



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI FERRARA**  
**FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA**

Dottorato di Ricerca in Farmacologia ed Oncologia Molecolare

**ANALISI DI NUOVI MARCATORI CELLULARI E  
MOLECOLARI PER LA SPONDILITE ANCHILOSANTE**

RELATORE:

Prof. Marcello Govoni

Dottorando:

dott. Matteo Colina

Anno Accademico 2010/2011

# **INDICE**

<b>INTRODUZIONE E CENNI STORICI</b>	<i>pag. 3</i>
<b>CARATTERISTICHE CLINICHE DELLA MALATTIA</b>	<i>pag. 12</i>
<b>LE ENTESI</b>	<i>pag. 21</i>
<b>ASPETTI RADIOLOGICI</b>	<i>pag. 26</i>
<b>MANIFESTAZIONI SISTEMICHE</b>	<i>pag. 33</i>
<i>Coinvolgimento oculare</i>	<i>pag. 34</i>
<i>Coinvolgimento cardiaco e vascolare</i>	<i>pag. 37</i>
<i>Coinvolgimento polmonare</i>	<i>pag. 38</i>
<i>Impatto sul tessuto osseo</i>	<i>pag. 39</i>
<i>Coinvolgimento renale</i>	<i>pag. 39</i>
<i>Coinvolgimento gastro-intestinale</i>	<i>pag. 40</i>
<b>FISIOPATOGENESI DELLA SA</b>	<i>pag. 41</i>
<i>Associazione tra infiammazione ed erosione ossea</i>	<i>pag. 42</i>
<i>Associazione tra infiammazione ed osteoproliferazione</i>	<i>pag. 46</i>
<b>SCOPO</b>	<i>pag. 54</i>

<b>PAZIENTI E METODI</b>	<i>pag. 55</i>
<i>Raccolta dei campioni</i>	<i>pag. 55</i>
<i>Imaging</i>	<i>pag. 55</i>
<i>Separazione delle cellule mononucleate di sangue periferico (PBMCs)</i>	<i>pag. 56</i>
<i>Colture primarie di osteoclasti umani</i>	<i>pag. 57</i>
<i>Estrazione dell'RNA e retrotrascrizione</i>	<i>pag. 58</i>
<i>RT-PCR quantitativa</i>	<i>pag. 59</i>
<i>Test TRAP (fosfatasi acida tartrato-resistente)</i>	<i>pag. 61</i>
<i>Estratto della pianta <i>Emblica officinalis</i></i>	<i>pag. 62</i>
<i>Analisi dell'apoptosi</i>	<i>pag. 63</i>
<i>Analisi statistica</i>	<i>pag. 65</i>
<b>RISULTATI</b>	<i>pag. 66</i>
<i>Caratteristiche dei pazienti e parametri clinici</i>	<i>pag. 66</i>
<i>Valutazione dell'osteoclastogenesi spontanea</i>	<i>pag. 67</i>
<i>Relazione tra attività di malattia e osteoclastogenesi</i>	<i>pag. 70</i>
<i>Valutazione dell'apoptosi dopo trattamento con <i>Emblica officinalis</i></i>	<i>pag. 72</i>
<i>Valutazione del profilo di espressione di geni specifici</i>	<i>pag. 75</i>
<b>DISCUSSIONE</b>	<i>pag. 81</i>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<i>pag. 86</i>

## **INTRODUZIONE E CENNI STORICI**

La Spondilite Anchilosante (SA) rappresenta il prototipo delle spondiloartriti ed è una patologia infiammatoria cronica ad eziologia sconosciuta che interessa principalmente lo scheletro assile, sebbene anche lo scheletro appendicolare possa essere colpito in maniera significativa. Le alterazioni si verificano a carico delle articolazioni sinoviali e cartilaginee ed in corrispondenza delle inserzioni ossee di tendini e legamenti.

Nel 1973, quasi contemporaneamente, l'équipe di Paul Terasaki negli Stati Uniti (1) e quella di Derrick Brewerton in Inghilterra (2) accertarono che un'elevata percentuale di malati di spondilite anchilosante (SA) possedeva un particolare antigene del sistema maggiore di istocompatibilità: l'antigene HLA-B27. L'esistenza di isoantigeni tissutali, da cui dipende, appunto, la compatibilità degli omotrapianti, era una scoperta abbastanza recente: nel 1956 essa era stata dimostrata nel topo (3) e nel 1958 Jean Dausset, cui per questo motivo fu conferito nel 1980 il premio Nobel per la Medicina, l'aveva confermata nell'uomo (4). Queste osservazioni furono ripetute, in una rapidissima successione di indagini, nell'artrite reattiva o sindrome di Reiter (5,6), nell'artrite associata a malattie infiammatorie dell'intestino o enteroartrite (7,8) e nell'artrite psoriasica (9,10).

