisce a sua volta con FADD attraverso il suo “*death domain*”.

Analogamente al TNF-alpha, FasL si lega anch'esso sottoforma trimerica al proprio recettore specifico Fas ed interagisce, sempre via TRADD, con FADD.

Il complesso multiproteico neocostituito [ligando]<sub>3</sub>-Recettore-FADD recluta ed attiva la Caspasi 8 che innescherà la vera e propria “cascata” biochimica che porta all'apoptosi.

### **Via mitocondriale dell'apoptosi ed infiammazione**

Questa via dell'apoptosi, comunemente definita come “intrinseca” viene innescata dall'inibizione di fattori antiapoptotici come BCl<sub>2</sub> e BCl<sub>x1</sub> ed induce la depolarizzazione della membrana mitocondriale esterna. Questo cambio di differenza di potenziale a livello di membrana esterna porta al collasso dei sistemi membranosi del mitocondrio ed al successivo rilascio del citocromo c nel citoplasma ed alla attivazione della Caspasi 9 che attiva la cascata vera e propria dell'apoptosi.

Kulkarni e colleghi hanno recentemente dimostrato che questa via “intrinseca” dell'apoptosi è iperattivata nell'ambito di un modello sperimentale di Sindrome di Sjogren. Infatti questi autori hanno rilevato che uno degli autoantigeni tipici di questa sindrome, l'alfa2-Spettrina agisce in maniera preferenziale per la via intrinseca e potrebbe contribuire all'induzione massiva dell'apoptosi a carico dell'epitelio delle ghiandole salivari. (Kulkarni et al, 2006).

### **Apoptosi e suo ruolo in alcune patologie infiammatorie**

L'apoptosi sembra essere essenziale nella *clearance* delle cellule infiammatorie potenzialmente dannose e per la successiva risoluzione dell'infiammazione. Nell'ambito delle patologie infiammatorie articolari l'apoptosi è stata particolarmente indagata nei neutrofili e nei condrociti nell'Osteoartrosi, e

nell'epitelio delle ghiandole salivari nella sindrome di Sjogren e nell'Artrite Reumatoide. La morte cellulare programmata è stata anche associata con l'insorgenza e la progressione di alcune malattie autoimmuni (Hall et al, 2004; Mahoney et Rosen, 2005).

In particolare i neutrofili durante la risoluzione spontanea dell'infiammazione vanno incontro ad apoptosi e vengono rimossi dall'azione dei macrofagi. Tuttavia la propensione all'apoptosi dei neutrofili risulta strettamente influenzata dalle modalità dell'infiammazione. Infatti è stato dimostrato che la presenza di fattori infettivi, cristalli di Urato Monosodico come nella gotta, citochine pro ed anti infiammatorie e stimoli pro-apoptotici come il TNF- $\alpha$  alterano in maniera significativa l'incidenza dell'apoptosi in questa popolazione cellulare (Savill et al, 1990; Ceponis et al, 1999; Jonsson et al, 2005; Rossi et al, 2007). Considerata la complessità delle vie molecolari e dei relativi sistemi di controllo che sovrintendono all'apoptosi, gran parte dei *network* che mettono in relazione la morte cellulare programmata con i meccanismi patogenetici dell'infiammazione rimangono ignoti.

Nella sindrome di Sjogren gli autoanticorpi del siero diretti contro diversi antigeni nucleari e citoplasmatici possono indurre l'attivazione dei processi apoptotici (Alarcon-Segovia et al, 1979; Vlahakos et al, 1992, Mountz et al, 1999). Questa iperattivazione dell'apoptosi ha un duplice effetto:

- a) l'epitelio ghiandolare risulta ipersensibilizzato ad entrare in apoptosi che così provoca diffusi effetti citopatici nell'epitelio della ghiandola salivare (Humphreys-Beher et al, 1999)
- b) al contrario i linfociti che infiltrano il tessuto ghiandolare appaiono resistenti agli stimoli pro-apoptotici in maniera significativa (Lorenz et al, 2000).

Il ligando solubile Fas (SFasL) induce l'apoptosi dei sinoviociti e regola l'angiogenesi delle cellule endoteliali nell'artrite reumatoide (Kim et al, 2007)

Numerose evidenze sperimentali hanno evidenziato come l'apoptosi rivesta un ruolo fondamentale nella proliferazione, controllo ed attivazione dei Linfociti T. Uno sbilanciamento nel processo apoptotico con un incremento del tasso di sopravvivenza di linfociti T autoreattivi potrebbe indurre l'insorgenza di fenomeni autoreattivi persistenti.

Il fattore antiapoptotico Bcl-2 è iperespresso in numerose neoplasie nel SLE, ed in altre patologie autoimmuni (Aringer et al 1994) e potrebbe essere responsabile della resistenza dei linfociti T alla morte cellulare indotta dall'azione di steroidi come è già stato precedentemente dimostrato in alcuni modelli *in vitro* in cui la resistenza agli steroidi era correlata con l'elevata espressione della proteina Bcl-2 (Caron-Leslie et al, 1994).

L'espressione di Bcl-2 è regolata dall'interazione di alcune citochine come IL-2, IL-4, IL-7 e IL-15 ed i rispettivi recettori e trasduttori di segnale evidenziando quindi una possibile e significativa interazione funzionale fra le Citochine infiammatorie e l'apoptosi (Akbar et al, 1996, Manicassamy et al, 2007). In particolare Linfociti T da sangue periferico da pazienti affetti da Sclerosi Sistemica si sono dimostrati resistenti a differenti stimoli pro apoptotici e tale resistenza potrebbe rivestire un ruolo di rilievo nella patogenesi della Sclerosi

Sistemica (Cipriani et al, 2006). Nel caso dei linfociti è stato individuato l'antigene Fas come fattore chiave nell'induzione dell'apoptosi.. Fas appartiene alla superfamiglia recettoriale TNF ed è una proteina espressa in maniera ubiquitaria.

In futuro lo studio delle relazioni che intercorrono fra l'azione delle citochine e il controllo funzionale e genetico dell'apoptosi contribuiranno a chiarire il ruolo dell'apoptosi nel processo infiammatorio.

In prospettiva anche l'induzione specifica dell'apoptosi delle cellule coinvolte nell'infiammazione potrebbe rivestire un ruolo futuro nel trattamento delle patologie infiammatorie.

## L'Osteoartrosi

L'Osteoartrosi (OA) è la patologia articolare cronica più comune fra la popolazione anziana ed è causa di sofferenza cronica e di frequente disabilità. La caratteristica principale nell'OA è la progressiva perdita di cartilagine articolare dovuta all'incapacità dei condrociti di provvedere un sufficiente *turn over* tessutale e di rinnovare le molecole costituenti la matrice cartilaginea extracellulare. L'OA è una malattia multifattoriale a lento decorso in cui la combinazione di fattori genetici, ormonali e biomeccanici assieme all'invecchiamento contribuiscono all'insorgenza di questa patologia. Anche se l'esordio dell'OA è a carico della cartilagine articolare che copre la superficie portante del giunto diartrodiale, tutti i tessuti dell'articolazione (cartilagine, osso subcondrale e membrana sinoviale) sono coinvolti nell'insorgenza della patologia.

Fra i vari fattori coinvolti nella patogenesi dell'OA recentemente è stata posta attenzione sull'apoptosi dei condrociti e sui relativi stimoli che la inducono, in particolare rispetto alcune Citochine pro-infiammatorie e l'ossido nitrico. Questi studi hanno evidenziato come livelli anomali di Citochine pro-infiammatorie, fattori di crescita ed altre molecole derivate dalla degradazione della cartilagine articolare in corso di OA influenzino significativamente i condrociti nel mantenimento dell'omeostasi tissutale a livello articolare. (Aigner et al, 2007; Kim e Blanco, 2007). In particolare è stato evidenziato come una aumentata produzione di ossido nitrico inducibile sia responsabile dell'incremento dell'apoptosi (Ghosh et al, 1994; Smith et al 1997; Loeder et al, 2000).

Dal momento che i condrociti sono responsabili della sintesi della matrice extracellulare a livello della cartilagine articolare, il loro limitato *turnover* pregiudica il rinnovo e la funzionalità della cartilagine articolare il cui metabolismo è strettamente regolato e finalizzato al bilanciamento di degradazione e risintesi dei vari componenti della matrice.

Inoltre in corso di OA, i condrociti rispondono meno ai fattori di crescita come IGF-1 e TGF- $\beta$  e sono esposti ai vari prodotti derivanti dal catabolismo stesso della cartilagine articolare. Questi prodotti vengono rilasciati nel liquido sinoviale e possono indurre ed amplificare la risposta infiammatoria nella membrana sinoviale stessa (Smith et al, 1997).

La membrana sinoviale così attivata, attraverso l'azione dei macrofagi residenti, richiama dal circolo periferico neutrofili che inducono ed amplificano una sinovite per mezzo del rilascio di citochine infiammatorie, PGE<sub>2</sub>, proteinasi, radicali liberi dell'ossigeno ed ossido nitrico nei tessuti immediatamente adiacenti o nel liquido sinoviale.

Queste molecole possono a loro volta agire sui condrociti e sui sinoviociti modificandone il metabolismo ed amplificando ancor di più l'infiammazione mediante ulteriore rilascio di cataboliti (Evans et al 1996).

Al di là di queste indicazioni il ruolo dell'ossido nitrico come induttore di apoptosi nella patogenesi dell'OA come in generale di infiammazione articolare acuta rimane controverso.

Ancora invece scarsa attenzione è stata posta sul ruolo dei sinoviociti nella patogenesi dell'OA ed in che modo lo stimolo infiammatorio ne perturbi il normale metabolismo ed il loro *turnover* a livello tissutale

## **L'Artrite Psoriasica**

L'Artrite Psoriasica (AP) è una patologia infiammatoria cronica che colpisce circa l'1% della popolazione mondiale. Associata alla Psoriasi, il decorso dell'AP è varia da forme lievi a forme fortemente destruenti per l'articolazione. Solitamente l'AP è sieronegativa per il fattore reumatoide e può presentarsi nella forma oligoarticolare, spondilite, sacroilite, artrite delle articolazioni interfalangee distale o come artrite mutilante nelle forme più gravi.

Anche se l'eziologia rimane ignota, si ritiene che l'AP, come anche la Psoriasi siano causate da una combinazione di fattori genetici ed ambientali (Gladman e Brockbank, 2000)

Numerose evidenze sperimentali indicano che l'immunità innata riveste un ruolo essenziale nell'insorgenza della malattia. Infatti sia nelle lesioni cutanee che in quelle articolari sono state rilevate diverse sottopopolazioni di Linfociti T e cellule dendritiche, mast-cellule e granulociti che giustificano questa ipotesi. Secondo questo scenario patogenetico uno stimolo di natura sconosciuta potrebbe attivare l'immunità innata attraverso l'azione delle cellule dendritiche. Nonostante diverse ipotesi e come per altre patologie infiammatorie ed autoimmuni la natura esatta di questo stimolo che viene riconosciuto dalle cellule dendritiche non è stata ancora definita. Le cellule dendritiche successivamente migrano nei linfonodi, presentano l'eventuale antigene ai linfociti T che saranno co-stimolati sia attraverso il contatto recettore-complesso MHC antigene che la relazione CD28/CD80/86. I linfociti T così attivati proliferano e migrano nell'articolazione. Nella membrana sinoviale i linfociti T esprimono IFN- $\gamma$  ed altre citochine proinfiammatorie che stimolano macrofagi, fibroblasti, condrociti, osteoclasti e linfociti B. Secondo questo modello i macrofagi e le mast-cellule attivate rilasciano nuovamente varie citochine infiammatorie fra cui in particolare IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ . In particolare il TNF- $\alpha$  sembra avere un ruolo centrale amplificando gli effetti delle citochine infiammatorie e stimolandone ulteriormente l'espressione ed il rilascio da parte di mast-cellule, sinoviociti e richiamando nel sito della flogosi ancora cellule infiammatorie attivate (Gordon e Galli, 1990; Walsh et al, 1991).

Il ruolo di TNF- $\alpha$  è anche confermato dall'efficacia terapeutica che riveste la sua inattivazione da parte di anticorpi monoclonali anti-TNF- $\alpha$  ad alta affinità o che ne impediscono l'associazione con il suo recettore specifico (Weinberg et al, 2005; Gordon e Ruderman, 2006).

# **I Microcristalli di Urato Monosodico e le patologie infiammatorie articolari**

La deposizione di cristalli di Urato Monosodico (UMS) nei tessuti articolari e periarticolari è causa di infiammazione articolare acuta. L'associazione fra la deposizione di cristalli di Urato Monosodico nello sviluppo di infiammazione cronica e acuta in questi tessuti è stata descritta per la prima volta da Freudweiller nel 1899.

In particolare fra le artropatie da microcristalli la gotta si manifesta specificatamente con una elevata concentrazione di Urato nel siero e deposizione di microcristalli di UMS nelle articolazioni durante i ricorrenti attacchi di dolore articolare acuto.

Gotta e Psudogotta sono quindi caratterizzate da episodi di sinovite acuta con spontanea risoluzione dell'attacco. Queste artropatie in genere tendono a cronicizzarsi ed indurre un danno erosivo a carico dei tessuti articolari e periarticolari.

## **Caratteristiche dei microcristalli di UMS.**

I microcristalli di Urato Monosodico (UMS) hanno superficie irregolare e rugosa ed inoltre hanno una significativa capacità di legarsi alle IgG grazie alla loro carica di superficie negativa che favorisce l'adsorbimento delle estremità Fab delle IgG, caricate invece positivamente, aumentando la capacità dei cristalli di UMS di innescare la flogosi (Bardin et al, 1984). Il rivestimento di IgG induce di conseguenza la fagocitosi dei cristalli da parte delle cellule specializzate. I cristalli di UMS si associano anche alla proteina C reattiva o direttamente ai fattori del complemento C1q; C1r e C1s e la convertasi C5 (Terkeltaub et al, 1988; Fields et al, 1983). In particolare è stato dimostrato come i microcristalli di UMS siano in grado di attivare il complemento sia per la via alternativa che per quella classica anche se rimane controverso il ruolo ed il contributo dei microcristalli nell'induzione di infiammazione acuta (Schiavon et al. 1987; *reviewed by* Oliviero e Punzi 2003). E' stata provata anche l'associazione con la fibronectina, il fibrinogeno, alcuni enzimi lisosomiali, il fattore di Hageman e le Apolipoproteine. (Terkeltaub et al, 1983).

Fra queste ultime in particolare l'Apolipoproteina E , prodotta dai Sinoviociti sembrerebbe che , una volta associata con i microcristalli di UMS , inibisca la fagocitosi di questi da parte dei macrofagi e probabilmente dei sinoviociti inibendo e limitando l'attacco infiammatorio stesso (Ortiz.Bravo et al, 1994).

## **I microcristalli di UMS e l'insorgenza dell'infiammazione acuta.**

A livello articolare l'adsorbimento delle IgG alla superficie dei cristalli di UMS stimola attraverso l'azione dei recettori Fc sui sinoviociti e sui macrofagi del *lining* sinoviale e sui monociti circolanti la fagocitosi dei cristalli stessi, l'espressione ed il rilascio di numerosi mediatori dell'infiammazione.

I cristalli di UMS inducono così la secrezione di numerose citochine pro-infiammatorie come l'Interleuchina (IL)-1, *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) , Interleuchina (IL)-8, IL-1B, IL-6 ed il fattore di chemotassi dei monociti MCP-1. Tra queste TNF- $\alpha$ ; IL-8, e IL-6 sono prodotte da macrofagi attivati (Guerne et al, 1989; Di Giovine et al, 1987).

Inoltre è stato proposto che le cellule della membrana sinoviale ed le cellule della linea monociti-macrofagi ad esprimere IL-18 a livello articolare (Inokuchi et al, 2006). L'Interleuchina-18 induce la produzione di Interferone  $\gamma$  , in presenza di IL-12 ed agisce quindi da moltiplicatore e "catalizzatore" dell'infiammazione acuta incrementando l'attività delle cellule NK, l'azione delle TH-1 e la produzione di IL-4, IL-5, IL-10 ed IL-13 dalle cellule T ed NK stesse reclutate (Miller e Breisford, 1993; Okamura et al, 1995). In questo modello proposto IL-8 assieme con il fattore ELAM (*endothelial Leukocyte Adhesion Molecule*)-1 e con IL-18, prodotto dai sinoviociti e dai macrofagi promuoverebbe anche l'accumulo di neutrofili a livello articolare in sinergia con altri fattori come la *Macrophage Inflammatory Protein* (MIP)-1 $\alpha$  ed alla Chemochina derivata dai Cheratinociti (KC) .

L'azione concomitante di queste molecole ha la funzione di potente fattore di reclutamento leucocitario, che sarebbe cruciale per dar corso alla infiammazione acuta a livello articolare come anche eventualmente a livello sistemico (Garcia Ramallo et al, 2002).

Una volta arrivati nel distretto articolare dalle venule post-capillari i neutrofili fagocitano i cristalli di UMS "rivestiti" di IgG e li internalizzano nei fagolisosomi. I cristalli di UMS attivano i neutrofili per mezzo di una tirosina chinasi specifica che induce attraverso l'incremento citoplasmatico di Ca<sup>++</sup> la produzione di numerose sostanze che, attraverso il loro rilascio, sostengono il processo infiammatorio come alcune proteasi lisosomiali, leucotrieni, il *Crystal-induced chemotactic factor* , alcuni radicali liberi e soprattutto IL-8 (Gaudry et al, 1993, Liotè et Bardin, 1995).

Recentemente Jaramillo e colleghi hanno considerato gli effetti del rilascio di ossido nitrico da parte dei macrofagi attivati in risposta alla presenza dei cristalli di UMS.

In particolare hanno evidenziato che i microcristalli di UMS da soli non sono in grado di sostenere la produzione di ossido nitrico ma tuttavia i livelli di ossido nitrico possono aumentare significativamente in presenza di IFN- $\gamma$  attraverso l'azione di fattori di trascrizione pleiotropici come ERK  $\frac{1}{2}$  ed Nf-kb (Jaramillo et al, 2004). Inoltre la presenza di elevate quantità di NO nell'articolazione in caso di infiammazione acuta potrebbe contribuire al danno tissutale stimolando la degradazione della matrice cartilaginea , amplificando l'attività delle metalloproteinasi ed alterando il ciclo cellulare, gli indici di proliferazione e l'apoptosi spontanea di sinoviociti e condrociti (Jaramillo et al, 2004).

E' stato dimostrato inoltre che i cristalli di UMS inibiscono l'apoptosi spontanea ed indotta nei neutrofili potenziando la risposta infiammatoria. Tuttavia non è noto l'effetto dei cristalli sull'apoptosi dei sinoviociti, cellule che svolgono un ruolo fondamentale nello scatenamento del processo flogistico.

Gli effetti dei microcristalli di UMS si manifestano anche a carico dell'endotelio dei vasi in prossimità dell'articolazione. Infatti TNF- $\alpha$  e IL-1 inducono a loro volta l'endotelio a produrre molecole come la Selectina E, I-CAM (*intercellular*

*adhesion molecole*)-1, V-CAM (*vascular cell adhesion molecole*)-1 che agendo da fattori di adesione vascolare stimolano fortemente l'afflusso di leucociti circolanti nel sito dell'infiammazione.

### **L'infiammazione da microcristalli e l'ipotesi dell'Inflammasoma**

Recentemente Shi e colleghi hanno dimostrato che il rilascio di Urato da cellule danneggiate in seguito a necrosi o a condizioni di stress locale attiva il sistema immunitario (Shi et al, 2003). In particolare i microcristalli di UMS attiverebbero l'immunità innata e questa attivazione starebbe alla base della patogenesi della gotta e dell'infiammazione acuta da UMS.

Esistono infatti due tipi di stimoli in grado di attivare l'immunità innata: i PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*) che sono costituiti da stimoli molecolari di origine microbica ed i DAMPs (*danger associated molecular patterns*) in cui sono compresi altri stimoli di pericolo come molecole *self* ma riconosciute come pericolose ed i cristalli di UMS.

Secondo questo modello i microcristalli di UMS verrebbero riconosciuti da uno specifico *Toll-like-receptor* (TLR) ancora sconosciuto (Liu Bryan et al, 2005). Infatti lo studio di tutti i possibili TLR finora descritti (TLR-1, 2, 4, 6, 7, 8, 9 e 11) ha messo in evidenza che nessuno di questi TLR candidati riconosce i microcristalli di UMS (Shi et al, 2006).

Altre molecole recettoriali candidati alla stimolazione da parte dei microcristalli UMS sono IL-1R, IL-18R, CD16, i recettori del complemento sulla superficie cellulare dei neutrofili ed infine il complesso delle integrine di membrana Gp116/III sulle piastrine (Jacques et Ginsberg, 2007).

Martinon e colleghi hanno evidenziato come i microcristalli di Urato Monosodico assieme ai cristalli di CPPD e BCP stimolino la Caspasi -1 ed attiva l'Inflammasoma NALP-3 e la proteina adattatrice ASC. L'inflammasoma, una volta attivato processa enzimaticamente la proteina pro-IL 1  $\beta$  che è un precursore dell'IL-1 $\beta$ . con la produzione finale dell'IL-1 $\beta$  che verrà successivamente secreta nell'ambiente extracellulare (Martinon et al, 2006).

Come è noto IL-1 $\beta$  è una citochina altamente infiammatoria che ha un ruolo fondamentale nello scatenamento del processo flogistico.

Il meccanismo attraverso il quale i microcristalli di UMS e CPPD, riconosciuti da specifici recettori di superficie e/o successivamente fagocitati attivino NALP3 rimane da chiarire; tuttavia è stato evidenziato che :

- a) l'inflammasoma non si attiva se la cellula è stimolata da altre molecole simili per struttura ai cristalli di Urato Monosodico per cui l'inflammasoma riesce evidentemente a distinguere differenze anche minime di carica elettrica superficiale presente fra differenti strutture cristalline
- b) topi *knock out* per il complesso NALP 3-Caspasi 1 non danno corso ad infiammazione acuta da microcristalli di UMS

Con la produzione di IL-1 $\beta$  ed il suo rilascio a livello articolare i sinoviociti ed i macrofagi vengono ulteriormente stimolati a produrre altre citochine come il TNF- $\alpha$ , IL-6, KC, MIP-2.

In particolare Chen e colleghi hanno evidenziato come IL-1 così prodotta stimoli IL-1R esclusivamente in cellule non di derivazione ematopoietica

Questa affermazione si basa sull'acquisizione che, modelli sperimentali *in vitro* e l'utilizzo di animali *knock out* per differenti TIR (*Toll/IL-1 adaptor*), se stimolati con i microcristalli di UMS richiedono la presenza della proteina MyD88 (*Toll/IL-1R signal transduction adaptor myeloid differentiation primary response protein 88*) e non di altri TIR.

MyD88 inoltre conferma il ruolo dei TLR e quello di IL-1R nell'infiammazione da UMS.

Il *pathway* IL-1R-MyD88 è attivo e funziona principalmente in cellule di derivazione non ematopoietica (Chen et al, 2006). Fra queste sono sicuramente da considerarsi le cellule dell'endotelio vascolare ed è stato proposto che citochine infiammatorie come IL-1 e TNF- $\alpha$  attivino l'endotelio proprio attraverso IL-1R-MyD88 e soprattutto le induca ad esprimere i fattori di adesione leucocitaria che sono essenziali per il successivo rilascio dei neutrofili al sito dell'infiammazione (Chapman et al, 1997).

### **La risoluzione dell'attacco acuto nelle artropatie indotte da microcristalli**

Anche in assenza di trattamento l'attacco di gotta acuta tende spontaneamente a risolversi nell'arco di 7-10 giorni. Inoltre sono stati rilevati cristalli di Urato Monosodico in articolazioni di pazienti uricemici del tutto asintomatici per le artropatie da microcristalli. Queste evidenze hanno suggerito alcuni autori di ipotizzare un equilibrio dinamico fra i fattori che hanno un probabile effetto di protezione dell'articolazione e gli stimoli fortemente pro-infiammatori che caratterizzano un attacco infiammatorio acuto come nel caso della gotta (Pascual et Jovani, 1995; Dalbeth et Haskard; 2006). Fra i vari fattori a situazione protettiva è stato proposto il rivestimento dei microcristalli di UMS con proteine protettive che rivestano i cristalli in maniera tale da renderli irriconoscibili per le cellule specializzate nella fagocitosi. Altre ipotesi riguardano l'induzione e l'aumento dell'espressione di fattori di crescita, ormoni e citochine anti infiammatorie. Alcune ipotesi riguardano anche il ruolo che i macrofagi, completamente differenziati, rivestirebbero nella risoluzione dell'attacco acuto. Infatti Pascual e colleghi hanno dimostrato che nelle articolazioni di pazienti uricemici asintomatici per la gotta erano presenti macrofagi che avevano fagocitato cristalli di UMS ma non neutrofili evidenziando che i macrofagi possono riconoscere e fagocitare i microcristalli di UMS senza innescare un'infiammazione acuta (Pascual et Jovani, 1995). Successivamente utilizzando dei modelli sperimentali *in vitro* è stato proposto che tale comportamento sia proprio dei macrofagi completamente differenziati che sarebbe invece opposto a quello degli elementi immaturi della linea macrofago-monocitaria che libera TNF- $\alpha$ , IL-1B, IL-6 ed IL-8 in seguito a fagocitosi di UMS (Landis et al, 2002).

Anche il TGF- $\beta$ 1 potrebbe rivestire un ruolo rilevante nella autorisoluzione dell'attacco da gotta acuta. Questo fattore di crescita sembra ridurre in maniera significativa l'infiltrazione leucocitaria in tessuti a contatto con i microcristalli di UMS e inibisce l'induzione di stimoli infiammatori da parte di macrofagi che hanno fagocitato i microcristalli di UMS. In particolare Yagnik e colleghi hanno evidenziato come il fattore di crescita TGF- $\beta$ 1rilasciato dai macrofagi

completamente differenziati: 1) inibisca il rilascio di citochine proinfiammatorie da parte dei monociti a contatto con i microcristalli di UMS; 2) blocchi l'attivazione dell'endotelio in risposta alle citochine proinfiammatorie; 3) limitino il rilascio di TNF- $\alpha$  da parte dei macrofagi (Yagnik et al, 2004). E' stato ipotizzato anche l'autorisoluzione sia correlata proprio alla natura dei cristalli che inducono l'infiammazione acuta; in particolare legata alla dissoluzione ed alterazione della struttura cristallina come conseguenza diretta dell'aumento del calore locale causato dall'infiammazione acuta, dalla modificazione della cinetica di associazione proteine-cristalli.

Infatti l'aumento del calore causati dall'infiammazione potrebbe aumentare la solubilità dell'Uurato nei fluidi articolari impedendo l'accumulo e la formazione dei cristalli stessi. La distruzione dei microcristalli di UMS potrebbe anche essere provocata dall'azione delle mieloperossidasi leucocitarie in seguito alla fagocitosi dei cristalli da parte dei leucociti polimorfonucleati. Altre ipotesi relative alla autolimitazione dell'attacco nella infiammazione da microcristalli riguardano l'azione di radicali liberi ed altre specie reattive (anione superossido *et similia*) che potrebbero alterare la normale morfologia cristallina, l'aumento del flusso vascolare che potrebbe drenare i cristalli di UMS fuori dell'articolazione, la modificazione del rivestimento proteico dei microcristalli da parte di alcuni fattori come le Apolipoproteine A e B e l'inibizione delle citochine pro-infiammatorie da parte di fattori inibitori come i recettori solubili del TNF e l'IL-1Ra (Roberge et al, 1994; Roux-Lombard et al, 1993; Wahl et al, 1993).

E' stato recentemente proposto che, nel corso dell'attacco acuto le Apolipoproteina A e B si associno ai cristalli di UMS riducendo fortemente la capacità di questi di indurre la produzione di IL-1 $\beta$  da parte dei macrofagi ed inibendo la fagocitosi e la conseguente morte cellulare dei neutrofili. Interessante è anche il fatto che l'analisi di liquido sinoviale prelevato da pazienti durante la fase tardiva della crisi di gotta ha evidenziato cristalli di UMS rivestiti da Apolipoproteine B e una forte concentrazione di altre *low density lipoproteins* (Ortiz-Bravo et al, 1993). Secondo un modello proposto queste proteine normalmente non riscontrabili a livello articolare potrebbero derivare o dall'aumento della permeabilità capillare che si verifica nell'attacco acuto oppure direttamente neosintetizzate dai sinoviociti del *lining* (Ortiz.Bravo et al, 1993).

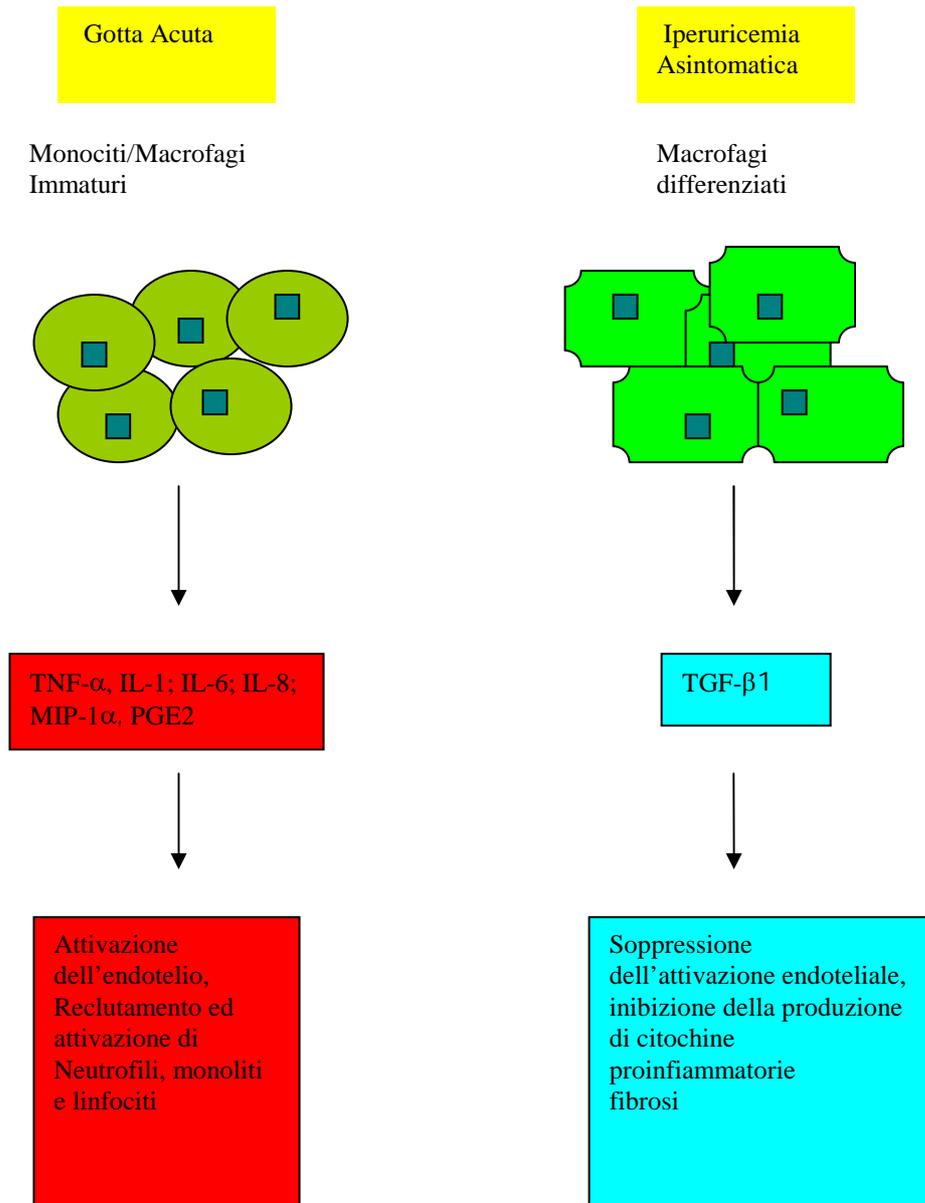


Figura 7. In questo schema è raffigurato uno dei meccanismi proposti per la risoluzione dell'attacco acuto della gotta attraverso la mediazione del fattore di crescita TGF $\beta$ -1 secreto dai macrofagi completamente differenziati.

## SCOPO DELLA TESI

La cellula sottopone il proprio DNA genomico ad un controllo stringente finalizzato alla conservazione massima delle sequenze informative ed al mantenimento dell'integrità strutturale dei cromosomi.

Qualsiasi agente eziologico che metta in discussione queste complesse strategie di controllo della stabilità genomica può provocare danni irreparabili all'intero organismo.

Una delle strutture aberranti che più frequentemente si osservano in tali situazioni è rappresentata dai micronuclei. Come già descritto in precedenza i micronuclei consistono in frammenti cromosomici altamente instabili avvolti da membrana nucleare e, in condizioni normali, rappresentano un evento statisticamente eccezionale, mentre possono essere indotti *in vivo* e *in vitro* dall'azione di vari agenti genotossici.

L'instabilità genomica è notoriamente associata al cancro ed alle patologie correlate ad infezione virale. Solo in tempi assai recenti si è ritenuto riferire questo fenomeno anche alle malattie reumatiche anche se non è chiaro se l'ambiente infiammatorio sia in grado di indurre un danno di questo tipo.

Vi sono alcune ipotesi che descrivono l'"ambiente infiammatorio" come una situazione potenzialmente cito- e geno-tossica soprattutto nel momento dell'insorgenza dell'infiammazione e nella sua fase acuta (Mackay et al, 2008).

Dal punto di vista biologico, l'infiammazione può essere intesa come "reazione" e "recupero" da parte dell'organismo in seguito ad un insulto all'omeostasi biochimica e tissutale, locale o sistemica.

All'interno di questo scenario generale abbiamo preso in esame l'infiammazione *in vitro* indotta da microcristalli di Urato Monosodico (UMS) come modello di infiammazione acuta.

Il presente studio è volto a stabilire quali effetti a livello citologico possono essere indotti dalla stimolazione dei microcristalli di UMS in colture primarie di sinoviociti ottenuti da liquido sinoviale. Sono stati scelti i sinoviociti da liquido sinoviale per il loro ruolo centrale nell'architettura tissutale dell'articolazione e per la possibilità di essere ottenuti con facilità da pazienti con patologie reumatiche infiammatorie e degenerative. I sinoviociti che è possibile ricavare infatti dal liquido sinoviale derivano dall'erosione e/o in alternativa dalla normale dinamica di *turnover* della membrana sinoviale. In generale le caratteristiche e la composizione del liquido sinoviale costituiscono un utile indicatore prognostico e diagnostico.

Da un punto di vista strategico lo studio ha caratterizzato le colture con un approccio di tipo "citomico" valutando il ciclo cellulare, la presenza di eventuale danno genomico e l'incidenza dell'apoptosi (IAEA, 1986; Fenech, 2006).

Su queste premesse abbiamo determinato se la stimolazione da parte dei microcristalli di UMS:

- 1) induce o reprime l'apoptosi (e quindi di conseguenza perturba il ciclo cellulare)
- 2) stimola o inibisce la proliferazione delle cellule in coltura
- 3) induce un danno genomico (*double strand breaks*, gruppi liberi in 3'-OH) ed in generale instabilità genetica attraverso la formazione di mitosi aberranti, micronuclei ed altri grossolani riarrangiamenti cromosomici.
- 4) segue un meccanismo di tipo *Tempo/Dose* dipendente

La scelta dell'apoptosi come parametro da rilevare è motivata dal ruolo che essa riveste come eventuale esito del ciclo cellulare. Alcune evidenze sperimentali indicano inoltre una significativa inibizione dell'apoptosi dei neutrofili in pazienti affetti da artrite da microcristalli e dei linfociti in pazienti affetti da artrite reumatoide.

L'apoptosi stessa insieme ad una corretta progressione lungo il ciclo cellulare delle cellule dei tessuti articolari potrebbe essere essenziale per una efficace "clearance" di cellule potenzialmente infiammatorie e la conseguente risoluzione dell'infiammazione (Akahoshi et al, 1997; Tudan et al, 2000; Reza et al, 2006; Rossi et al, 2006).

Questo studio tramite la standardizzazione *in vitro* dell'analisi degli effetti genotossici dell'infiammazione nei sinoviociti pone le basi per una approfondita valutazione dei rapporti tra il comportamento delle linee cellulari *in vitro* e la clinica delle patologie reumatiche da cui derivano, nonché le possibili modifiche indotte dai diversi trattamenti "di fondo".

## **ARTICOLAZIONE DEGLI ESPERIMENTI**

Dopo averle opportunamente caratterizzate mediante immunocitochimica per i marcatori specifici, abbiamo stimolato differenti colture primarie di sinoviociti ottenuti dal liquido sinoviale di pazienti in terapia presso la locale Unità Operativa di Reumatologia dell'Azienda Ospedaliera/Università di Padova. In particolare all'interno di questo studio abbiamo utilizzato colture primarie di sinoviociti da liquido sinoviale di pazienti a cui era stata diagnosticata Osteoartrite (OA) ed Artrite Psoriasica (AP).

Al fine di confrontare i risultati ottenuti con i sinoviociti è stata utilizzata la linea cellulare epitelioidi di Hamster (CHO), dal momento che costituisce uno dei modelli più standardizzati e maggiormente utilizzati negli studi di genotossicità e mutagenesi.

In seguito alla stimolazione con i microcristalli di UMS neosintetizzati i preparati ottenuti dalle colture primarie sono stati sottoposti alle seguenti indagini:

- 1) test di TUNEL per la valutazione dell'apoptosi
- 2) Incorporazione *in situ* di una sonda di digossigenina-dUTP per la valutazione del danno genomico
- 3) Analisi citologica per caratterizzare la presenza di aberrazioni citogenetiche (MN, ponti citoplasmatici e vescicole nucleari).
- 4) Misura dell'indice mitotico per quantificare l'attività proliferativa.
- 5) Analisi dello stato mitotico della cellula ( *scoring* cellule mono-, bi- e multinucleate, metafasi ed anafasi) e sua interpretazione

## **MATERIALI E METODI**

### **Linee cellulari e metodi di coltura**

In questa tesi sono state utilizzate le linee cellulari CHO-K1 e colture primarie di sinoviociti ottenuti da liquido sinoviale di pazienti affetti da Osteoartrosi ed Artrite Psoriasica.

### **Linea cellulare CHO**

La linea cellulare CHO-K1 deriva dall'ovario di Hamster cinese ed è stata utilizzata come sistema cellulare di controllo costituisce uno dei modelli più standardizzati e maggiormente utilizzati negli studi di genotossicità e mutagenesi. Nella scelta di questo modello va considerata anche la difficoltà relativa al recupero di tessuti sinoviale da individuo sano.