In base a questi risultati, nel 1974 John Moll e Verna Wright (11) suggerirono che queste malattie, tutte già note come condizioni morbose definite, pur conservando sostanzialmente la loro autonomia

nosografica, erano in qualche modo accomunate da una serie di caratteristiche, fra le quali la costante assenza del fattore reumatoide (da cui la denominazione di poliartriti sieronegative), il frequente interessamento della colonna vertebrale (da cui la denominazione di spondiloartriti), e l'aggregazione familiare crociata (di cui la presenza dell'antigene di istocompatibilità HLA-B27 è appunto il marker genetico). All'inizio gli stessi autori avevano incluso nel raggruppamento anche la malattia di Behçet, che però fu esclusa dal novero alcuni anni dopo per motivi che non è qui possibile discutere.

Negli ultimi anni del XIX secolo tre diversi studiosi descrissero una "nuova" malattia reumatica, caratterizzata da una marcata rigidità della colonna vertebrale (12-14): il tedesco Adolf von Strumpell nel 1884, il russo Vladimir Bechterew nel 1893 ed il francese Pierre Marie nel 1898. La sequenza di queste prime segnalazioni risulta in realtà piuttosto intricata. In ordine cronologico la prima è quella di Strumpell (15), che, tuttavia consiste solo in un breve cenno a due casi della malattia nella prima edizione del suo trattato di Medicina Interna. Nel 1893 Bechterew (16) descrisse in modo più dettagliato cinque casi, sulla cui esatta interpretazione, peraltro, sono poi state formulate molte riserve (12,17). Qualche anno dopo, nel 1897, Bechterew (18) e Strumpell (19) presentarono entrambi un nuovo caso in due articoli pubblicati nello stesso fascicolo di una rivista, ed anche questa volta il caso di Bechterew non sarebbe esente da critiche, mentre, sempre in quell'anno, Marie (20) segnalò, avvicinandolo, forse in modo improprio, a quelli di Bechterew, un caso di non facile inquadramento che, con un evidente

ossimoro, definì “cifosi eredo-traumatica”. L’anno successivo lo stesso Marie (21) pubblicò, comunque, sotto la denominazione di “spondilosi rizomelica”, due casi inequivocabili della nuova malattia, dandone una descrizione clinica magistrale: uno dei due casi, tra l’altro, era stato osservato da Marie fin dal 1886, insieme al suo maestro Charcot. Ancora un anno dopo, nel 1899, Bechterew segnalò altri due casi (22), questa volta certamente analoghi a quelli segnalati da Strumpell e da Marie, mentre André Leri, allievo di Marie, perfezionava la descrizione clinica e riportava un’osservazione autoptica (23).

Una coincidenza curiosa è che sia Bechterew che Marie erano neurologi, ed anche Strumpell, pur essendo direttore della Clinica Medica di Erlangen ed autore di un trattato di Medicina Interna che ebbe più di 30 edizioni e che per alcuni decenni fu una sorta di “Harrison” del tempo, si interessava soprattutto di neurologia. La triplice paternità non sembra aver creato particolari controversie per assicurarsi la primogenitura: in letteratura l’eponimo più frequente è quello di Bechterew, malgrado le critiche che siano state formulate ai suoi contributi iniziali sull’argomento, ma si trovano anche denominazioni con eponimo doppio o triplo. Per un certo tempo era stata suggerita una distinzione tra la forma di Bechterew, ad esordio cervicale e carattere discendente, e la forma di Marie-Strumpell, ad esordio lombare e carattere ascendente, distinzione che non ha alcuna giustificazione, perché nella quasi totalità dei casi la malattia inizia a livello lombo-sacrale, anzi più esattamente alle articolazioni sacro-iliache.

Il motivo della mancata contesa sta forse nel fatto che fin dall'inizio si era imposta una denominazione non eponimica, che chiarisce in modo semplice e corretto le caratteristiche della malattia. Essa è costituita da un sostantivo: spondilosi, poi divenuto spondilite, quando fu chiara la natura infiammatoria della malattia (24), e da un aggettivo, che può essere prognostico: anchilosante od il più brutto anchilopoietica, oppure topografico (ed un po' troppo aulico): rizomelica, perché la malattia, oltre allo scheletro assile, può interessare le spalle e le anche, cioè le articolazioni poste alla radice degli arti. Nel lavoro di Pierre Marie la malattia è già chiamata spondilosi rizomelica (25), e questa pure è la denominazione utilizzata nel primo contributo italiano, dovuto, sul finire dell'800, a Vittorio Ascoli, clinico medico dell'Università di Roma (26). Che la malattia fosse, comunque, "anchilosante" e quindi "invalidante" lo dimostra anche il primo caso descritto in America nel 1857 (evidentemente si tratta di una diagnosi "a posteriori") riportato alla luce di recente da Malcolm Jayson, per conto della Heberden Library della British Society of Rheumatology, dal significativo titolo Leonard Trask: the wonderful invalid (27).

Tuttavia, i tre scopritori putativi della SA non furono affatto i primi ad osservare la malattia: secondo alcune ricerche nella vecchia letteratura le segnalazioni precedenti non sono nemmeno eccezionali (28,29). Un primo accenno risalirebbe addirittura a all'epoca greco-romana: Archigene di Apamea (I secolo d.C.) ed Areteo di Cappadocia (II secolo d.C.) parlano, infatti, di una "estensione" della gotta fino alla colonna vertebrale, che con un po' di fantasia si potrebbe configurare come una

spondilite. È più verosimile che si riferissero alla anchilosante Realdo Colombo, professore di Anatomia a Padova, quindi a Pisa e a Roma nella prima metà del '500 (30), che cita nelle sue opere due scheletri in cui tutte le ossa erano fuse fra loro e Thomas Sydenham, che circa mezzo secolo dopo descrive una malattia articolare (lumbago rheumatica) caratterizzata da dolore notturno e rigidità della regione lombare.

Nello stesso secolo di Sydenham visse il poeta burlesco francese Paul Scarron (la cui vedova, Françoise d'Aubigné, sarebbe poi divenuta la celebre M.me de Maintenon) che soffrì quasi certamente di spondilite anchilosante, in quanto fin da giovane aveva dolori acuti allla schiena, lamentò un'infiemmazione oculare e finì per avere un collo così rigido "da non riuscire a rivolgere lo sguardo in alto" (31).

La prima segnalazione ben documentata della malattia viene spesso attribuita all'irlandese Bernard O'Connor, che nel 1691 descrisse uno scheletro, rinvenuto in un cimitero di Reins, in Francia, nel quale vertebre, coste e bacino erano saldati tra loro: ed è proprio l'anchilosi delle articolazioni costo-vertebrali e sacro-iliache a rendere credibile la diagnosi retrospettiva (32). Nel 1831 un medico di Brighton, in Inghilterra, Philip Lyons, segnalò su *Lancet* il caso di un uomo che fin dall'età di 18 anni aveva presentato dolore e rigidità al rachide e nel quale l'esame autoptico confermò la fusione dei corpi vertebrali (33). Nel XIX secolo, ma prima della descrizione "ufficiale" della malattia, sarebbero stati almeno sette le segnalazioni di casi di probabile spondilite (29): fra questi spiccano quelli riportati da Benjamin Brodie (che, comunque è

stato anche il primo a descrivere quella che poi sarà la sindrome di Reiter) e da Charles Fagge.

Dopo la “scoperta” di Strumpell, Bechterew e Marie, e mentre si accendeva il dibattito sull'inquadramento nosologico della malattia, le sue caratteristiche divennero sempre meglio definite. La netta prevalenza maschile, comunque già segnalata da Pierre Marie, fu confermata nel 1901 (34). L'irite, già segnalata in modo aneddótico da Brodie e dallo stesso Bechterew, fu identificata, come manifestazione caratteristica della malattia, solo nel 1935, ad opera di due oculisti tedeschi, fra i quali Ernst Kraupa (35). Sei casi di insufficienza aortica in malati di spondilite anchilosante furono descritti nell'immediato secondo dopoguerra (36), ma erroneamente attribuiti ad una concomitante febbre reumatica; solo nel 1956, in una meta-analisi dei primi cento casi di insufficienza aortica sottoposti ad impianto di protesi valvolare (37), se ne trovarono ben 5 affetti da spondilite: un numero senz'altro troppo elevato per essere motivato da una coincidenza casuale.

Attualmente la diagnosi, soprattutto in fase precoce di malattia, non può prescindere dalle indagini radiologiche. La scoperta di Wilhelm Conrad Rontgen è del 1895 (38), praticamente coeva di quella della spondilite e già nel 1899 Valentini avrebbe pubblicato i primi radiogrammi di colonne spondilistiche sulla rivista tedesca *Deutsche Medizinische Wochenschrift* (12), anche se le indagini radiologiche si svilupparono poi con una certa lentezza e le acquisizioni più importanti sulle alterazioni radiologiche della spondilite anchilosante avvennero all'inizio degli anni '30 del XX secolo. Infatti, la sacro-ileite, il reperto radiologico più importante ai fini

diagnostici, fu descritta in modo definito dal radiologo tedesco di Aachen Walter Krebs solo nel 1931 (39), anche se sarebbe già identificabile in una radiografia di Eugene Frenkel del 1904 (40), mentre l'aspetto a "canna di bambù" era già evidente in alcuni radiogrammi di Valentini, che, come appena ricordato, risalgono al 1899 (41). L'anno precedente, nel 1930, erano state segnalate le erosioni agli angoli anteriori dei corpi vertebrali, che vanno ancora sotto il nome di segno di Romanus, dal nome del primo autore dell'indagine (42). I reperti propri della fase avanzata, come abbiamo appena segnalato, erano già stati osservati fin dai primordi della radiologia, ma il termine sindesmofita è stato proposto da Jean Athanase Sicard e Jacques Forestier, sempre nel 1931 (43).