Questa linea cellulare ha una morfologia epitelioide e tende a crescere su più strati una volta raggiunta la confluenza. La linea è diploide ed è caratterizzata da cromosomi in prevalenza di tipo metacentrico. Un'importante caratteristica di questo sistema cellulare riguarda la grande sensibilità agli agenti genotossici che inducono rotture di tipo *double strand* e l'incapacità di promuovere eventi di ricombinazione sito specifica e giunzioni di tipo V(D)J (Finnie et al., 1995). La linea cellulare CHO-K1 è stata coltivata in bottiglie Falcon contenenti 10 ml di terreno di coltura D-MEM (*Dulbecco's modified Eagle Medium*) prodotto dalla Euroclone, con Glutamina (2mM, Euroclone) addizionato con antibiotici (streptomicina e penicillina) e integrato al 10% di siero fetale bovino (FBS, *fetal bovine serum*, Hyclone) cui erano stati inattivati i fattori del complemento dopo trattamento a 56° per 30 minuti. Le cellule CHO-K1 subcoltivate in un rapporto 1:4 dalla bottiglia d'origine (semina  $0,5 \cdot 10^6$  cellule), raggiungono la confluenza in circa 72 ore.

Nel momento in cui le linee cellulari di criceto hanno raggiunto la confluenza per propagare le colture si eseguiva la tripsinizzazione mediante una soluzione di tripsina (0,25%, EuroClone). La tripsinizzazione consisteva di un primo lavaggio veloce con la soluzione di tripsina e un secondo lavaggio di circa 3 minuti che provocava il distacco delle cellule dal fondo della bottiglia. L'azione della tripsina veniva successivamente bloccata dall'aggiunta di terreno di coltura contenente FBS.

In seguito alla tripsinizzazione si procedeva all'allestimento di nuove colture seminando altre bottiglie con una concentrazione iniziale di  $0,5 \cdot 10^6$  cellule.

### **Colture primarie di sinoviociti umani**

Le colture primarie di sinoviociti umani utilizzate in questo studio sono state allestite a partire dal LS prelevato a 6 pazienti in terapia presso la locale unità operativa di Reumatologia dell'Azienda Ospedaliera/Università di Padova. Di questi 6 pazienti 3 erano affetti da OA e 3 da AP.

I tre pazienti affetti da Osteoartrosi avevano un età media  $62,3 \pm 4,5$  anni; mentre i pazienti affetti da Artrite Psoriasica nella forma oligoarticolare avevano un'età media di  $54,7 \pm 7,8$  anni. Tutti i pazienti erano in trattamento con FANS ed analgesici. Nessuno aveva assunto steroidi o farmaci di fondo né era stato sottoposto ad iniezioni articolari nei 4 mesi precedenti l'artrocentesi.

Il LS prelevato è stato dapprima centrifugato a 1500 RPM per 10 minuti, Il pellet ottenuto è stato lavato per 3 volte con PBS e risospeso in terreno di coltura DMEM con il 20% di CFS, 1% di Glutammica, 1% di Penicillina e *Fibroblastic Growth Factor* alla concentrazione di 4ng/ml.

La sospensione cellulare così ottenuta è stata trasferita in bottiglie da coltura dove, a differenza delle linee cellulari di hamster, le colture primarie sono state cresciute in terreno Chang con il 20% di FBS scomplementato e l'aggiunta di penicillina e streptomicina.

Il mezzo di coltura è stato sostituito ogni 3 giorni ed in tali condizioni le colture primarie hanno raggiunto la confluenza dopo 25-30 giorni circa.

In uno studio precedente i sinoviociti qui utilizzati sono stati caratterizzati dal punto di vista immunocitochimico per i tipici marcatori di superficie di queste cellule come gli antigeni CD65, CD90 (Thy-1) e la prolil-idrossilasi. Questa indagine aveva confermato la positività delle colture primarie per questi marcatori specifici (Scanu et al, 2007).

Le colture primarie di sinoviociti così ottenute, all'osservazione al microscopio ottico presentavano una morfologia tipicamente fibroblastoide. Da un punto di vista morfologico ed immunoistochimico i sinoviociti da OA ed AP apparivano identici.

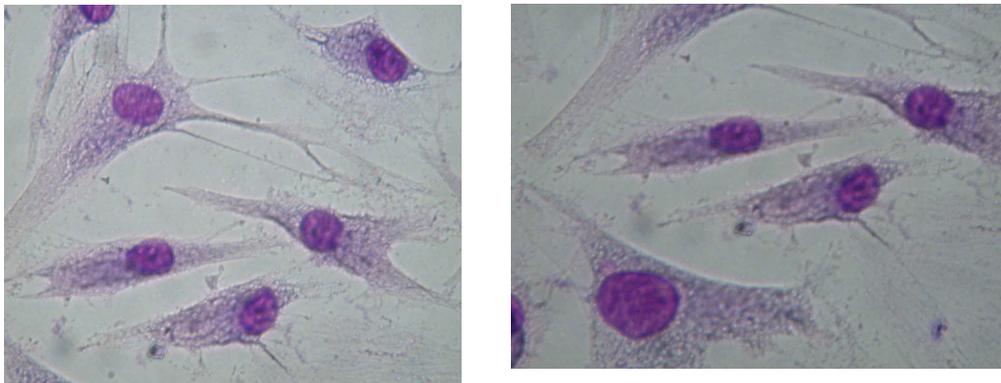


Figura 8: coltura primaria di Sinoviociti da liquido sinoviale da OA..  
Colorazione di May-Grunwald –Giemsa. Ingrandimento 100X

### **Sintesi dei Microcristalli di Urato Monosodico**

I microcristalli sintetici di Urato Monosodico (UMS) sono stati preparati secondo la metodica proposta da CW Denko (Denko e Whitehouse, 1976). Una soluzione

satura di acido urico a 60° C e pH 8,9 è stata fatta raffreddare a temperatura ambiente. Dopo 12 ore i microcristalli sono stati recuperati per centrifugazione. La forma e la birifrangenza dei microcristalli di UMS sono state verificate al microscopio a luce polarizzata e compensata. Prima di ogni esperimento i microcristalli sono stati triturati e sterilizzati con trattamento termico per 2 ore a 180°C. L'assenza di contaminazioni da endotossine è stata verificata usando il Limulus test.

### **Stimolazione delle colture primarie per mezzo dei microcristalli di UMS.**

Prima di ogni esperimento i microcristalli di UMS sono stati triturati e sminuzzati per 2 ore a 180 °C. Raggiunta la confluenza del 70% della fiasca di coltura le cellule sono state tripsinizzate e seminate in *slide chambers* a 8 pozzetti , seminando 400000 cellule per pozzetto. Per la stimolazione sono stati aggiunti al terreno di coltura diverse concentrazioni di microcristalli di UMS alle seguenti concentrazioni : 0,01 mg/ml; 0,025 mg/ml; 0,05 mg/ml, 0,075mg/ml; 0,1 mg/ml; 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml. Dopo 24 ore di stimolazione per ogni concentrazione sopraindicata le cellule sono state tripsinizzate e sottoposte a fissazione.

### **Allestimento di preparati interfascici**

Dopo aver asportato il terreno dalle capsule, le cellule vengono lavate velocemente con PBS 1x (*Phosphate Balanced Salt Solution*) e successivamente con tripsina (1 ml). Per separare le cellule si aggiunge nuovamente tripsina e si lascia agire per alcuni minuti. Con l'aiuto del microscopio si osserva che le cellule siano separate fra loro; si blocca quindi l'effetto della tripsina con del terreno contenente siero. La sospensione cellulare viene trasferita in una provetta e sottoposta a centrifugazione (1000 rpm) per alcuni minuti. Le cellule precipitate vengono risospese in 5 ml di PBS 1x e quindi centrifugate di nuovo per eliminare ogni traccia di terreno residuo. Il pellet deve essere poi fissato goccia a goccia con 10 ml di paraformaldeide fredda (paraformaldeide 1% in PBS 1x a pH 7.4). Si lascia agire il fissativo per 15 minuti in ghiaccio, poi si centrifuga e il pellet viene lavato con 10 ml di PBS 1x. Dopo un'ultima centrifugazione le cellule vengono sospese goccia a goccia in etanolo 70% freddo, e si lasciano una notte a -20°. Il giorno successivo si procede con un'altra centrifugazione, e quando si elimina il surnattante si lascia una piccola aliquota in cui risospendere le cellule pronte per essere utilizzate per la preparazione dei vetrini. I vetrini vengono precedentemente lavati con detersivo e risciacquati varie volte con acqua corrente e poi distillata per permettere un'omogenea distribuzione della goccia di fissativo contenente le cellule.

## Colorazione di contrasto del DNA cellulare

Sui vetrini si pone una miscela di ioduro di propidio ( $0,3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ , Oncor) e *antifade* DABCO (1,4-diaza-bicyclo-(2,2,2)octano) e poi si pone delicatamente sopra il vetrino un coprioggetto di vetro. Lo ioduro di propidio si intercala con il DNA cellulare che si colorando di rosso all'osservazione con un filtro specifico (Zeiss, set 25) mentre l'*antifade*, agendo da *quencher*, è in grado di prolungare la fluorescenza nel tempo emessa dallo ioduro di propidio.

## Incorporazione *in situ* a fluorescenza per l'evidenziazione di estremità 3'-OH libere di DNA

Questa metodica, permette di localizzare e segnalare la presenza di estremità 3'-OH libere all'interno del filamento di DNA mediante l'azione di enzimi che aggiungono a queste estremità nucleotidi modificati e coniugati ad un fluorocromo.

L'incorporazione *in situ* viene effettuata utilizzando l'enzima Terminal deossinucleotidil Transferasi (TdT) che catalizza l'addizione, *template* indipendente, di deossiribonucleotidi trifosfati alle estremità 3'-OH di DNA a doppio o singolo filamento. A questo scopo vengono utilizzati Digossigenina-11-dUTP (la digossigenina è legata in posizione 5 della pirimidina mediante un braccio di 11 atomi di carbonio) e dATP in modo che alle estremità 3'-OH si formino degli eteropolimeri in cui la distanza tra i nucleotidi marcati dipende dal rapporto tra le concentrazioni di DIG-11-dUTP a dATP nella miscela di reazione. Tali anticorpi sono coniugati a fluoresceina, un fluorocromo che eccitato alla luce di lunghezza d'onda di 494 nm emette un segnale verde ( $\lambda = 523 \text{ nm}$ ).



Fig. 9 Rappresentazione schematica dell'incorporazione di deossiribonucleotidi trifosfati a livello di estremità 3'-OH libere ad opera della terminal transferasi. Come substrato per la TdT può essere utilizzata DIG-11-dUTP, che può poi venire identificata attraverso un anticorpo antiDIG-11-dUTP fluoresceinato, al microscopio a fluorescenza.

Il protocollo sperimentale dell'incorporazione *in situ* a fluorescenza, che è stato utilizzato, prevede inizialmente 2 lavaggi con HBS ( $\text{NaCl } 280 \text{ mM}$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O } 1.5 \text{ mM}$ , HEPES  $50 \text{ mM}$ ). Si procede quindi alla reazione di incorporazione *in situ* di DIG-11-dUTP mediante l'enzima TdT. Questa reazione richiede:  $10 \mu\text{l}$  di una soluzione (Boehringer) contenente cacodilato di potassio  $1 \text{ M}$ , Tris-HCl

125 mM (pH 6.6, 4°C), *Bovine serum albumin* (BSA) 1.25 mg/ml, CoCl<sub>2</sub> 10 mM; 0.2 µl di una soluzione (Boheringer) contenente TdT (25 unità / µl), EDTA 1 mM, 2-mercaptoetanolo 4 mM, glicerolo 50% (v/v) (pH 6.6, 4°C); 1 µl di miscela di DIG-11-dUTP (1 mM) (Boheringer). Si aggiunge acqua distillata fino ad ottenere un volume finale di 50 µl. Il vetrino con le cellule viene incubato con questa soluzione a 37°C per 1 ora in un'atmosfera umidificata con HBS. Terminata l'incubazione il vetrino viene immerso in una vaschetta contenente 0.1% Triton X-100 e 0.5% BSA in HBS, quindi viene posto a contatto con l'anticorpo antiDIG-11-dUTP (diluizione 1:50) marcato con FITC (Fluoresceina Isotiocianato; Boheringer). La reazione viene condotta a temperatura ambiente per 30 minuti in un'atmosfera umidificata con HBS. Il vetrino viene poi lavato 3 volte per 5 minuti con la stessa soluzione di HBS. Successivamente sui vetrini si pone una miscela di ioduro di propidio (PI; Oncor) e *antifade* DABCO (1,4-diazabicyclo-(2,2,2)octano, Sigma) e poi un coprioggetto di vetro. Lo ioduro di propidio reagisce esclusivamente con il DNA colorandolo di rosso, mentre *antifade* DABCO è un efficace agente di *quenching* in grado di limitare la perdita di fluorescenza nel tempo.

### **Criteri applicati nell'analisi delle cellule mediante test di Tunel ed Incorporazione *in situ*.**

La distinzione delle cellule in apoptosi rispetto alle cellule con DNA eventualmente danneggiato si è basata sui seguenti criteri di analisi morfologica:

- a) Fluorescenza uniforme ed intensa del nucleo apoptotico ed incapacità di riconoscere il citoplasma ed altre strutture cellulari
- b) la presenza di segnali fluorescenti puntiformi all'interno del nucleo è stata valutata come una probabile avvenuta incorporazione *in situ* della sonda di Dig-dUTP.

### **Analisi dei vetrini**

Per l'osservazione al microscopio dei vetrini è stato utilizzato un microscopio Zeiss (obiettivo 100x) provvisto di una lampada a mercurio HBO 100 (Osmar Munchen, Germania), con filtro per TRITC o Texas Red (rosso) e FITC (verde). E' stato utilizzato inoltre un filtro specifico (Zeiss, set 25) che permette il rilevamento contemporaneo della colorazione con ioduro di propidio e dell'avvenuta incorporazione o ibridazione *in situ* con la FITC.

Le fotografie dei preparati su vetrino osservati al microscopio a fluorescenza sono state eseguite su pellicola Kodak P1600.

Per determinare la frequenza delle cellule micronucleate sono state contate almeno 1000 cellule utilizzando almeno due preparati su vetrino per punto sperimentale.

Per l'analisi statistica dei risultati ottenuti è stato applicato il G test (Sokal e Rohlf, 1981).

## **Criteri applicati per l'analisi citologica dei preparati**

Nell'esecuzione dell'analisi citologica dei vetrini sono stati applicati i seguenti criteri così come proposto dal consenso HUMN (Fenech et al 1999).

Sono stati considerati MN i frammenti con le seguenti caratteristiche morfologiche:

- ◆ Il loro diametro varia fra 1/16 ed 1/3 rispetto al diametro del nucleo principale della cellula in prossimità al MN
- ◆ presentano morfologia tonda oppure ovale
- ◆ appaiono non rifrangenti alla luce incidente rispetto ad eventuali artefatti oppure ai corpuscoli di materiale di *staining*
- ◆ non sono collegati al nucleo principale
- ◆ possono toccare ma non sovrapporsi al nucleo principale. In ogni caso i confini del MN devono essere nettamente distinguibili dal nucleo hanno maggiore o identica colorazione del nucleo principale.

## **Criteri applicati nella conta delle Mitosi aberranti**

Sono state considerate effetto di Mitosi aberranti le seguenti situazioni:

- 1) presenza di cellule giganti con un nucleo definito da un diametro 3 volte maggiore il diametro medio del nucleo delle cellule osservate. In questo caso si è ipotizzata uno o più cicli di duplicazione del DNA non seguiti da segregazione e divisione
- 2) la presenza di ponti anafasici NPB come effetto di fusioni fra cromosomi e della conseguente non corretta segregazione di questi fra le due cellule figlie
- 3) Presenza di cellule bi-, tri- o multinucleate , cioè con presenza di due o più nuclei come effetto di una difettosa telofase o citocinesi.

## **Criteri per la conta dei Ponti Nucleoplasmatici NPB**

Per lo *scoring* dei ponti nucleoplasmatici o anafasici NPB sono stati applicati i seguenti criteri morfologici:

- 1) Gli NPB sono collegamenti continui fra due nuclei in una cellula binucleata o in una cellula in anafase
- 2) l'ampiezza degli NPB è variabile ma non deve eccedere  $\frac{1}{4}$  del diametro del nucleo all'interno della cellula
- 3) Qualunque sia la colorazione gli NPB hanno le stesse caratteristiche di *staining* del nucleo principale.

## Risultati

### Frequenza dell'apoptosi

Abbiamo esaminato per ogni punto sperimentale precedentemente descritto la frequenza delle cellule in apoptosi. L'apoptosi è un esito del ciclo cellulare che può dare significative indicazioni sugli effetti che uno stimolo esterno come i microcristalli di UMS, possono esercitare sulla progressione lungo il ciclo ed il *turnover* in una data popolazione cellulare. Esaminando la linea cellulare CHO, in assenza di stimolazione da UMS è stata rilevata una incidenza dell'apoptosi vicina al 5% sul totale della popolazione cellulare. Per concentrazioni di 0,01mg/ml di UMS dopo 24 ore di stimolazione, la frequenza decrementava in maniera statisticamente molto significativa rispetto al livello basale. Per concentrazioni comprese fra 0,01 mg/ml e 0,05 mg/ml non sono state rilevate particolari differenze. La frequenza dell'apoptosi incrementava lievemente per concentrazioni comprese fra 0,075 e 05 mg/ml. È stata successivamente considerata l'incidenza dell'apoptosi spontanea ed indotta in una coltura primaria di sinoviociti derivanti da liquido sinoviale di pazienti affetti da Osteoartrite (OA). In questo caso il livello basale dell'apoptosi nella coltura primaria risultava superiore al 7% con una differenza significativa rilevabile rispetto alla linea di controllo CHO.

Anche per questa coltura primaria la stimolazione a 24 h con i microcristalli di UMS provocava una significativa diminuzione dell'apoptosi in funzione della dose compresa fra 0,01 e 0,025 mg/ml di UMS. In questo caso per concentrazioni comprese fra 0,05 mg/ml e 0,5 mg/ml è stato rilevato un aumento pari al 2% circa della frequenza dell'apoptosi per poi registrare un lieve decremento per una dose di UMS pari a 0,5mg/ml.

Nell'ultimo caso è stata esaminata l'incidenza dell'apoptosi in colture primarie di sinoviociti ottenuti da liquido sinoviale di pazienti affetti da Artrite Psoriasica (AP).

A differenza dei sistemi cellulari precedentemente considerati, a livello basale, l'apoptosi si assestava al 1,18% evidenziando sotto tale aspetto caratteristiche marcatamente differenti rispetto alla linea CHO di controllo e della coltura primaria da liquido sinoviale da Osteoartrite dove la frequenza dell'apoptosi era molto superiore. Sottoponendo questa coltura primaria a concentrazioni crescenti di UMS si registrava un incremento quasi lineare dell'apoptosi in funzione della dose di stimolazione eccetto che per concentrazioni comprese fra 0,075 mg/ml e 0,1 mg/ml dove però in questo caso la lieve diminuzione rilevata non deve considerarsi statisticamente significativa.