Abbiamo già ricordato che in alcuni dei casi più antichi (Realdo Colombo, Bernard O'Connor) la diagnosi si era basata sul riscontro di fusione fra le vertebre. L'interesse più recente per la paleopatologia ha consentito di moltiplicare questi reperti: si va dagli scheletri preistorici dei giacimenti di Baymes-Chaudes (44), di Fontenay Le Marmion (45), dalla mummia dell'egizio Nefermaat, appartenete alla III dinastia (46), a scheletri medievali vichinghi (47), burgundi (48) e sassoni (49), a quelli del centroamerica (50) oppure provenienti da scavi in Israele (51). Il problema è però quello di stabilire fino a che punto la fusione dei corpi vertebrali sia sufficiente per formulare la diagnosi di spondilite anchilosante, invece che di spondiloartrosi e soprattutto di iperostosi scheletrica idiopatica diffusa (*diffuse idiopathic skeletal hyperostosis – DISH*): in alcuni casi, infatti, la diagnosi è stata posta in dubbio, mentre il altri ha invece resistito alle critiche (52). Che comunque si tratti di una

malattia antica quanto l'uomo ce lo indica ancora la paleopatologia nelle sue più recenti acquisizioni: infatti alcuni studiosi hanno pubblicato uno studio che dimostra come almeno tre faraoni della XVIII e XIX dinastia, fra i quali il grande Ramses II, sarebbero stati affetti da spondilite anchilosante (53). Su questa traccia e sull'ipotesi (già suggerita nientemeno che da Sigmund Freud!) che Mosè fosse in realtà figlio del faraone, Thierry Appelboom ed Anthony Russell hanno affermato, pur con qualche dubbio, che l'illustre personaggio biblico avesse ereditato dai progenitori egiziani la genetica delle spondiloartriti, per i numerosi riferimenti presenti nel Testamento a disturbi dell'apparato locomotore e della cute (psoriasi?) di cui avrebbe sofferto (54).

Un caso storico che innescò polemiche è quello che riguarda la famiglia Medici (55,56). Come è noto, si era sempre ritenuto che molti membri di questa famiglia avessero sofferto di gotta, tant'è che il figlio di Cosimo il Vecchio è passato alla storia come Pietro il Gottoso. Nel 1955 alcuni lavori di restauro nella Sacrestia Vecchia della chiesa di San Lorenzo, sede delle tombe Medicee, uno dei più straordinari capolavori di Michelangelo - sia detto per inciso, illustre gottoso (57) - fornirono l'occasione per radiografare gli scheletri di alcuni Medici (Cosimo il Vecchio, Piero il Gottoso, Lorenzo il Magnifico e Giuliano duca di Nemours): con una certa sorpresa le indagini rivelarono che i Medici sarebbero stati affetti da spondilite anchilosante (55). La nuova diagnosi non è stata, però, accettata da tutti ed è stato ipotizzato potersi trattare di una DISH (59,60), affezione che, tra l'altro, può talora associarsi ad una diatesi iperuricemica (61).

Negli anni più recenti, cioè dopo la definizione della malattia, ha sofferto di spondilite anchilosante Karel Capek (1890-1938), scrittore ed autore tetrale ceco (62) e ne soffre anche Mohammad Asim Khan, uno dei maggiori esperti contemporanei di spondiloartriti (63).

## ***CARATTERISTICHE CLINICHE DELLA MALATTIA***

La SA, come detto, è una malattia infiammatoria cronica sistemica che colpisce primariamente lo scheletro assiale, ma anche le articolazioni dell'anca e della spalla e, meno frequentemente, le articolazioni periferiche degli arti, conducendo alla fibrosi ed alla progressiva ossificazione (anchilosi) delle strutture coinvolte. Nosograficamente, la SA viene inclusa tra le spondiloartriti sieronegative, delle quali rappresenta il più frequente e paradigmatico sottotipo (64). I primi criteri classificativi della SA risalgono al 1961 (65), poi rivisti 5 anni dopo (66) (Tabelle 1, 2) ed infine rivisitati a metà degli anni '80 (67) (Tabella 3). Più recentemente, l'Assessment of SpondyloArthritis International Society (ASAS) ha proposto un nuovo set di criteri per le spondiloartriti con interessamento assiale, utile soprattutto per studiare la SA nelle fasi precedenti ai danni anatomici irreversibili a carico delle articolazioni sacro-iliache e delle vertebre (68) (Tabella 4).

La prevalenza della SA nella popolazione generale rispecchia strettamente quella dell'antigene di istocompatibilità HLA-B27, con il quale la malattia appare strettamente associata (90-95%). La prevalenza dell'HLA-B27 nella popolazione generale, comunque, mostra variazioni geografiche considerevoli (Tabella 5). Deve essere, inoltre, considerato che negli ultimi anni l'antigene di istocompatibilità HLA-B27 è stato suddiviso da un punto di vista molecolare in almeno 20 sottotipi differenti, alcuni dei quali sembrano favorire l'insorgenza della SA, altri addirittura avrebbero un'azione protettiva (69,70)

La più alta prevalenza a carico del sesso maschile, suggerita da alcuni Autori, dovrebbe probabilmente essere ridimensionata ed è legata al fatto che nella donna i quadri clinici e radiologici della malattia evolvono più lentamente ed in maniera meno aggressiva (71). L'età media di esordio si attesta intorno ai 26 anni, non sono però infrequenti i casi con esordio giovanile (< 16 anni), mentre sono rari quelli dopo i 45 anni (72). La SA presenta una fortissima aggregazione familiare ed una strettissima associazione con l'antigene di istocompatibilità HLAB-27 (in particolare con i suoi sottotipi B2706 e B2709) ed in minor misura con il B60 (73,74). Appare, quindi, molto verosimile il ruolo di un terreno genetico predisposto sul quale agirebbe una "noxa" ambientale (probabilmente infettiva). Secondo le ipotesi attualmente più accreditate, la malattia sarebbe innescata da agenti peptidici "artritogenici" derivanti dalla proteolisi intracellulare dei batteri. Tali antigeni mostrerebbero un mimetismo molecolare con peptidi di tipo "self" (forse derivanti dalla cartilagine articolare ed enteseale) e, una volta presentati sulla superficie cellulare tramite l'interazione con molecole di istocompatibilità (HLA-B27 o altre), attiverebbero cellule T cross-reattive che a loro volta innescerebbero un'autoreattività delle cellule T citotossiche (75,76). Questa ipotesi "classica" è stata poi seriamente messa in dubbio da 2 studi indipendenti nei quali i linfociti T CD8+ non sono risultati necessari all'insorgenza della SA in ratti transgenici (77,78). Recentemente sono emerse anche altre due ipotesi, per le quali il ruolo dell'antigene di istocompatibilità HLA-B27 non sarebbe più quello "canonico" di

presentazione dell'antigene, ma invece avrebbe funzione di "trigger" dell'immunità innata.

La prima ipotesi prevederebbe che le catene pesanti dell'HLA-B27, libere dalla  $\beta$ 2 microglobulina, si assemblino in omodimeri sulla superficie cellulare e venire poi riconosciuti dal killer immunoglobulin-like receptor KIR3DL2, indipendentemente dal peptide legato (79). I livelli sierici di natural killers e linfociti T che esprimono KIR3DL2 sono aumentati nei pazienti HLA-B27 positivi (80).

La seconda ipotesi prevederebbe che il residuo Cys 67 della tasca B determini un misfolding della catena pesante del HLA-B27 nel reticolo endoplasmatico prima di assemblarsi alla  $\beta$ 2 microglobulina ed al peptide (81,82). L'alterazione della struttura terziaria della proteina determinerebbe un'alterata risposta a numerosi stimoli dell'immunità innata con conseguente iperproduzione di citochine da parte delle cellule infiammatorie (83-85).

Una volta che il processo si è instaurato, un ruolo chiave nel mantenimento dell'infiammazione sembra essere svolto dalle citochine  $TNF\alpha$  ed IL-23 (85).

La maggior parte, anche se non tutte, le alterazioni patologiche scheletriche della SA possono essere spiegate dai cambiamenti che si attuano a carico delle entesi e delle fibrocartilagini articolari.

Le manifestazioni cliniche insorgono solitamente nella tarda adolescenza o nel giovane adulto. Una piccola percentuale di pazienti presenta un esordio antecedente i 16 anni, spesso caratterizzato da attacchi

persistenti o ricorrenti di entesite od oliartriti degli arti inferiori prima che si sviluppino i sintomi ed i segni definiti di interessamento assiale.

Il più precoce, tipico e consistente reperto clinico è una rachialgia di tipo infiammatorio, che rappresenta la prima manifestazione sintomatologica nel 75% dei casi. Si tratta prevalentemente di un dolore in sede lombosacrale ad esordio insidioso, associato a rigidità mattutina ed a miglioramento in seguito all'attività fisica. All'inizio il dolore può essere unilaterale od intermittente, comunque con il passare del tempo diviene generalmente persistente e bilaterale con marcata rigidità mattutina. Il dolore può venire riferito anche nella zona glutea o con irradiazione posteriore alla coscia tipo sciatica (sciatica mozza) e, tipicamente, può alternarsi da un lato all'altro (sciatica basculante). Talora ripetuti episodi di talalgia possono precedere di mesi o anni il coinvolgimento assiale.

Il coinvolgimento del rachide è per solito di tipo "ascendente", colpendo cioè prima i distretti inferiori per poi eventualmente diffondersi verso l'alto (rachide dorsale e cervicale). Occasionalmente, rachialgia e dorsalgia compaiono nelle fasi precoci con episodi ricorrenti, oppure si assiste ad un vero e proprio andamento "discendente", più frequente nel sesso femminile, in cui il rachide lombare è inizialmente risparmiato.

Il dolore e la rigidità lombare sono dovuti, in fase iniziale, alla sacro-ileite ed alla infiammazione dei legamenti posteriori del bacino, alle entesiti vertebrali (strutture ligamentose paravertebrali). In questa fase la limitazione funzionale può essere, almeno in parte, recuperabile e non corrisponde a danni radiologici evidenti. Più tardivamente, la rigidità riconosce come causa principale l'anchilosi ossea vertebrale, secondaria

a processi di neoformazione ossea nella sede di inserzione più esterne dell'annulus fibrosus (sindesmofiti) ed è, a questo punto, irreversibile.