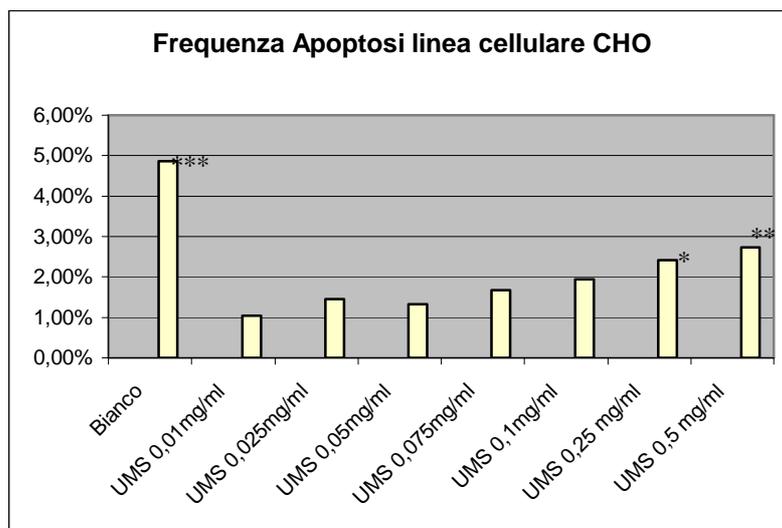


Figura 10. Frequenza delle cellule in apoptosi per la linea cellulare CHO stimolata con microcristalli di UMS \*\*\* : significativamente diverso per  $P < 0,001$  (G test) dal valore riscontrato nelle cellule CHO stimolate con 0,01 mg/ml di UMS. \*\* : significativamente diverso per  $P < 0,01$  (G test) dal valore riscontrato nelle cellule CHO nelle altre condizioni sperimentali. °°°.

I risultati sono rappresentativi di 2 esperimenti ripetuti in 3 colture

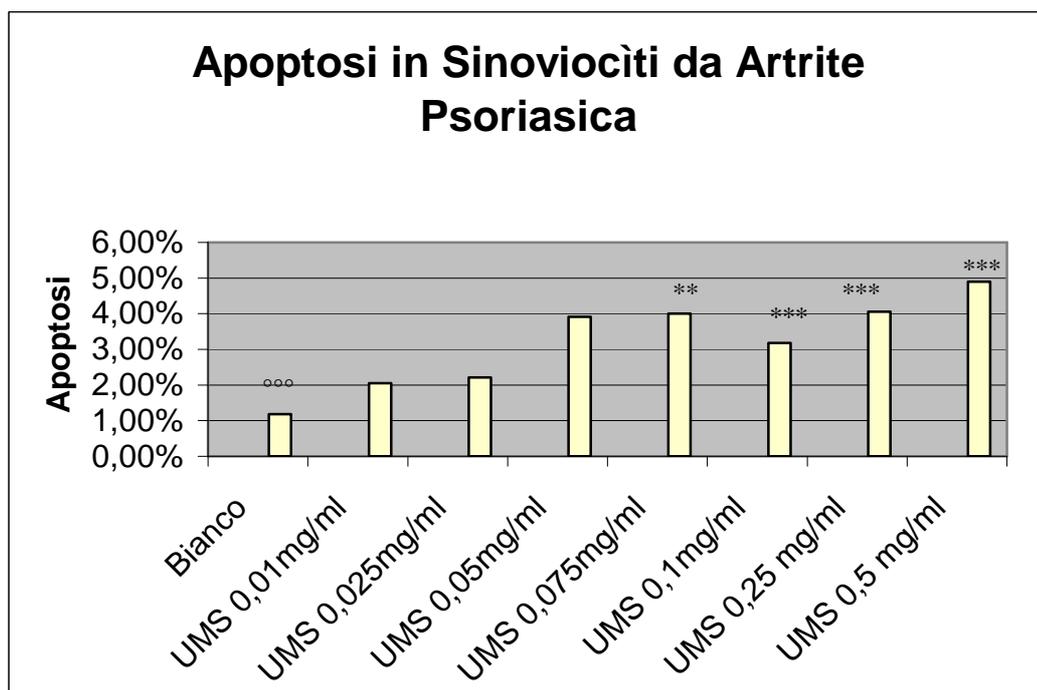
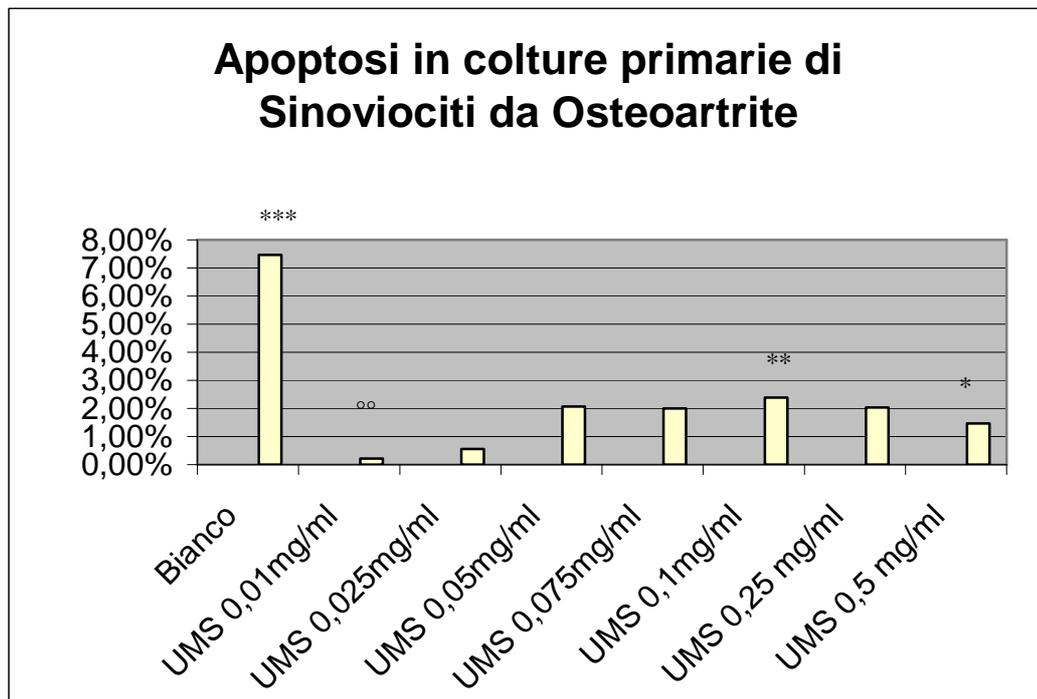


Figura 11. Frequenza cellule in Apoptosi per le colture primarie di sinoviociti da liquido sinoviale di pazienti con OA e AP stimulate con diverse concentrazioni di microcristalli di UMS. \*\*\* : significativamente diverso per  $P < 0,001$  (G test) dal valore riscontrato nelle colture stimulate con 0,01 mg/ml di UMS. \*\* : significativamente diverso per  $P < 0,01$  (G test) dal valore riscontrato nelle cellule CHO nelle altre condizioni sperimentali.ooo. I risultati sono rappresentativi di 2 esperimenti ripetuti in 3 colture

## Analisi dell'Indice Mitotico

E' stato considerato l'Indice Mitotico (IM) come misura significativa della proliferazione cellulare e quindi anche come parametro utile per esaminare la propensione delle cellule in coltura a progredire lungo il ciclo in presenza di differenti concentrazioni di microcristalli di UMS.

A livello basale la linea cellulare CHO evidenziava un IM pari al 9,73%; la stimolazione per 24h con i microcristalli di UMS induceva un significativo abbassamento dell'IM fino a 3,44%. All'aumentare della concentrazione di UMS somministrata alla coltura l'IM non diminuiva ulteriormente in misura statisticamente rilevabile eccetto che per concentrazioni di UMS pari a 0,5 mg/ml. In questo caso l'IM era pari a 0,55%. Una plausibile interpretazione di questo andamento è imputabile al fatto che concentrazioni crescenti di UMS inibiscano la proliferazione cellulare.

Osservando nella figura n l'andamento dell'IM per i sinoviociti ottenuti da liquido sinoviale si può osservare un andamento simile anche se meno marcato; tali discrepanze sono comunque interpretabili sulla base della minore propensione alla proliferazione che hanno i sinoviociti da OA. Infatti le due colture primarie, a livello basale, la coltura primaria di sinoviociti OALS evidenziava un IM rispettivamente pari allo 5,03%. All'aumentare della dose di UMS utilizzata nella stimolazione l'IM per questa coltura primaria continuava a decrementare fino alla soglia del 2,23%.

Nel caso dei sinoviociti da OA nel nostro modello la presenza dei cristalli di UMS evidenzia una diminuzione della propensione alla proliferazione pari al 50% circa rispetto al basale.

L'effetto sui sinoviociti da AP da parte dei microcristalli di UMS era significativamente più marcato. A livello basale i sinoviociti AP evidenziavano un IM pari a 10,03%. Per una concentrazione di UMS pari a 0,01 mg/ml l'IM di questa coltura scendeva significativamente del 40% circa rispetto al livello basale fino a 6,43%.

Fino a concentrazioni di UMS pari a 0,075 mg/ml l'IM non subiva variazioni di rilievo, mentre per concentrazioni superiori a 0,1 mg/ml di UMS nel mezzo di coltura l'IM arrivava fino allo 0,39% risultante in una diminuzione quasi del 100% rispetto al basale. Confrontando per quest'ultimo punto i dati con l'incidenza dell'apoptosi possiamo attribuire la variazione dell'IM rispetto alla dose di UMS come effetto della potenziale citotossicità che *in vitro* queste concentrazioni di microcristalli possono provocare. Per ogni punto sperimentale assieme all'IM sono state considerate tutte quelle situazioni citologiche che potevano essere risultato di una mitosi aberrante come produzione di cellule giganti, cellule bi o trinucleate e NPB.

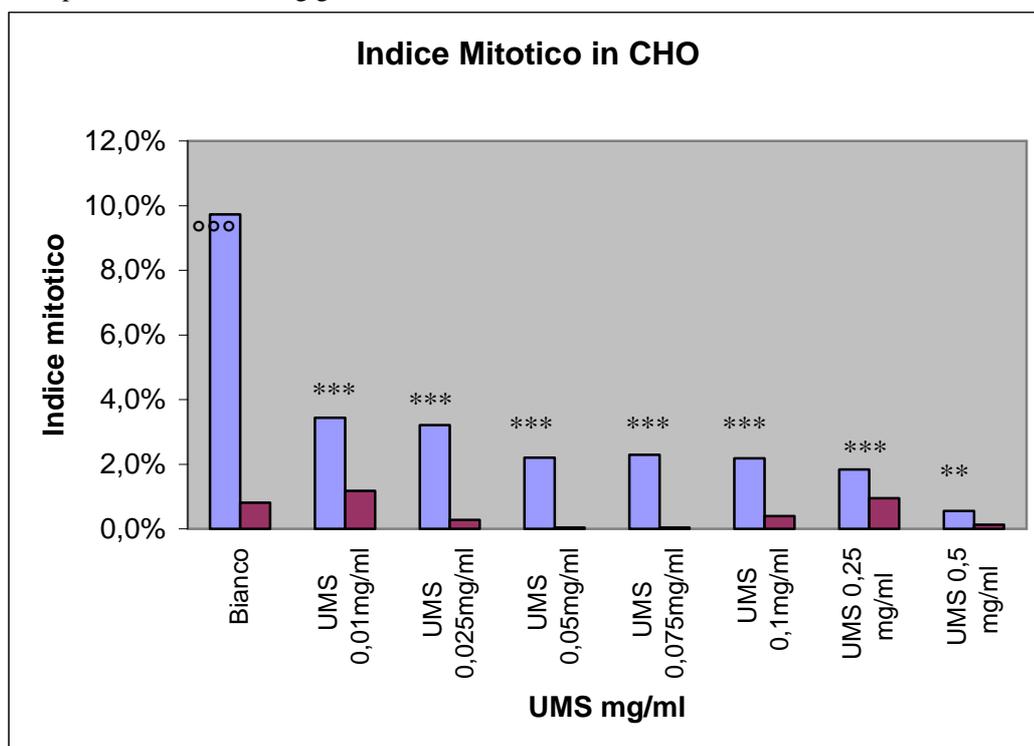


Figura 12 . Andamento dell'Indice Mitotico in colture cellulari di cellule CHO di *hamster* stimolati con differenti concentrazioni di microcristalli di UMS. In viola le mitosi normali , in marroncino sono conteggiate le mitosi aberranti. \*\*\* : significativamente diverso per  $P < 0,001$  (G test) dal valore riscontrato nelle cellule CHO stimolate con 0,01 mg/ml di UMS. \*\* : significativamente diverso per  $P < 0,01$  (G test) dal valore riscontrato nelle cellule CHO nelle altre condizioni sperimentali. °°. I risultati sono rappresentativi di 2 esperimenti ripetuti in 3 colture

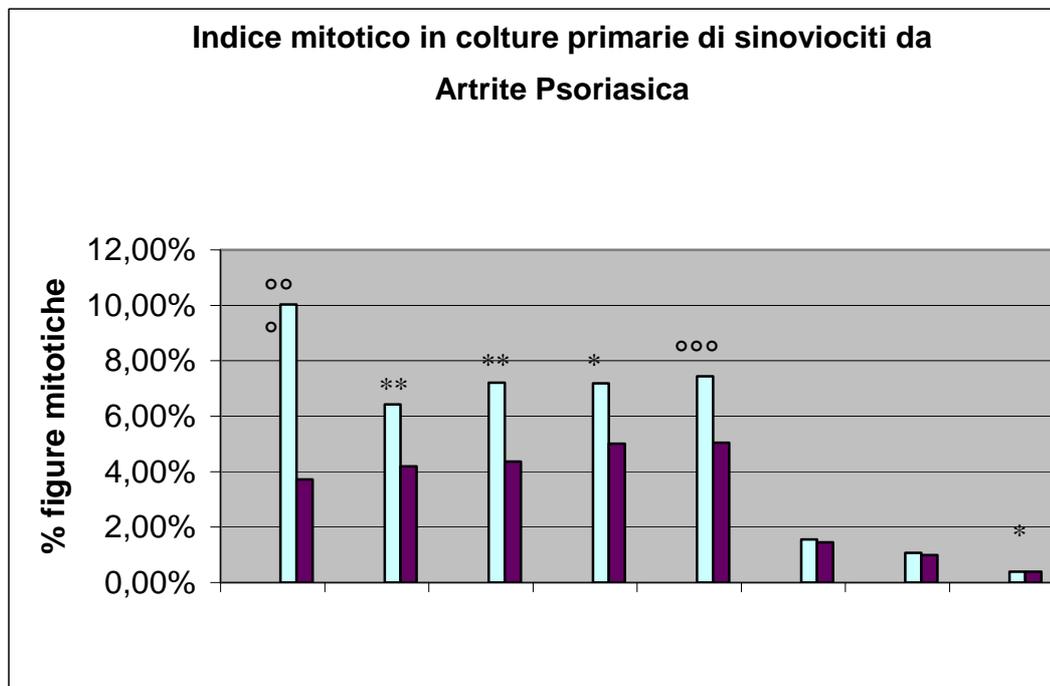
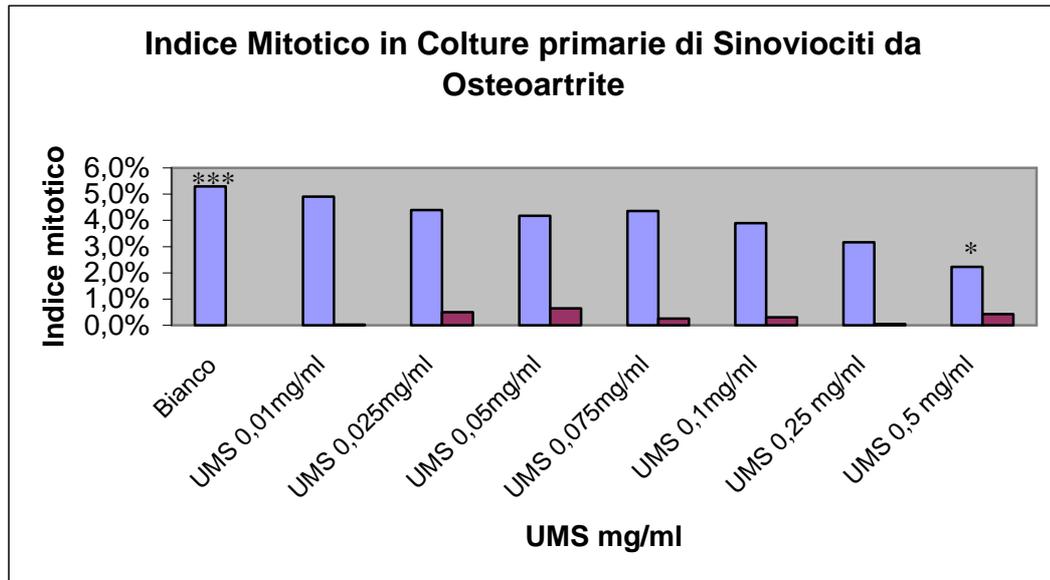
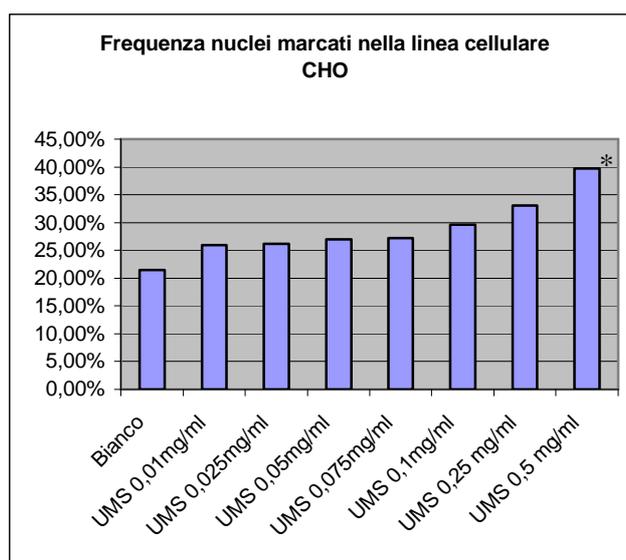


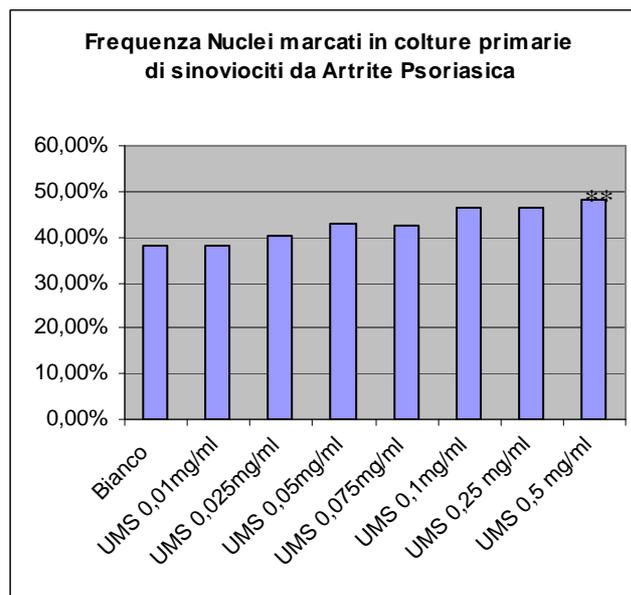
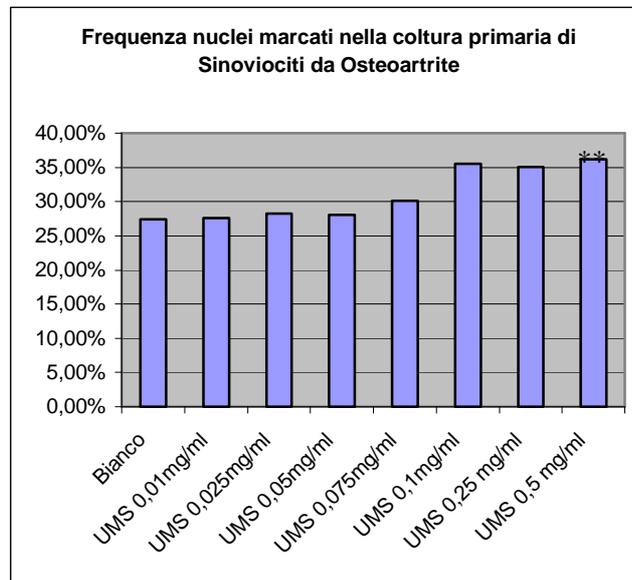
Figura 13. Andamento dell'Indice Mitotico in colture primarie di Sinoviociti da liquido sinoviale di paziente affetto da OA stimolati con differenti concentrazioni di microcristalli di UMS. In viola le mitosi normali, in marroncino sono conteggiate le mitosi aberranti. \*\*\* : significativamente diverso per  $P < 0,001$  (G test) dal valore riscontrato nelle cellule OAM stimolate con 0,01, 0,025, 0,05 e 0,075 mg/ml di UMS. \*\* : significativamente diverso per  $P < 0,01$  (G test) dal valore riscontrato nelle cellule OAM nelle altre condizioni sperimentali. I risultati sono rappresentativi di 2 esperimenti ripetuti in 3 colture.