Le inserzioni tendinee e capsulo-ligamentose all'osso, sono frequentemente coinvolte anche in distretti extra-rachidei, specialmente all'esordio di malattia. Le sedi più frequentemente interessate sono l'inserzione del tendine achilleo e della fascia plantare al calcagno, le inserzioni tendinee alle ossa metatarsali, le giunzioni costo-sternali e manubrio-sternali, i processi spinosi, le creste iliache, i grandi trocanteri, la tuberosità ischiatica, la sinfisi pubica ed i tubercoli tibiali. Durante il decorso della malattia le entesiti sono in genere ricorrenti e migranti. Il coinvolgimento delle anche e delle spalle può rappresentare talvolta il sintomo di esordio (più spesso nelle forme giovanili) e si verifica comunque in circa un terzo dei pazienti nel corso della malattia. L'artrite di anca è per solito precoce, bilaterale, insidiosa all'esordio e potenzialmente molto invalidante. Il coinvolgimento delle altre articolazioni periferiche è raro e solitamente si presenta all'esordio di malattia, mono od oligoarticolare, asimmetrico ed a carico delle caviglie e delle ginocchia. L'artrite periferica della SA è abitualmente lieve e transitoria, raramente persistente ed erosiva e tende a risolversi senza deformità articolari nella maggior parte dei pazienti.

Dopo molti anni di malattia (solitamente 20 o più), l'intera colonna diviene progressivamente rigida ed il paziente perde la postura normale per l'appiattimento della spina lombare e lo sviluppo di una cifosi toracica e cervicale. Nei casi estremi, tali alterazioni conducono ad una

posizione flessa che limita il campo visivo (i pazienti “non possono guardare il cielo”).

Il torace anteriore si appiattisce, l'addome diviene protuberante e la respirazione si fa progressivamente diaframmatica. Nelle fasi tardive di malattia è frequente un certo grado di contrattura in flessione dell'articolazione dell'anca che dà luogo ad un caratteristico portamento rigido, con le ginocchia in flessione per mantenere la postura eretta. Progressivamente, la sintomatologia dolorosa infiammatoria e la rigidità mattutina tendono a ridursi mentre permangono le limitazioni funzionali legate all'anchilosi.

**Tabella 1.** Criteri di Roma

Dolore al rachide lombare e rigidità per più di tre mesi che non migliorano con il riposo

Dolore e rigidità della regione toracica

Mobilità limitata del rachide lombare

Limitata espansione toracica

Evidenza o storia di irite

**sono necessari:** la positività delle radiografie (sacro-ileite bilaterale) più uno o più criteri clinici, oppure almeno quattro criteri clinici

**Tabella 2. Criteri di New York**

Presenza o storia di dolore al rachide lombare

Mobilità limitata in flessione anteriore, laterale ed all'estensione

Limitata espansione toracica (2,5 cm)

**sono necessari:** la positività delle radiografie (sacro-ileite bilaterale di terzo o quarto grado) ed uno o più criteri clinici, oppure una sacro-ileite unilaterale di terzo o quarto grado, o bilaterale di secondo grado ed il secondo criterio clinico o con ii criteri clinici uno e tre

**Tabella 3. Criteri di New York modificati****Criteri clinici**

Presenza o storia di dolore al rachide lombare

Mobilità limitata in flessione anteriore, laterale ed all'estensione

Limitata espansione toracica (2,5 cm)

**Criterio radiologico**

sacro-ileite bilaterale grado > 2 o sacro-ileite monolaterale grado 3 - 4

**spondilite anchilosante definita** se: il criterio radiologico è associato con almeno un criterio clinico;

**spondilite anchilosante probabile** se: a) sono presenti i tre criteri clinici, b) è presente il solo criterio radiologico (altre cause di sacro-ileite dovrebbero essere escluse)

**Tabella 4.** Criteri classificativi ASAS per spondilo-artrite assiale in pazienti con dolore al rachide da più di tre mesi ed età di insorgenza < di 45 anni

Sacro-ileite ed una o più caratteristiche cliniche delle spondilo-artriti

HLA-B27 e due o più caratteristiche cliniche delle spondilo-artriti

**Sacro-ileite:** lesioni infiammatorie acute alla RM o lesioni radiologiche dei criteri di New York modificati

**Caratteristiche cliniche delle spondilo-artriti:** lombalgia infiammatoria, artrite periferica, entesite, uveite, dattilite, psoriasi, morbo di Crohn o colite ulcerosa, buona risposta ai FANS, storia familiare di spondilo-artrite o elevata proteina C reattiva.

**Tabella 5:** prevalenza dell'HLA-B27 nelle varie popolazioni

regione	etnia	prevalenza (%)
Papua-Nuova Guinea	Pawaian	52.9
Canada	Indiani Haida	50.0
USA	Eschimesi Yupic	40.0
USA	Indiano Navajo	36.0
Russia	Chukhsas	33.9
Norvegia	Lapponi	26.0
Papua-Nuova Guinea	Karimui	25.9
USA	Eschimesi Inupiat	25.0
USA	Indiani Pima	28.0
Emirati Arabi Uniti	Arabi Yemini	17.0
Svezia	Caucasica	16.6
Norvegia	Caucasica	15.9
Finlandia	Caucasica	14.0-16.0
USA	Indiani Cree	13.9
Africa	Maliani	9.7
Europa	Euro-Caucasica	4.0-13.0
Cina	Cinese	2.0-9.0
-	Araba	3.0
-	Ebrea	3.0
-	Giapponese	< 1.0
Guatemala	-	0.0
Africa	Nera	0.0

## **LE ENTESI**

Come precedentemente detto, la maggior parte delle alterazioni patologiche scheletriche della SA possono essere spiegate dai cambiamenti che si attuano a carico delle entesi. Il termine di entesi osteotendinea è utilizzato per contrassegnare i settori nei quali i fasci di fibre più o meno ordinate dei legamenti intrinseci ed estrinseci, delle strutture miotendinee, delle capsule fibrose articolari, degli anelli fibrosi dei dischi intervertebrali, di aponeurosi, di retinacoli e di fascie muscolari ed interossee, si inseriscono nelle ossa scheletriche o sesamoidi. Nella sua etimologia greca, “entesi” significa, infatti, “punto di unione”: in realtà esse rappresentano delle zone di graduale trasformazione di un tessuto di origine mesenchimale di tipo connettivale fibroso in altro tessuto di origine mesenchimale, quello dello scheletro osseo.

Anche le componenti fibrocartilaginee endoarticolari di forma pseudolegamentaria (es. legamento triangolare del polso), oppure di forma discale o meniscale, sono collegate al rigido scheletro osseo da “entesi osteofibrocartilaginee”.

Le entesi non vanno considerate come dei semplici punti di aggancio allo scheletro rigido di muscoli e fasci fibrosi o di trasformazione delle formazioni connettivali in tessuto osseo. Esse rappresentano, invece, degli organi ad elevata sensibilità, capaci di ricevere e trasmettere informazioni propriocettive fondamentali nella regolazione cibernetica e nel coordinamento funzionale degli atteggiamenti posturali e della motricità corporea. Un'altra importante funzione delle entesi è quella di

comportarsi da segnalatori di allarme, a protezione della integrità delle articolazioni, dei tendini, dei legamenti e delle capsule fibrose articolari quando il movimento si fa troppo ampio o le trazioni troppo potenti. Nelle suddette condizioni scattano meccanismi neurogeni misti, riflessi e volontari, in grado di determinare contratture muscolari che bloccano per tempi più o meno prolungati l'attività di quei gruppi di muscoli che sono responsabili del movimento di quella o di quelle articolazioni. Per tale ragione, gli organi enteseali sono particolarmente ricchi di fibre nervose, di meccanocettori e di nocicettori.

Nelle numerosissime aree enteseali dello scheletro osseo nelle quali si inseriscono queste formazioni, adatte per resistere a potenti forze tensive, la natura ha creato un modello tissutale particolarmente adatto ad opporsi alle trazioni e nel contempo a consentire una graduale transizione dalla struttura istologica fibrosa dei connettivi ordinati, cioè con fibre collagene di tipo I prevalentemente orientate in una sola direzione e quindi tra loro parallele, a quella dell'osso scheletrico. Tale modello si basa su quattro successivi diversi aspetti istologici dei tessuti mesodermici, degradanti l'uno nell'altro, con zone di confine irregolari e compenstrate tra loro, in uno spazio piuttosto limitato, non tale da consentire una reale suddivisione in zone istologiche ben differenziate.

Per descrivere la struttura delle entesi, si può partire dal tessuto cordoniforme del tendine muscolare o del legamento, oppure da quello più o meno laminare delle fasce, delle aponeurosi, dei retinacoli o delle capsule fibrose articolari. A questo livello, tra i fasci compatti di fibre collagene, sono presenti cellule fibroblastiche fusiformi, di forma stellare

nelle sezioni, alcuni macrofagi, fibre elastiche distribuite tra le fibre collagene e una scarsa quantità di sostanza fondamentale, molto viscosa. In vicinanza della sua entesi, le fibre del tendine si fanno in genere più compatte, ma talora, un po' più avanti, le formazioni cordonali si appiattiscono e tendono ad allargarsi a ventaglio, in modo da andare a coprire una più ampia area di superficie ossea. Il cordone del tendine di Achille, ad esempio, in prossimità della sua entesi distale, dopo aver ruotato di parecchi gradi il suo asse longitudinale si apre a ventaglio per distribuire le sue fibre non solo sulla intera superficie posteriore, ma anche quella interna, esterna e plantare del calcagno.

Da questo primo aspetto istologico si passa a quello del secondo strato, della fibrocartilagine non mineralizzata, di spessore variabile: tra i fasci di fibre collagene a tale livello compaiono perciò delle cellule più globose dei fibrociti connettivali, di forma approssimativamente ovoidale, quindi più similcondrocitica; cellule che sono circondate da un sottile spessore di matrice cartilaginea, disposta a strati concentrici.