### Quantificazione degli effetti clastogeni indotti dai Microcristalli di UMS

Attraverso l'applicazione della metodica dell'incorporazione *in situ* è stata analizzata la presenza di danni al DNA. Questa metodica infatti rileva la presenza di estremità 3'-OH libere nel DNA genomico e le marca con una apposita sonda composta di digossigenina-dUTP. Questi gruppi ossidrilici liberi in posizione tre-prima nella struttura del nucleotide non sono normalmente presenti e sono effetto di agenti che "spezzino" la struttura e la disposizione dei nucleotide nel cromosoma.

A livello basale la linea CHO ha esibito una percentuale di cellule marcate per l'avvenuta incorporazione *in situ* di digossigenina-dUTP pari al 21,50% del totale. All'aumentare della dose di UMS somministrata l'incremento di nuclei interfascici marcati dalla sonda aumentava in maniera significativa in funzione della dose assestandosi attorno al 40% sul totale per concentrazioni di UMS pari a 0,5mg/ml per 24 ore di stimolazione *in vitro*. Risultati di questo indicano che la presenza di microcristalli di UMS provoca degli effetti di tipo clastogeni nella linea cellulare CHO di *Hamster* utilizzata come controllo. La rilevazione dell'incidenza dei nuclei interfascici marcati dalla digossigenina-dUTP per ciò che riguarda le colture primarie di sinoviociti da liquido sinoviale di pazienti da OA ed AP ha evidenziato un andamento ed una relazione analoga. E' comunque significativo che, rispetto alla linea CHO di controllo i sinoviociti AP ed OA evidenziavano a livello basale una maggiore incidenza di estremità libere in 3'-OH rispetto alla linea CHO di controllo pari rispettivamente al 27,37% ed al 37,9 %.





Anche questi risultati concernenti le colture primarie di sinoviociti da OA ed da AP sono compatibili con quanto osservato ed ipotizzato per la linea cellulare CHO e cioè che i microcristalli di UMS , alle dosi utilizzate nel presente studio inducano un danno di tipo clastogeni nel DNA genomico.

#### **Analisi della frequenza delle cellule micronucleate**

Figura 14. Frequenza di nuclei interfascici marcati dalla sonda di digossigenina dUTP mediante l'applicazione della \* metodica dell'incorporazione *in situ* di digossigenina-dUTP in colture primarie di sinoviociti da Osteoartrite, Artrite Psoriasica e la linea cellulare di controllo CHO. \*\*\* : significativamente diverso per  $P < 0,001$  (G test) dal valore riscontrato nelle cellule CHO stimolate con 0,01 mg/ml di UMS. \*\* : significativamente diverso per  $P < 0,01$  (G test) dal valore riscontrato nelle cellule CHO nelle altre condizioni sperimentali. I risultati sono rappresentativi di 2 esperimenti ripetuti in 3 colture

Aumentando la dose per concentrazioni fino a 0,025mg/ml la percentuale di cellule con MN rimane paragonabile a quella rilevata a livello basale.

Per concentrazioni di microcristalli di UMS uguali o superiori a 0,050mg/ml i MN incrementano in maniera significativa fino a valori di 0,74% per 0,025mg/ml di UMS, 1,64% per 0,05 mg/ml di microcristalli di UMS. Per dosi di stimolazione superiori l'incremento di MN rilevato aumentava ancora assestandosi intorno a valori superiori al 2% per le dosi di stimolazione massima.

Poiché la formazione dei MN è considerata un esito del verificarsi di un danno di tipo clastogeno è possibile considerare questi risultati coerenti con le frequenze dei nuclei interfascici "danneggiati" come precedentemente illustrato nell'esame dell'incorporazione *in situ* di digossigenina-dUTP.

Riguardo alla coltura primaria di sinoviociti da OA la frequenza di MN partiva da un livello basale più basso rispetto al controllo (0,40%). Anche per questo sistema cellulare, analogamente a quanto osservato per le cellule CHO, l'incidenza di cellule con MN aumenta in maniera significativa fino dell'1,52% per dosi di UMS pari a 0,075mg/ml. Mentre le stesse colture non incrementavano i MN per dosi superiori. Questo dato, considerando, successivamente all'interno dello stesso esperimento, l'incidenza dei MN con DNA instabile e la frequenza degli NPB è interpretabile come effetto di una possibile incidenza di fusioni cromosomiche che si concreta poi in mitosi aberranti caratterizzate dalla formazione di ponti anafasici NPB e conseguentemente per la rottura di questi dalla produzione finale di MN con rotture nucleotidiche in 3'-OH.

I sinoviociti da AP invece evidenziano una percentuale di MN elevata anche già a partire dal livello basale che non varia statisticamente in maniera significativa in funzione della concentrazione di microcristalli di UMS utilizzati.

In questo caso considerata l'elevata incidenza di MN a livello basale nei sinoviociti da AP e l'andamento nelle stesse colture di apoptosi, incorporazione *in situ* ed IM, una possibile interpretazione è che i sinoviociti da AP subiscano un processo di selezione da parte dei cristalli di UMS per cui all'aumentare delle dosi sarebbero successivamente selezionate *in vitro* esclusivamente le sottopopolazioni meno sensibili dal punto di vista del danno genomico indotto dai microcristalli di UMS. Questo tipo di interpretazioni su questi dati assolutamente ancora preliminari risulterebbe confermata osservando l'IM dei sinoviociti da AP che diminuisce in maniera drastica per dosi crescenti di microcristalli di UMS.

Nell'ambito di questo stesso esame è stata considerata l'incidenza di MN che evidenziano al loro interno un segnale di avvenuta incorporazione *in situ* di digossigenina-dUTP.

Questa sottopopolazione di MN è significativa in quanto tali MN evidenziano al loro interno la presenza di una rottura al DNA in 3'-OH e possono essere altamente informativi sulla eventualità che i microcristalli di UMS provochino degli effetti di tipo aneuploidizzante.

L'aneuploidia come conseguenza di un danno al DNA precedente si concreta durante la mitosi con una non corretta segregazione dei cromatidi fratelli fra le due cellule figlie. In seguito la fusione di cromosomi rotti da un evento clastogeno provoca la formazione di un NPB e la sua conseguente rottura a MN con presenza di gruppi ossidrilici liberi in 3'-OH evidenziabili attraverso l'incorporazione *in situ* di digossigenina-dUTP:

Il grafico relativo evidenzia come a livello basale e per concentrazioni di 0,05 mg/ml di UMS la linea cellulare CHO non esibisca MN marcati. All'aumentare della dose l'incremento di MN marcati varia significativamente raggiungendo un *plateau* per concentrazioni di UMS comprese fra 0,1 mg/ml e 0,5mg/ml.

Anche i sinoviociti da OA a livello basale e per dosi di 0,01mg/ml non evidenziano MN marcati, mentre a partire da 0,025 mg/ml l'incremento di MN che avevano incorporato digossigenina-d-UTP variava in maniera significativa in funzione della dose di microcristalli somministrata.

I sinoviociti da AP invece esibivano a livello basale un'incidenza di MN marcati del 3,31%; alle successive stimolazioni con i microcristalli di UMS per concentrazioni da 0,01mg/ml a 0,025 mg/ml l'incidenza non variava, mentre subiva un incremento significativo per concentrazioni superiori a 0,050 mg/ml attestandosi stabilmente sopra il 5% di cellule con MN marcati sul totale.

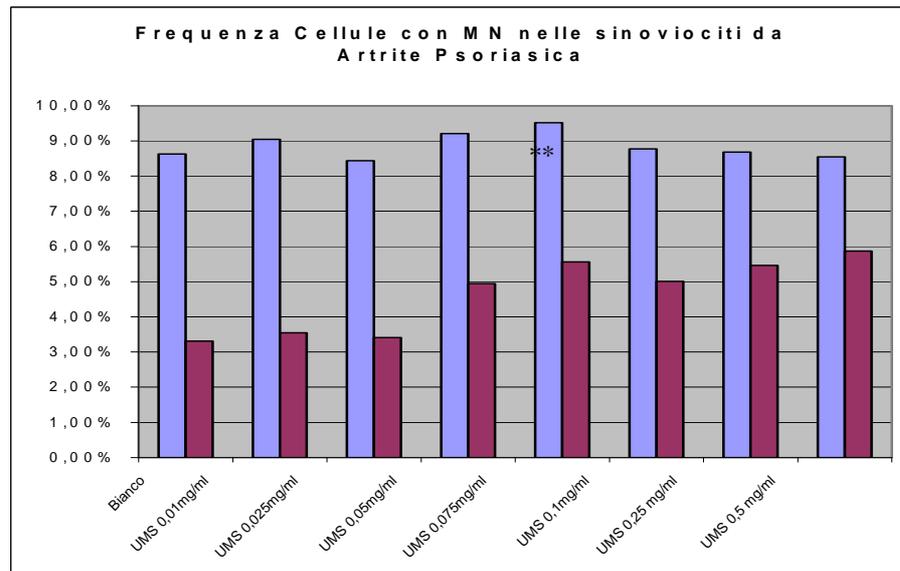
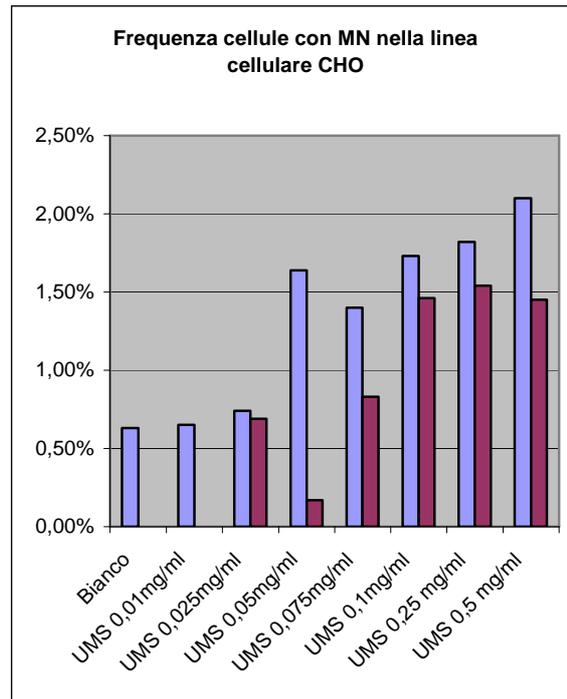


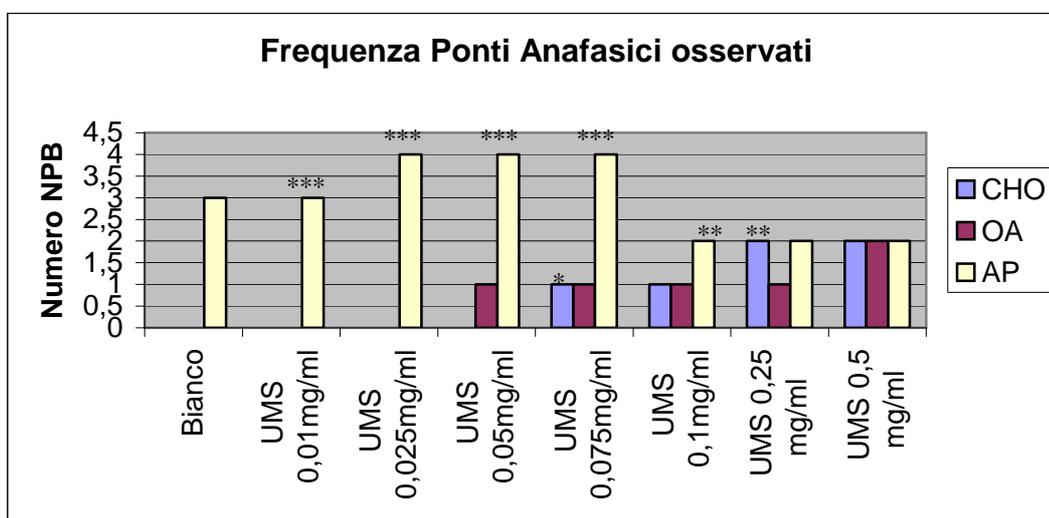
Figura 15. Andamento dell'incidenza delle cellule micronucleate nella linea cellulare CHO di *Hamster* e nelle colture primarie di Sinoviociti da OA e da AP stimolati con differenti dosi di microcristalli di UMS. In viola l'incidenza dei MN assoluta mentre in rosso scuro quella dei MN con DNA instabile\*\*\* : significativamente diverso per  $P < 0,001$  (G test) dal valore riscontrato nelle cellule on stimulate \*\*: significativamente diverso per  $P < 0,01$ , (G test). I risultati sono rappresentativi di 2 esperimenti ripetuti in 3 colture

### Analisi del numero di Ponti Anafasici NPB e delle Vescicole Nucleari NBUD.

I ponti anafasici o nucleoplasmici (NPB) e le vescicole nucleari (NBUD) costituiscono una rara ma significativa aberrazione mitotica che è indice non solo di danno al DNA ma anche di un possibile effetto aneuploidizzante. L'aneuploidia è un'aberrazione del numero dei cromosomi rispetto a quanto si osserva in un cariotipo normale ed è in parte dovuta alla perdita di materiale genomico durante una mitosi difettiva.

Nella linea cellulare CHO di *Hamster* come per la coltura primaria di Sinoviociti da OA non vengono osservati NPB mentre a livello basale i sinoviociti da AP evidenziano presenza di eventi di questo tipo. Per le cellule CHO ed i Sinoviociti da OA fino a 0,025 mg/ml di microcristalli di UMS non sono rilevati NPB mentre per concentrazioni di UMS successive la presenza di MN incrementa in funzione della dose. Un andamento di questo tipo correla con quanto osservato per la frequenza delle figure mitotiche aberranti di cui gli NPB costituiscono un sottinsieme. Per quanto riguarda invece i sinoviociti da AP anche in assenza di stimolazione da microcristalli di UMS sono stati rilevati NPB; il numero di NPB incrementa per dosi di UMS pari a 0,05mg/ml, 0,075 mg/ml e 0,075 mg/ml. Per concentrazioni superiori il numero di NPB diminuisce in questo caso anche rispetto al livello basale. L'interpretazione di questo andamento correla con quanto osservato con il decremento dell'IM e l'aumento dell'apoptosi per i sinoviociti da AP e cioè anche questo risultato evidenzia come per dosi di microcristalli di UMS superiori a 0,1mg/ml gli effetti citotossici "totali" (cioè con induzioni di necrosi o blocco del ciclo), siano maggiori e preponderanti rispetto ad un effetto "parziale" come l'induzione di singole o limitate rotture cromosomiche o di mitosi comunque funzionanti ma difettosi ed in grado di progredire lungo il ciclo.

Figura 16. Frequenza Ponti Anafasici NPB rilevati dall'analisi di linee cellulari di *hamster* e colture primarie di sinoviociti da liquido sinoviale da Osteoartrite e da Artrite Psoriasica. Numero di eventi assoluti\*\*\* : significativamente diverso per  $P < 0,001$  (G test) dal valore riscontrato nelle cellule stimolate per dosi di UMS da 0,1mg/ml a 0,5mg/ml. \*\*: significativamente diverso per  $P < 0,01$ , (G test) dal valore riscontrato nelle cellule stimolate per 0,01 mg/ml di UMS. I risultati sono rappresentativi di 2 esperimenti ripetuti in 3 colture.



L'istogramma seguente illustra le vescicole nucleari NBUD rilevate dall'analisi dei sistemi cellulari utilizzati per ogni punto sperimentale. L'andamento conferma quanto precedentemente osservato per la conta dei ponti anafasici e per gli altri tipi di danno al DNA fin qui discussi.

A livello basale la linea CHO non presentava NBUD che venivano rilevate invece per concentrazioni pari a 0,025mg/ml. Per questo sistema anche in questo caso l'incremento delle vescicole nucleari aumentava in funzione dose anche se per concentrazioni comprese fra 0,1 mg/ml e 0,5 mg/ml non venivano evidenziati incrementi significativi rispetto alla quota di NBUD rilevata per una dose di UMS pari a 0,075mg/ml. I sinoviociti da OA evidenziavano anche a livello basale la presenza di NBUD ed il numero di questi eventi aumentava in funzione della dose in presenza

dei microcristalli di UMS. Anche in questo caso come effetto generale il risultato ottenuto per questa coltura primaria è coerente con quanto osservato negli altri indici di genotossicità finora esaminati.

Anche a livello basale i sinoviociti da AP evidenziavano la presenza di vescicole nucleari in un numero più elevato rispetto alle altre colture cellulari considerate. Per concentrazioni pari a 0,05 mg/ml e 0,075mg/ml vi è un incremento significativo di questi eventi rilevati mentre per concentrazioni pari e superiori a 0,1 mg/ml di microcristalli di UMS il numero di NBUD osservato era minore anche a livello basale. Anche questo tipo di andamento è interpretabile allo stesso modo per ciò che riguarda i ponti anafasici e le altre aberrazioni; per concentrazioni di UMS pari o superiori a 0,1mg/ml nel mezzo di coltura i sinoviociti da AP subiscono un danno genotossico massivo, confermato dai dati dell'IM per cui, per tali dosi di stimolazione l'incidenza di fenomeni come NPB e NBUD assume una rilevanza marginale.

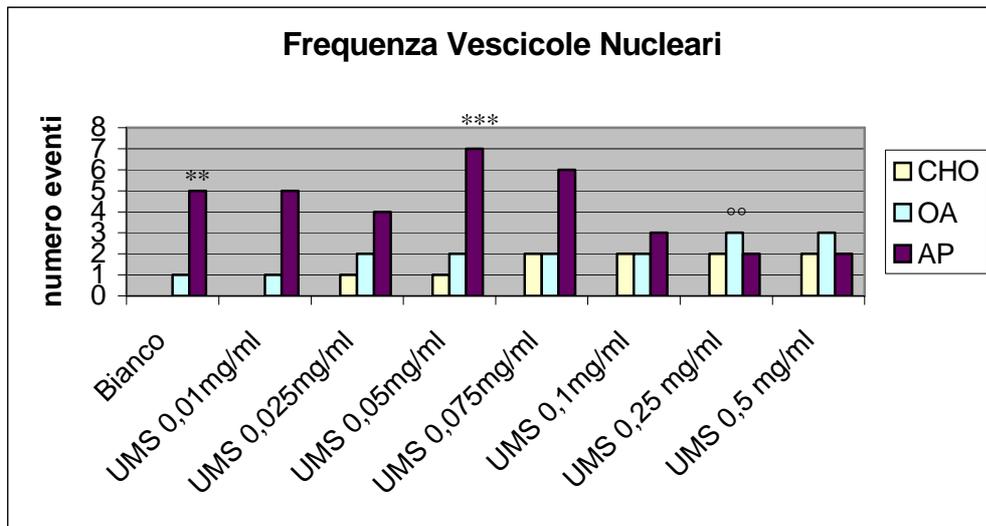


Figura 17. Istogramma relativo alla frequenza di vescicole nucleari NBUD rilevate nei sistemi cellulari utilizzati. \*\*\* : significativamente diverso per  $P < 0,001$  (G test) dal valore riscontrato nelle cellule CHO. \*\* : significativamente diverso per  $P < 0,01$  (G test) dal valore riscontrato nelle cellule CHO. °°:significativamente diverso  $P < 0,001$ , (G test) dal valore riscontrato nelle cellule OA. I risultati sono rappresentativi di 2 esperimenti ripetuti in 3 colture.

Figura 18. Confronto delle frequenze dell'apoptosi nelle colture primarie di sinoviociti da AP, da OA, e nella linea cellulare CHO di *Hamster* a livello basale e durante la stimolazione con diverse concentrazioni di microcristalli di UMS. I risultati sono rappresentativi di 2 esperimenti ripetuti in 3 colture.

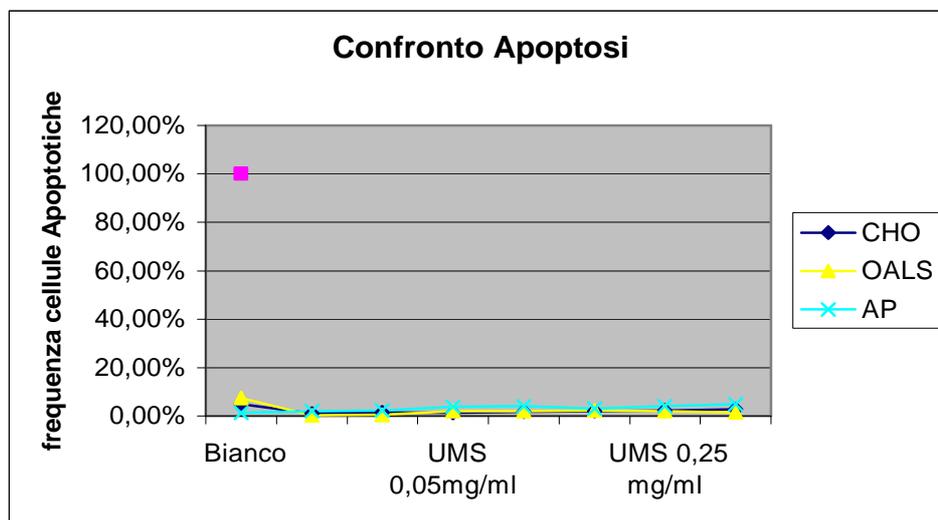


Figura 19. Confronto dell'Indice Mitotico nelle colture primarie di sinoviociti da AP, OA e nella linea cellulare CHO di *Hamster* a livello basale e durante la stimolazione con differenti concentrazioni di microcristalli di UMS. I risultati sono rappresentativi di 2 esperimenti ripetuti in 3 colture.

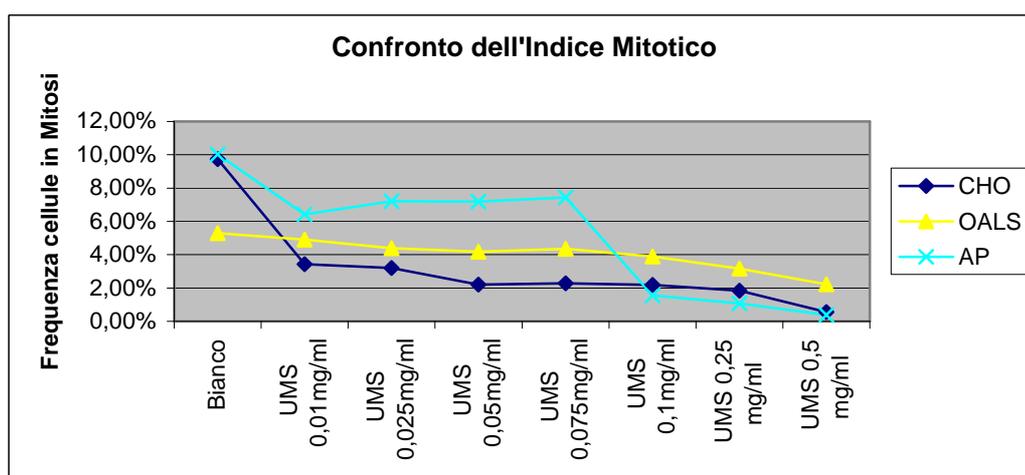


Figura 20. Confronto delle frequenze relative ai nuclei interfascici positivi per l'incorporazione *in situ* di digossigenina-dUTP nelle colture primarie di sinoviociti da AP, OA e nella linea cellulare CHO di *Hamster* a livello basale e durante la stimolazione con differenti concentrazioni di microcristalli di UMS. I risultati sono rappresentativi di 2 esperimenti ripetuti in 3 colture.

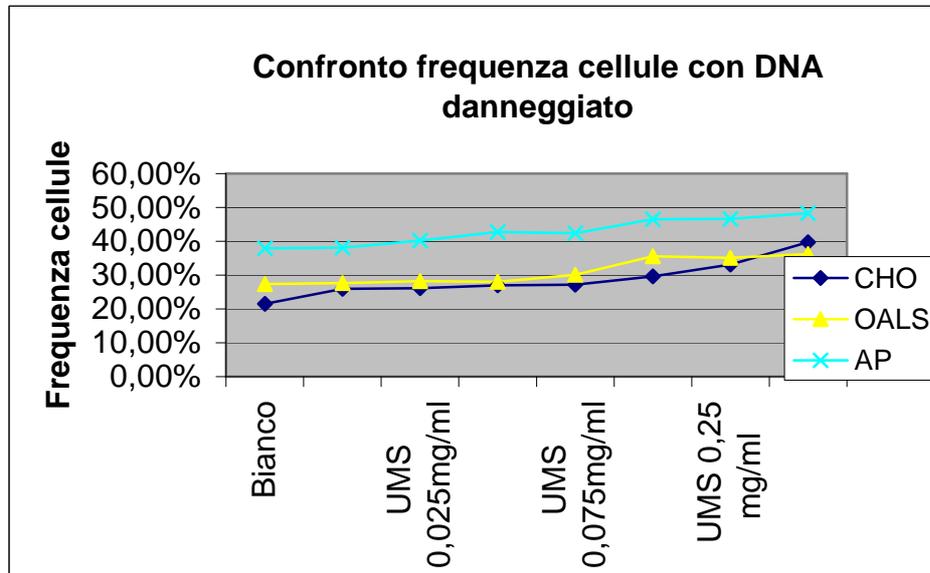


Figura 21 Confronto delle frequenze relative alle cellule micronucleate nelle colture primarie di sinoviociti da AP, OA e nella linea cellulare CHO di *Hamster* a livello basale e durante la stimolazione con differenti concentrazioni di microcristalli di UMS. I risultati sono rappresentativi di 2 esperimenti ripetuti in 3 colture.

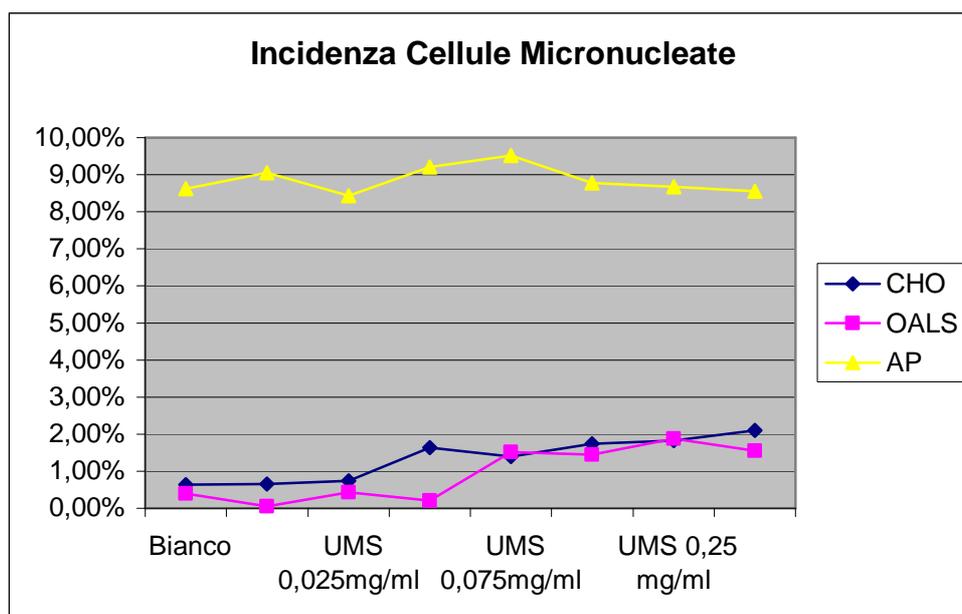
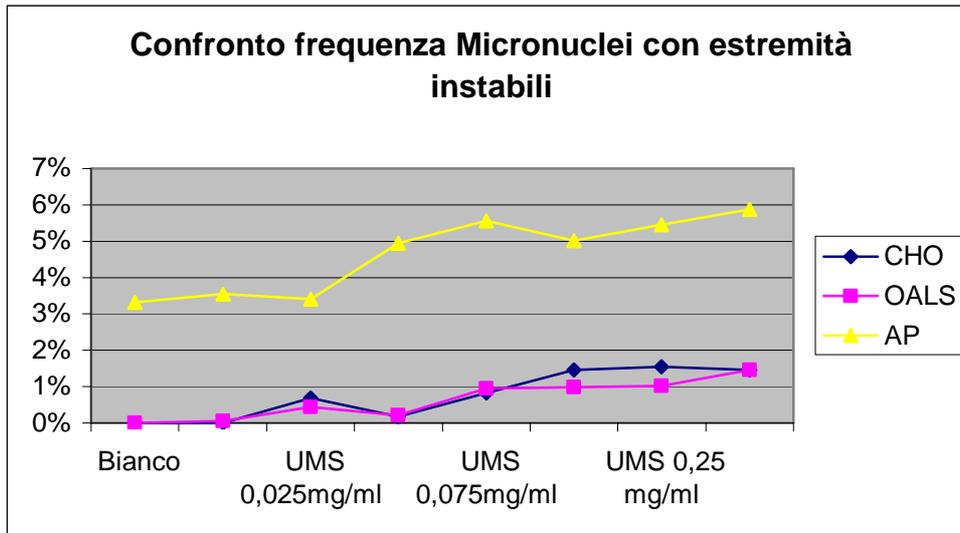


Figura 22 Confronto delle frequenze relative ai Micronuclei caratterizzati per frammenti di DNA instabili , positivi per l'incorporazione *in situ* di digossigenina-dUTP nelle colture primarie di sinoviociti da AP, OA e nella linea cellulare CHO di *Hamster* a livello basale e durante la stimolazione con differenti concentrazioni di microcristalli di UMS. I risultati sono rappresentativi di 2 esperimenti ripetuti in 3 colture.



## Discussione e conclusioni

L'infiammazione *in vitro* da microcristalli di UMS è un sistema sperimentale che permette di riprodurre con buona approssimazione una flogosi acuta in una coltura cellulare e di valutarne differenti aspetti. Lo scopo di questo studio era valutare se, stimolando per 24 ore a differenti concentrazioni di UMS la linea cellulare CHO di controllo e colture primarie di sinoviociti da liquido sinoviale di pazienti affetti da OA e AP, si poteva stabilire se in questo tipo di infiammazione sperimentale *in vitro* si potevano produrre degli effetti di tipo clastogeno. Si definisce come effetto clastogeno qualsiasi evento che induce un danno al DNA che si concreta con la formazione di un gruppo ossidrilico libero in 3'-OH ; questa specie chimica in condizioni normali non si trova mai esposta all'interno di un filamento di DNA integro e la sua presenza è assolutamente tipica di un evento genotossico per la cellula (IAEA ,1986;Wilkie et al, 1993; Jeggo et al. 1998; Gisselsson et al, 2000).

Questo studio ha evidenziato come , rispetto al livello basale la presenza di microcristalli di UMS induceva nella linea CHO di *Hamster* utilizzata come sistema cellulare di controllo un incremento di frammenti di DNA instabile individuati nella presenza di nuclei interfascici marcati dall'avvenuta incorporazione *in situ* della sonda di digossigenina-dUTP, nell'incidenza nella frequenza di cellule con MN. Successivamente il danno al DNA veniva confermato dalla variazione rispetto alla dose di microcristalli utilizzata per la stimolazione di alcune altri eventi significativi come la presenza di MN marcati dalla digossigenina-dUTP, e le figure mitotiche anomale fra cui i NPB e NBUD.

Confrontando i risultati ottenuti per la linea CHO di *Hamster*, che è una linea responsiva e sensibile agli agenti genotossici, con i sinoviociti ottenuti dal liquido sinoviale di pazienti con OA ed AP è possibile affermare, sulla base di questi dati ancora preliminari, che su queste colture primarie la presenza di cristalli di UMS ha indotto un effetto di tipo genotossico del tipo dose dipendente analogamente a quanto rilevato per la linea CHO di controllo.

Per tutte i tipi da danno da effetto clastogeno considerato tuttavia, i sinoviociti derivati da liquido sinoviale di pazienti con AP hanno evidenziato , a livello basale come in presenza di crescenti stimolazioni di UMS un'incidenza di danno genomico significativamente maggiore rispetto ai Sinoviociti derivati da OA. Tale maggiore sensibilità per gli agenti genotossici potrebbe derivare dal fatto che le colture primarie di sinoviociti da AP originano da un liquido sinoviale e , più in generale, da condizioni di infiammazione più significative rispetto a quelli da OA.

In questo studio è stata eseguito per ogni punto sperimentale considerato il test di Tunel per la quantificazione dell'apoptosi nei sistemi cellulari considerati ed è stato rilevato l'indice mitotico IM. L'apoptosi come esito eventuale del ciclo cellulare nel normale *turnover* tessutale oppure come "via d'uscita" per la cellula che abbia subito un danno a livello genomico o metabolico è un parametro importante non solo per la vitalità dell'intera coltura cellulare ma anche per la responsabilità della popolazione cellulare di fronte ad un insulto esterno. La linea cellulare CHO analogamente alle colture primarie da OA hanno una frequenza di cellule in apoptosi attorno compresa fra il 5 ed il 7% compatibile con una situazione di coltura alla fine della fase di crescita esponenziale (e quindi vicina alla confluenza) in cui il *rate* di divisione cellulare riassumibile dall'indice mitotico è appena superiore al 10%.

In presenza di stimolazione con microcristalli di UMS la frequenza delle cellule in apoptosi per la linea CHO e la coltura primaria di sinoviociti da OA subiva un decremento significativo evidenziando valori inferiori al 1% di incidenza sulla popolazione totale. Aumentando la dose di stimolazione la frequenza delle cellule apoptotiche incrementava in funzione della dose , in maniera lineare per la linea CHO, mentre per i sinoviociti da OA l'apoptosi aumentava, mentre per dosi di UMS pari o superiori a 0,1mg/ml diminuiva lievemente.

A livello basale l'apoptosi dei sinoviociti da AP risultava molto inferiore rispetto agli altri sistemi; tuttavia questa coltura primaria rispondeva in maniera analoga alle cellule CHO ed ai sinoviociti AP alla presenza di dosi crescenti di microcristalli UMS.

Osservando questi dati si può ipotizzare che relativamente all'apoptosi la presenza di microcristalli di UMS , anche già a concentrazioni di 0,01mg/ml agisca con modalità di tipo "switch on/switch off" spegnendo di fatto l'apoptosi, per poi variarne successivamente la frequenza in funzione della dose di stimolazione.

Considerando che sono stati descritti in letteratura differenti *pathway* molecolari e biochimici attraverso cui uno stimolo esterno può indurre apoptosi ; un'ipotesi per interpretare i risultati fin

qui illustrati potrebbe consistere nel fatto che a livello basale le cellule utilizzate prediligono una via preferenziale all'apoptosi che potrebbe essere quella per esse costitutiva.

In presenza di microcristalli di UMS , anche a basse concentrazioni, tale via viene inibita (*switched off*) in maniera significativa o totale ed all'aumentare della dose ne viene attivata una alternativa (*switched on*) che correla con i microcristalli di UMS in maniera dose dipendente.

Questa ipotesi da verificare , nel suo impianto teorico, sarebbe coerente con quanto osservato per i neutrofili nella gotta, dove in corso di infiammazione acuta, subiscono una significativa diminuzione dell'apoptosi potenziando ed amplificando la risposta infiammatoria da essi indotta (Akahoshi et al, 1997).

Senza contare che nel caso dei linfociti uno sbilanciamento nel processo apoptotico con un incremento del tasso di sopravvivenza di linfociti T autoreattivi potrebbe indurre l'insorgenza di fenomeni autoreattivi persistenti.

L'Artrite Psoriasica assieme con l'Artrite Reumatoide ed altre patologie infiammatorie articolari sono state poste in relazione con un incrementato rischio per i pazienti di insorgenza di patologie neoplastiche come i tumori alla pelle , ai polmoni ed i linfomi (Olsen et al 1992; Frentz et al, 1999; Hannuksela Svahn, 2000; Boffetta et al , 2001, Margolis et al, 2001).

Anche se è stato ipotizzato che l'insorgenza di neoplasie in pazienti affetti da patologie articolari sia dovuto all'utilizzo di farmaci citotossici ed immunosoppressivi ; l'associazione fra infiammazione, terapie farmacologiche impiegate ed insorgenza della neoplasia rimane del tutto ignota. Molti studi retrospettivi e prospettici di pazienti affetti da AR hanno mostrato che questi pazienti evidenziano un rischio maggiore di insorgenza di tumori colo-rettali e di neoplasie linfoproliferative (Chakravarty e Genovese, 2004).

In particolare linfomi non Hodgkin a grandi cellule tendono a comparire più frequentemente in pazienti con media o alta attività di malattia (Baecklund et al, 2003).

Rohekar e colleghi recentemente hanno evidenziato in un largo studio prospettico su 665 pazienti canadesi affetti da artrite psoriasica come l'incidenza di neoplasie in questo vasto campione non sia diversa rispetto a quella riscontrata nella popolazione canadese in generale (Rohekar et al, 2008).

Tuttavia lo stesso studio metteva in evidenza che una elevata VES era predittiva dello sviluppo di neoplasie fra gli stessi pazienti affetti da Artrite Psoriasica. Invece sembrava non esservi relazione fra l'insorgenza di tumori e l'utilizzo nella terapia di farmaci citotossici ed immunosoppressivi come il Metotrexate o gli anti-TNF $\alpha$  .

Il nostro modello indica come in un modello sperimentale di infiammazione acuta indotta da microcristalli UMS i sinoviociti da Osteoartrosi e da Artrite Psoriasica subiscono un danno genotossico che si manifesta attraverso la formazione di frammenti di DNA instabile.

La presenza di DNA instabile e, di per sé altamente reattivo, è considerato universalmente uno degli *hallmark* della cancerogenesi ma finora non era mai stato correlato alla patogenesi ed allo sviluppo dell'infiammazione.

I dati preliminari proposti in questo studio indicano che questo semplice modello sperimentale può risultare utile per valutare il danno al genoma a carico di cellule e tessuti coinvolti nelle patologie infiammatorie articolari e per valutarne il comportamento e l'evoluzione in queste condizioni.

Inoltre , in prospettiva, analoghi test *in vitro* su cellule ottenute dal liquido sinoviale di pazienti potrebbero essere predittivi dal punto di vista clinico nel valutare preventivamente l'evoluzione di una data popolazione cellulare in condizioni di stress infiammatorio cronico ed acuto e nel comprendere il grado di potenziale cito- e geno-tossicità che un determinato trattamento farmacologico potrebbe indurre a livello cellulare in un dato paziente.

## Tavola 1

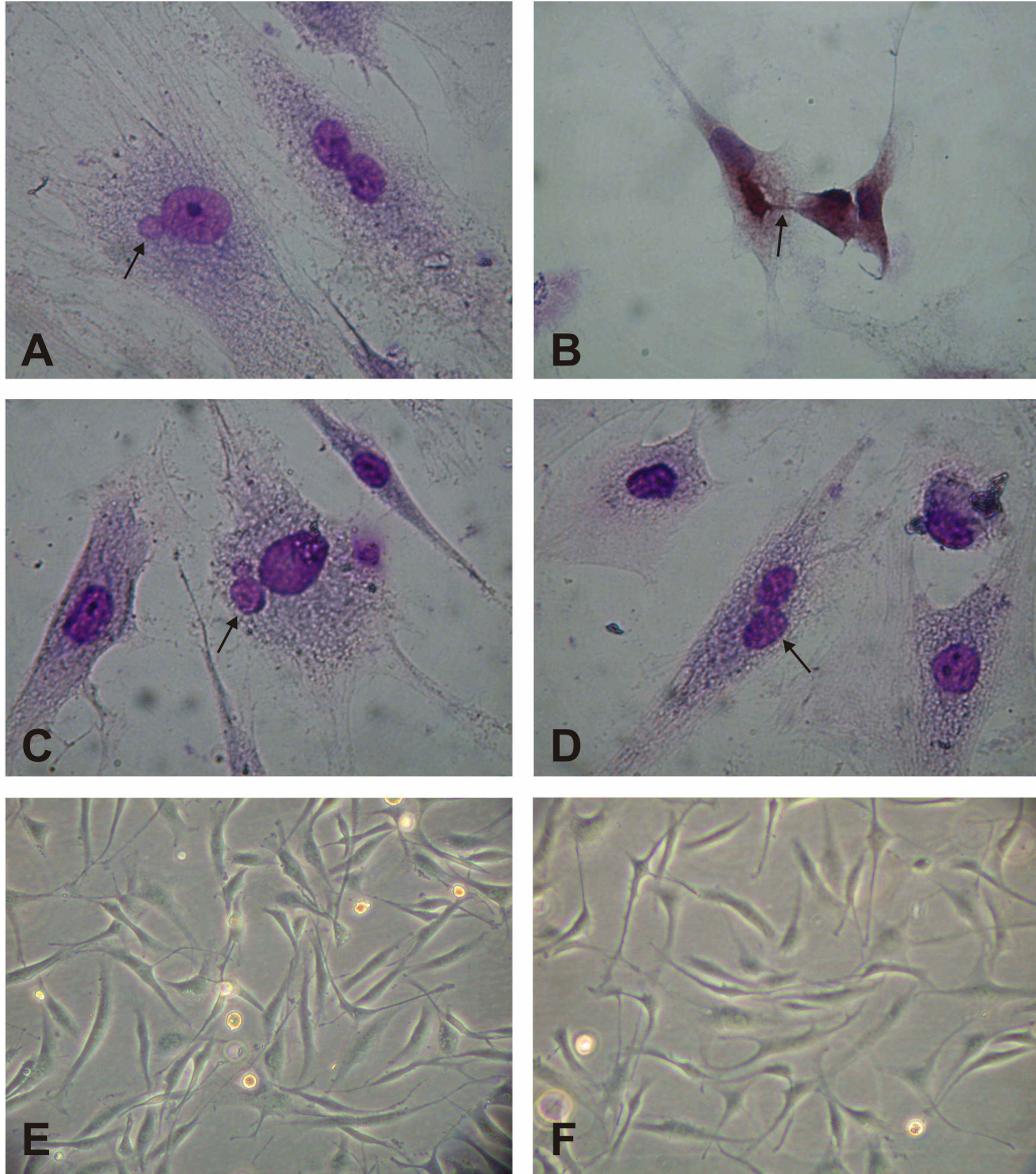


Figura A,B, C, D.: Immagini di aberrazioni citologiche in colture primarie di sinoviociti da OA stimulate per 24 ore con 0,1 mg/ml di UMS. A: NBUD; B, NPB; C: cellula trinucleate prodotto di una disfunzione mitotica; D: cellule binucleata. Colorazione di May-Grunwald Giemsa. Ingrandimento 100X.

Figure E, F: Immagini delle stesse colture primarie dalla capsula di coltura. Ingrandimento 20X

Tavola 2

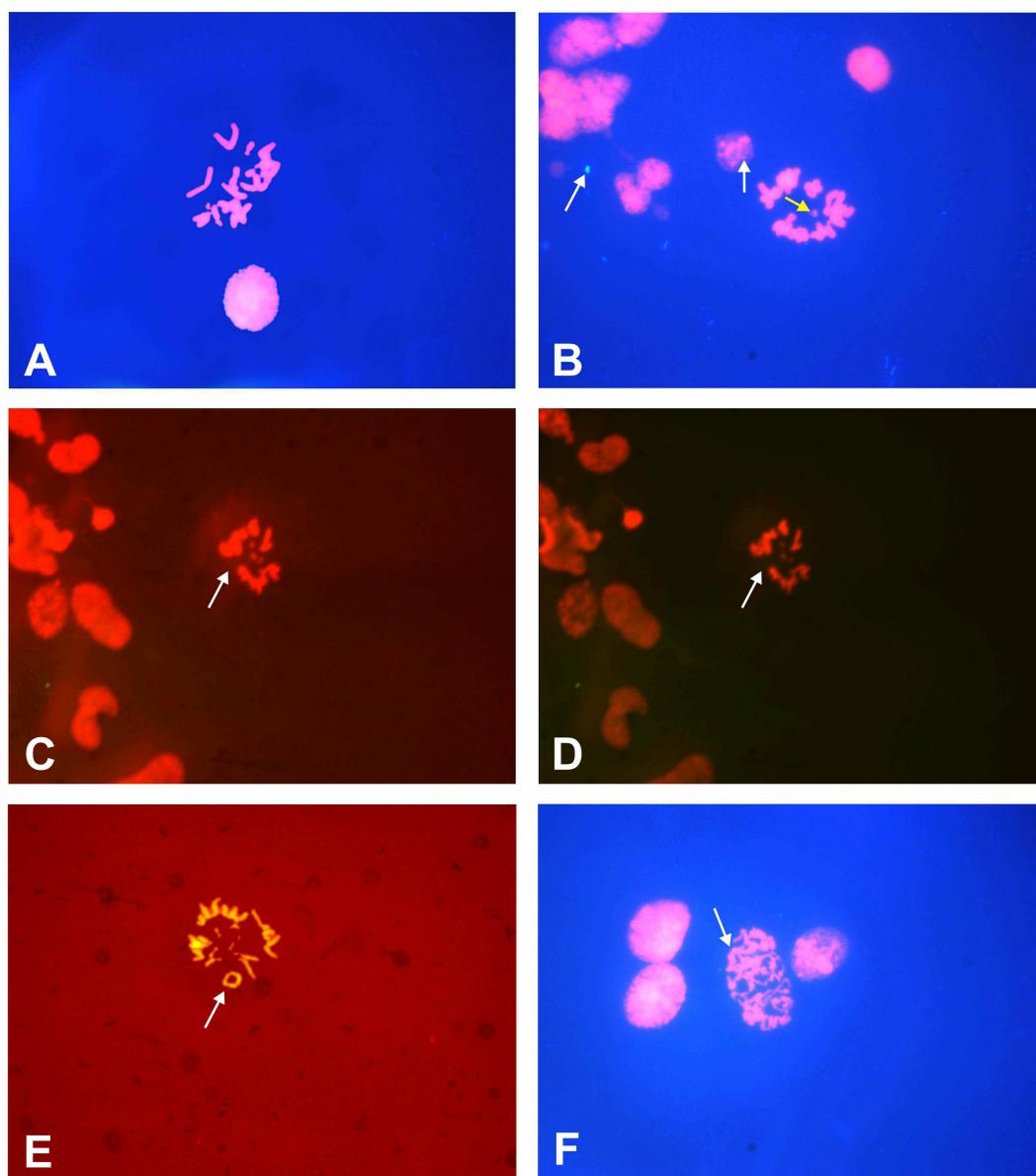


Figura A: Metafase da coltura primaria di Sinoviociti da AP. Figura B: Immagine da coltura primaria da AP stimolata per 24 h con 0,1mg/ml di UMS. La freccia a sinistra indica un MN con un segnale fluorescente di digossigenina-dUTP; la freccia centrale indica un segnale fluorescente di incorporazione *in situ* in un nucleo interfase; a destra una metafase con frammenti di DNA instabile. Figura C e D. Metafase di Sinoviociti da AP stimolata per 24 h con 0,075 mg/ml di UMS. La freccia indica frammenti di DNA instabili. Figura E; nella stessa coltura primaria delle figure C e D, la freccia indica un cromosoma ad anello. Figura F. sinoviociti da AP stimolati per 24 h con 0,5 mg/ml, metafase poliploide. Microscopio Zeiss (obiettivo 100x) con filtro per TRITC e FITC (verde). E' stato utilizzato inoltre un filtro specifico (Zeiss, set 25) che permette il rilevamento contemporaneo della colorazione con ioduro di propidio e dell'avvenuta incorporazione o ibridazione *in situ* con la FITC.

### Tavola 3

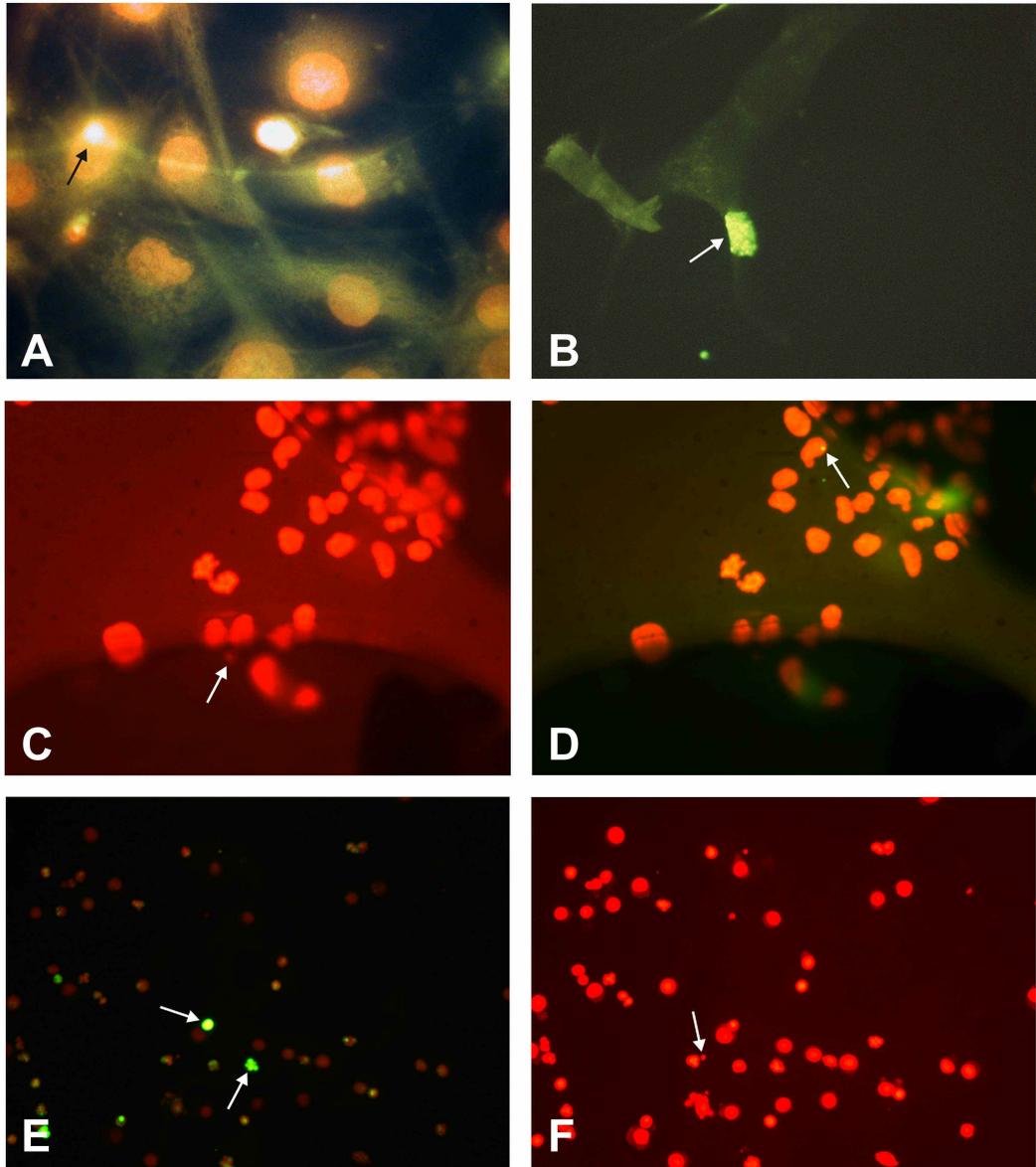


Figura A: segnale di avvenuta incorporazione *in situ* in una cellula CHO stimolata per 24 h con 0,1 mg/ml di UMS (Ingrandimento100X). Figura B: Apoptosi (test di TUNEL) in una coltura primaria di sinoviociti da OA(Ingrandimento100x). Figura C e D. Sinoviociti da AP stimolati per 0,1mg/ml di UMS per 24 h; in C è evidenziato un MN, in D incorporazione *in situ* in un nucleo interfascici (Ingrandimento100X). Figure E ed F. Test di TUNEL in cellule CHO. Le frecce indicano cellule in apoptosi (Ingrandimento 20X). Microscopio Zeiss (obiettivo 100x) con filtro per TRITC e FITC (verde). E' stato utilizzato inoltre un filtro specifico (Zeiss, set 25) che permette il rilevamento contemporaneo della colorazione con ioduro di propidio e dell'avvenuta incorporazione o ibridazione *in situ* con la FITC.

**Adam Klages S, Adam D, Janssen O., Kabelitz D.** Death receptors and caspases : role in lymphocyte proliferation, cell death and autoimmunity. *Immunol Res* 1986. 33(2):149-166

**Aigner T, Soeder S, Gebhard PM, McAlinden A, Haag J.** Mechanisms of disease: role of chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis-structure, chaos and senescence. *Nat Clin Pract Rheumatol*, 2007, 3(7): 391-399.

**Akahoshi T, Nagaoka T, Namai R, Sekiyama N, Kondo N.** Prevention of neutrophil apoptosis by monosodium urate crystals. *Rheumatol Int.* 1997;16(6):231-5.

**Akhbar AN, Borthwick NJ, Wickremasinghe RG, Panayotidis P, Boffill M, Reed JC, Salmon M.** Interleukin-2 receptor common gamma-chain signaling cytokines regulate activated T cell apoptosis in response to growth factor withdrawal: selective induction of anti-apoptotic (bcl-2, bcl-xL) but not pro-apoptotic (bax, bcl-xS) gene expression. *Eur J Immunol.* 1996 ;26(2):294-9.

**Alarcon-Segovia D, Ruiz Arguelles A, Llorente L.** Antibody penetration into living cells.II. Anti-ribonucleoprotein Ig G penetrates into T gamma lymphocytes causing their deletion and the abrogation of supressor function. *J Immunol* 1979. 122: 1855-1862

**Antonsson B, Conti F, Ciavatta A, Montessuit S, Lewis S, Martinou I, Bernasconi L, Bernard A, Mermod JJ, Mazzei G, Maundrell K, Gambale F, Sadoul R, Martinou JC.** Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science* 1997 18;277(5324):370-2.

**Aringer M, Wintersperger W, Steiner CW, Kiener H, Jaeger U, Graninger WB** High levels of bcl-2 protein in circulating T lymphocytes, but not B lymphocytes, of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1994 ,37(10):1423-30

**Ashkenazi A, Dixit VM** Apoptosis control by death and decoy receptors.*Curr Opin Cell Biol* 11(2): 255-260

**Baecklund E, Sundstrom C, Ekbom A, Catrina A, Biberfeld P, Feltelius N** Lymphoma subtypes in patients with rheumatoid arthritis: increased proportion of diffuse large B cell lymphoma. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 1543-1555

**Bardin T, Cherian PV, Schumacher HR.** Immunoglobulins on the surface of monosodium urate crystals: an immunoelectron microscopic study. *J Rheumatol* 1984: 11: 339-341

**Bave U, Nordmark G, Lovgren T, Ronnelid J, Callander S, Eloranta ML, Alm GV, Ronnblom L.** Activation of the type I interferon system in primary Sjogren syndrome : a possible etipathogenetic mechanism. *Arthritis Rheum* 52: 1185-1195

**Bodmer JL, Schneider P, Tschopp J** The molecular architecture of the TNF superfamily.*Trends Biochem Sci* 2002: 27; 19-26

**Boffetta P, Gridley G, Lindelof B** Cancer risk in a population based cohort of patients hospitalized for psoriasis in Sweden *J Invest Dermatol* 2001, 117:1531-1537

**Bonassi S, Ugolini M, Kirsch-Volders U, Stromberg R, Vermeulen R, Tucker JD.** Human population studies with cytogenetic biomarkers: review of the literature and future perspectives. *Environ Mol Mutag* (2005) 45; 258-270

**Brady H. J. M , Gil-Gómez G.** Molecules in focus Bax. The pro-apoptotic Bcl-2 family member, Bax . *Int J Biochem Cell Biol* 1998, 647-650

**Caron Leslie LA, Evans RB, Cidlowski JA.** Bcl-2 inhibits glucocorticoid induced apoptosis but only partially blocks calcium ionophore or cyclohexymide regulated apoptosis in S49 cells. *FASEB J* 1994 (8) 639-645

**Ceponis A, Hietanen J, Tamulatiene M, Partsch G, Patiala H, Konttinen YT** A comparative quantitative morphometric study of cell apoptosis in synovial membranes in psoriatic, reactive and rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 1999; 38: 431-440

**Chakravarty EF, Genovese MC** Associations between rheumatoid arthritis and malignancy *Rheum Dis Clin North Am* 2004; 30:271-284

**Chapman PT, Lewis A, Chavalier E, Blair EJ, Kravtsova OV, G Radovanovic, Lawrence B.** Endothelial activation in monosodium urate monohydrate crystal induced inflammation in vitro and in vivo studies on the roles of tumor necrosis factor alpha and interleukin 1. *Arthritis Rheum.* 1997 .40. 955-965

**Chen CJ, Shi Y, Hearn A, Fitzgerald K, Golenbock D, Reed G, Akira S, Rock K.** MyD88 dependent IL-1 receptor signalling is essential for gouty inflammation stimulated by monosodium urate crystals. *J Clin Invest.* 2006. 116 , 2262-2271.

**Cipriani P., Fulminis A, Pingiotti E, Marrelli A, Liakouli V, Perricone R, A. Pignone, M Matucci-Cerinic, R. Giacomelli.** Resistance to apoptosis in circulating alpha/beta and gamma/delta T lymphocytes from patients with systemic sclerosis. *J. Rheumatol.* 2006 Oct;33(10):2003-14

**Dalbeth N, Haskard O.** Inflammation and tissue damage in crystal deposition diseases. *Curr Op Rheumatol* 2005. 17: 314-319

**Denko CW, Whitehouse MW.** Experimental inflammation induced by natural occurring microcrystalline salts. *J Rheumatol* 1976. 3:54

**De Pinho F** The age of cancer *Nature.* 2000 408:248-254

**Di Giovine FS, Malawista SE, Nuki G, Duff GW.** Interleukin 1 (IL-1) as a mediator of crystal arthritis. Stimulation of T cell and synovial fibroblast mitogenesis by urate crystal induced IL-1. *J Immunol* 1987,138: 3213-3218.

**Emerit I, Filipe P, Meunier P, Auclair G, Freitas G, Derouassant J, Gouyette A, Fernandes A.** Clastogenic activity in the plasma of scleroderma patients: a biomarker of oxidative stress. *Dermatology* 1997; 194, 140-146.

**Evans CH, Watkins SC, Stafanovic Racic M** Nitric Oxide and cartilage metabolism. *Methods Enzymol* 269:75-88

**Fenech M** Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mut Res* 2006; 600: 58-66

**Fenech M** The in vitro micronucleus technique. *Mut Res* 2000; 455: 81-95

**Fenech M, Holland M, Chang WP, Zeiger E, Bonassi S.** The Human Micronucleus Project (HUMN): an international collaboration study on the use of micronucleus techniques for measurement of DNA damage in humans. *Mut Res* 1999; 428: 271-283

**Fields TR, Abramson SB, Weismann G, Kaplan AP, Ghebrehiwet B.** Activation of the alternative pathway of complement by monosodium urate crystals. *Clin Immunol Immunopathol.* 1983. 26: 249-257

**Finnie NJ, Gottlieb TM, Blunt T, Jeggo PA, SP Jackson** DNA dependent protein kinase activity is absent in xrs-6 cells: implications for site specific recombination and DNA double strand break repair *PNAS* 1995 (92) 320-324

**Frentz G, Olsen JH.** Malignant tumours and psoriasis: a follow up study. *Br J Dermatol* 1999; 140: 237-242

**Freudweiler M.** Studies on the nature of gouty tophi. *Dtsch Arch Klin Med* 1899. 63. 266.

**Garcia Ramallo E, Marques T, Prats N, Beleta J, Kunkel SL, Godessart N.** Resident cell chemokine expression serves as the major mechanism for leukocyte recruitment during local inflammation.. *J Immunol.* 2002. 169(11): 6467-6473.

**Gaudry M, Roberge CJ, De Medicis R, Lussier A, Poubelle PE, Naccache PH.** Crystal induced neutrophil activation.III. Inflammatory microcrystals induce a distinct pattern of tyrosine phosphorylation in human neutrophils. *J Clin Invest.* 1993; 91: 1649-1655.

**Ghosh P** The pathology of osteoarthritis and the rationale for use of pentosane polysulfate for its treatment. *Semin Arth Rheum* 1999 (28): 211-267.

**Ghosh P, Smith M** Osteoarthritis , genetic and molecular mechanisms. *Biogerontology* 2002. (3):85-88

**Gladman DD, Brockbank J** Psoriatic arthritis *Expert Opin Investig Drug*, 2000: (9):1511-1522

**Gordon JR, Galli SJ** Mast cells are a source of both preformed and immunologically inducible TNF-alpha/cachectin. *Nature* 1990. 346: 274-276

**Gordon KB, Ruderman EM** The treatment of psoriasis and psoriatic arthritis: an interdisciplinary approach. *J Am Acad Dermatol* 2006. 54 S 85-91

**Guerne PA, Terkeltaub R, Zuraw B, Lotz M.** Inflammatory microcrystals stimulate interleukin 6 production and secretion by human monocytes and synoviocytes. *Arthritis Rheum* 1989, 32:1443-1452.

**Hall JC, Casciola Rosen L, Rosen A.** Altered structure of autoantigens during apoptosis. *Rheum Dis Clin North Am* 2004; 30(3): 455-471

**Hannuksela Svahn A, Pukkala E, Laara E, Poikolainen K, Karvonen J** Psoriasis , its treatment and cancer in a cohort of finnish patients. *J Invest Dermatol* 2000; 114:587-90

**Humphrey-Beher MG, Peck AB, Dang H, Talal N** The role of apoptosis in the initiation of the autoimmune response in Sjogren syndrome *Clin Exp Immunol* 1999; 116: 383-387

**International Atomic Energy Agency (IAEA) Technical Reports** Series no. 260, biological dosimetry: chromosomal aberrations analysis for dose assesment. IAEA, Wien 1986; 13-27.

**Iarmarcovai G; Bonassi S, Botta A, Baan RA. Orsiere T.** Genetic polymorphism and micronucleus formation: A review of the literature. *Mut Res* E-pub in press, 2008

**Inokuchi T, Moriwaki Y, Tsutui H, Yamamoto A, Takahashi S, Tsutumi Z, T Ka, Nakanishi K, Yamamoto T.** Plasma interleukin (IL)-18 (interferon- $\gamma$ -inducing factor) and other inflammatory cytokines in patients with gouty arthritis and monosodium urate monohydrate crystal induced secretion of IL-18. *Cytokine* 2006, 33:21-26

**Jacques BC, Ginsberg MH.** The role of cell surface proteins in platelet stimulation by monosodium urate crystals. *Arthritis Rheum* 1982. 508-521.

**Jaramillo M, Naccache PH, Olivier M.** Monosodium Urate Crystals synergia with with IFN- $\gamma$  to generate macrophage nitric oxide ; involvement of extracellular signals regulated kinase  $\frac{1}{2}$  and NF- $\kappa$ B. *J Immunol* 2004. 5734-5742.

**Jeggio PA** Identification of genes involved in repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Radiat Res* 1998, (150)-S80-91

**Jonsson H, Allen P , Peng SL.**Inflammatory arthritis requires foxo3a to prevent Fas ligand induced neutrophil apoptosis. *Nature Med* 2005, 11, 666-671

**Kelley WN, Schumacher HR** Crystal associated synovitis. In Kelley WN, Harris ED, Ruddy S, Sledge CB. “ *Textbook of Rheumatology*” 4rd ed. Saunders WB Co.; Philadelphia 1993; pp 1291-1336.

**Kim HA, Blanco FJ.** Cell death and apoptosis in osteoarthritic cartilage. *Curr Drug Targets* 2007. 8(2):333-345.

**Kim WU, Kwok SK, Hong KH, Yoo SA, Kong JS, Choe J, Cho CS.** Soluble Fas ligand inhibits angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2007.9 (2):R42

**Landis RC, Yagnik DR, Florey O** Sale disposal of inflammatory monosodium urate monohydrate crystals by mouse macrophages. Implications for the control of joint inflammation in gout. *Arthritis Rheum* 2002 46: 3026-3033

**Liotè F, Bardin Th:** Pourquoi la crise de goutte s’interrompt-elle spontanément? In De Seze S, Ryckewaert A, Kahn MF et coll. « *L’actualité Rheumatologique* » Expansion Scientifique, Paris, 1995, pg 260-268

**Liu Bryan R, Scott P, Sydlaske A, Rose D, Terkeltaub R.** Innate immunity conferred by Toll-like receptors 2 and 4 and myeloid differentiation factor 88 expression is pivotal to monosodium urate monohydrate crystal induced inflammation. *Arthritis Rheum* 2005. 52: 2936-2946

**Lorenz HM, Hermann M, Winkler T, Gaipf U, Kalden JR** Role of apoptosis in autoimmunity. *Apoptosis* 2000, 5:443-449

**Loeser RF, Shanker G, Carson CS, Gardin JF, Shelton BJ, Sonntag WE.** Reduction in the chondrocyte response to IGF-1 in aging and osteoarthritis. Studies in a non human primate model of naturally occurring disease. *Arthritis Rheum* 2000. 43: 2110-2120

**Ma C, Martin S, Trask B, Hamlin JL.** Sister chromatid fusion initiates amplification of the dihydrofolate reductase gene in Chinese Hamster cells. *Genes Dev.* 1993, 7 : 605-620.

**Mackay IR, Leskovek NV, Rose NR.** Cell damage and autoimmunity: a critical appraisal. *J Autoimmunity* 2008. (30) 5-11.

**Mahoney J, Rosen A** Apoptosis and Autoimmunity *Curr Opin Immunol* 2005.17: 583-588

**Majone F, Zamboni D, Cozzi F, Montaldi A, Grypiotis P, Luisetto R, Favaro M, Tonello M, Ruffatti A.** Unstabilized DNA breaks in lymphocytes of patients with systemic sclerosis. *Eur J Dermatol* 16(3): 258-261

**Manicassamy S, Gupta S, Huang Z, Molkentin JD, Shang W, Sun Z.** Requirement of calcineurin a for the survival of naive T cells. *J Immunol.* 2008 1;180(1):106-12.

**Margolis D, Bilker W, Hennessey S, Vittorio C, Santanna J, Strom BL** The risk of malignancy associated with psoriasis. *Arch Dermatol* 2003.137:778-783

**Martinon F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J.** Gout associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*. 2006. 440: 237-241

**Matsumura R, Umeyia K, Goto T, Nakazawa T, Ochiai K, Kagami M, Tomioka H, Tanabe E, Sugiyama T, Sueishi M.** Interferon Gamma and Tumor Necrosis Factor Alpha induces Fas expression and anti-Fas mediated apoptosis in salivary gland ductal cell line. *Clin Exper Rheumatol* 2000; 18: 311-318

**Miller EJ, Breisford WG.** Interleukin-8: the major neutrophil chemotaxin in case of psudogout. *J Rheumatol* 1993.20:1250-1252.

**Mountz JD, Wu J, Cheng J, Zhou T.** Autoimmune disease: a problem of defective apoptosis. *Arthritis Rheum* 1999. 37: 1415-1420

**Murakami Y, Akahoshi T, Hayashi I, Endo H, Kawai S, Inoue M, Kondo H, Kitasato H.** Induction of Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells in Murine Resident Peritoneal Macrophages by Monosodium Urate Monohydrate Crystals. *Arthritis and Rheum.* 2006. 2: 455-462

**Okamura H, Tsutsui H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T; Torigoe T, Okura T, Nukadsa Y, Hattori K, Akita K, Namba M, Tanabe F, Konishi K, Fukuda S, Kurimoto M** Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. 1996. *Nature* 15: 379(6566):591

**Oliviero F, Punzi L** L'inflammation articolare da microcristalli . *Reumatismo* 2003. 55(1):16-27

**Olsen JH, Moller H, Frentz G** Malignant tumors in patient with psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 1992; 27: 716-722

**Pastink A; Eeken JC, Lohman PH.** Genomic integrity and the repair of double-strand DNA breaks. *Mut Res.*2001 480-481: 37-50

**Punzi L** Manuale di analisi del liquido sinoviale. Edimes edizioni 2005

**Ortiz Bravo E, Baker DG, Schumacher HR.** Mechanisms involved in the initiation, perpetuation and self limited nature of acute gouty arthritis. *Rev Rheum Eng ed* 1994; 61:121-126.

**Ortiz Bravo E, Sieck MS, Schumacher HR.** Changes in the protein coating monosodium urate crystals during active and subsiding inflammation. Immungold studies of synovial fluid from patients with gout or fluids obtained using the rat subcutaneous air pouch model. *Arthritis Rheum* 1993; 36: 1274-1285.

**Pascual E, Jovani V.** A quantitative study of the phagocytosis of urate crystals in the synovial fluid of asymptomatic joints of patients with gout. *Br J Rheumatol* 1995. 34. 724-726

**Porcello G, Scarpato R, Storino F, Cagetti F, Marcolongo R, Migliore L, Ferri C, Galeazzi M** The high frequency of spontaneous micronuclei observed in lymphocytes of systemic sclerosis patients: preliminary results. *Reumatismo* 2002; 34: 36-39

**Reza K, Schell-Toerner D, Lee CY, Pilling D, Curnow CJ, Falciani F, Trevino V, Kumar K, Assi LK, Lord JM, Gordon C, Buckley CD, Salmon M.** Synovial fluid leukocyte apoptosis is inhibited in patients with very early rheumatoid arthritis *Arthritis Res Ther.* 2006;8(4):R120

**Roberge CJ, De Medicis R, Dayer JM, Rola Pieszczyński M, Naccache PH, Poubelle PE.** Crystal induced neutrophil activation.V. Differential production of biologically active IL-1 and IL-1 receptor antagonist. *J Immunol* 1994 152:5485-5494

**Rohekar S, Tom BDM, Hassa A, Schentag CT, Farewell VT, Gladman DD.** Prevalence of malignancy in Psoriatic Arthritis. *Arthritis Rheum* 2008. (58) 1: 82-87

**Rossi AG, Sawattky DA, Walzer A, Ward C, Sheldrake TA, Riley NA, Caldicott A, Martinez Llosa M, Walzer TR, Duffin R, Gray M, Crescenzi E, Martin M, Brady HJ, Savill JS, Dransfield I, Haslett C.** Cyclin dependent kinase inhibitors enhance the resolution of inflammation by promoting cell apoptosis. *Nat Med* 2006, 12, 1056-1064.

**Roux-Lombard P, Punzi L, Hasler F, Bas S, Todesco S, Gallati H et al.** Soluble tumor necrosis factor receptor in human inflammatory synovial fluids. *Arthritis Rheum* 1993. 36: 485-489

**Ruggero V, Tavernier J, Fiers W, Baglioni C** Induction of the synthesis of tumor necrosis factor receptors by IFN- $\gamma$ . *J Immunol* 136(7): 2445-2450

**Ryckman C, Gilbert C, DeMedicis R.** Monosodium Urate monohydrate crystals induce the release of the proinflammatory protein S100A8/A9 from neutrophils. *J Leukoc Biol* 2004, 76:433-440

**Savill J, Dransfield I, Hogg N, Haslett C** Vitronectin receptor mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature* 1990. 343.170-174

**Scanu A, Oliviero F, Braghetto L, Ramonda R, Luisetto R, Calabrese F, Pozzuoli A, Punzi L.** Realizzazione di colture di sinoviociti da liquido sinoviale. *Reumatismo* 2007. 59(1):66-70

**Schiavon F, Marson P, Punzi L, Malatesta V, Gambari PF.** Total complement activity in synovial fluid: an overview of 370 cases of knee joint effusion. 1987 *Clin Exp Rheumatol* 5S:171

**Schmitt E, Paquet C, Beauchemin M, Bertrand R.** DNA-damage response network at the crossroads of cell cycle checkpoints, cellular senescence and apoptosis. 2007. *J Zhejiang Univ Sci B* 2007. 8(6):377-397

**Sedelnikova O, Horikawa I, Zimonjic DB, Popescu NC, Bonner WM, Barrett JC.** Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unreparable double strand breaks. *Nature* 2003; 425: 168-172

**Serrano-Garcia L, Montero Montaya R.** Micronuclei and chromatid buds are the result of related genotoxic events. *Environ Mol Mutagen* 2000; 38: 38-45

**Shi Y, Evans JE, Rock KL.** Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system cells to dying cells. *Nature*. 2003. 425. 516-521.

**Shimizu N, Shimuara T, Tanaka T.** Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of MNi. *Mutat Res* 2000; 448: 81-90

**Shimura M, Onozuka T, Yamaguchi K, Hatake K, Takaku F, Ishizaka Y.** Mni formation with chromosome breaks and gene amplification caused by *Vpr*, an accessory gene of human immunodeficiency virus. *Cancer Res* 1999; 59: 2259-2264

**Smith MD, Triantafillou S, Parker A, Youssef PP, Coleman M.** Synovial membrane inflammation and cytokine production in patients with early osteoarthritis. *J Rheumatol* 24: 365-371.

**Sokal T, Rohlf G:** Biometry. Freeman and co. 1973 San Francisco USA

**Terkeltaub RA, Ginsberg MH.** The inflammatory reaction to crystals *Rheum Dis Clin North Am* 1998. 14: 353-364.

**Terkeltaub RA, Tenner AJ, Kozin F, Ginsberg MH.** Plasma protein binding by monosodium urate crystals *Arthritis Rheum* 1983; 26 : 775-7783

**Toledo F, Le Roscouet D, Buttin G, Debatisse.** Co-amplified markers alternate in megabase long inverted repeats and cluster independently in interphase nuclei at early steps of mammalian gene amplification. *EMBO J* 1992, 11 (7) 2665-2673.

**Tudan C, Fong D, Duronio V, Burt HM, Jackson JK.** The inhibition of spontaneous and tumor necrosis factor-alpha induced neutrophil apoptosis by crystals of calcium pyrophosphate dihydrate and monosodium urate monohydrate. *J Rheumatol.* 2000 (10):2463-72

**Yagnik DR, Evans BJ, Florey O.** Macrophage release of TGF- $\beta$ 1 during resolution of monosodium urate monohydrate crystal induced inflammation *Arthritis Rheum* 2004. 50: 2273-2280

**Varfalomeev EE, Ashkenazi A** Tumor Necrosis Factor : an apoptosis junkie? *Cell* 2004, 116(4): 491-497

**Vlahakos D, Foster MH, Ucci AA, Barrett KJ, Dutta SK, Madaio MP** Murine monoclonal anti-DNA antibodies penetrate cells, bind to nuclei, and induce glomerular proliferation and proteinuria in vivo. *J Am Soc Nephrol* 1992: 2:1345-1354

**Wahl SM, Costa GL, Corcoran M, Wahl LM, Berger AE.** Transforming growth factor Beta mediates IL-1 dependent induction of IL-1 receptor antagonist. *J Immunol* 1993. 150: 3553-3560

**Walsh LJ, Trinchieri G, Waldorf HA, Whittaker D, Murphy GF.** Human dermal mast cells contain and release TNF- $\alpha$  which induces endothelial leukocyte adhesion molecule. *PNAS* 1991 88: 4220-4

**Weinberg JM, Bottino CJ, Lindholm J, Bucholz R.** Biologic therapy for psoriasis : an update on the tumor necrosis factor inhibitors infliximab , etanercept and adalimumab, and the T-cell targeted therapies efalizumab and alefacept. *J Drugs Dermatol* 2005 4544-4455