Il terzo strato enteseale, denominato "zona di Yoshida", è composto da cartilagine fibrosa in via di mineralizzazione. Tra le fibre collagene compaiono in questo strato enteseale cristalli di sali di calcio (idrossiapatite) che vanno a posizionarsi in modo ordinato tra il termine di una fibrilla e l'inizio della successiva.

Infine si giunge, senza soluzione di continuità, al quarto strato, quello del tessuto osseo.

È opportuno ricordare alcuni altri importanti aspetti anatomofunzionali delle entesi:

- nelle aree enteseali l'osso scheletrico non è coperto da periostio e ha una architettura trabecolare leggermente diversa, in quanto deve adattarsi a momenti di trazione e non a forze di carico di tipo gravitativo, in compressione; si sviluppa sovente da speciali nuclei di ossificazione propri delle epifisi;
- l'aspetto e lo spessore dello strato cartilagineo varia molto da un'entesi all'altra, specie in funzione del grado di angolazione esistente tra l'asse longitudinale delle fibre del tendine e la superficie ossea; in alcuni entesi sono presenti solo poche condrociti, in altre lo strato cartilagineo può raggiungere lo spessore di circa un millimetro; il progredire dell'età può modificare l'altezza di tale strato;
- nelle entesi osteotendinee il peritenon si trasforma, senza soluzione di continuità, nel pericondrio prima, nel periostio poi; contiene una ricca rete vascolare, proveniente per circa il 20% dall'osso e per il resto dal tessuto muscolare;
- in vicinanza delle entesi tendinee e legamentarie possono essere presenti altre formazioni anatomiche, come borse sieromucose di scorrimento, cuscinetti adiposi, tessuto fibroso lasso e ossa sesamoidi;
- tutta la superficie delle ossa sesamoidi inserite nella compagine di una struttura tendinea è sede di entesi osteotendinee, per quella parte delle fibre del tendine che si interrompono nell'osso sesamoide

e da questo ripartono, per raggiungere il loro inserimento definitivo, più distale, su un'altra componente dello scheletro;

- le entesi delle capsule fibrose articolari, delle fascie ed aponeurosi, dei retinacoli e dei legamenti hanno la stessa struttura delle inserzioni osteotendinee;
- le entesi sono metabolicamente molto attive.

## ***ASPETTI RADIOLOGICI***

L'interessamento della colonna lombare e delle articolazioni sacro-iliache costituisce un elemento altamente caratterizzante della malattia; successivamente il coinvolgimento articolare si localizza ai segmenti dorsale e cervicale (86). Il quadro clinico comprende rigidità della colonna vertebrale, specialmente lombare, cifosi dorsale, limitazione funzionale cervicale - modesta o grave. Il coinvolgimento delle articolazioni periferiche in genere caratterizzato da una distribuzione asimmetrica. Col sopraggiungere dell'anchilosi, i sintomi dolorosi possono anche ridursi od addirittura scomparire.

Secondo il modello radiologico classico (87), le lesioni iniziali si osservano nelle articolazioni sacro-iliache (88), nelle disco-vertebrali e nelle costo-vertebrali (89). Perifericamente sono coinvolte l'anca e l'articolazione gleno-omeroale; seguono, in ordine decrescente di frequenza, il ginocchio, la mano, il polso ed il piede (86).

Dal punto di vista anatomo-patologico la flogosi sinoviale è più discreta con panno meno esuberante rispetto a quella dell'artrite reumatoide; prevalgono invece la fibroplasia e la metaplasia cartilaginea, cui seguono l'ossificazione e l'anchilosi ossea (86,90). Tali lesioni determinano osteopenia, erosioni ossee e riduzione dello spazio articolare. Nei riguardi dell'artrite reumatoide, l'osteopenia è meno severa; l'osteosclerosi subcondrale è più evidente; sono presenti periostite e reazione ossea periostale; le cisti subcondrali sono meno pronunciate ed estese. Nell'annulus fibrosus delle articolazioni disco-somatiche

vertebrali, la trasformazione condroide, la calcificazione e l'ossificazione del tessuto connettivo conducono alla formazione di sindesmofiti, che si estendono tra una vertebra e l'altra (91). L'entesopatia è una caratteristica predominante delle spondiloartriti sieronegative, nella cui evoluzione la formazione di speroni ossei, generalmente a contorni poco definiti (entesofiti), rappresenta l'evento finale.

Il coinvolgimento simmetrico delle articolazioni nsacro-iliache rappresenta un marker di malattia (92). La sacro-ileite consiste di una condrite infiammatoria e di un'osteite subcondrale che interessano il sacro e l'osso iliaco nei due terzi antero-inferiori dell'articolazione. Il precesso patologico determina distruzione progressiva della cartilagine e, poiché questa è più sottile sul lato iliaco, le erosioni sono più evidenti su questo versante. Esse si presentano con aspetto "punched out", localizzate nell'osso trabecolare, e sono l'espressione dell'attività osteolitica del tessuto di granulazione flogistico (86). Seguono la comparsa di osteopenia a "chiazze", la perdita della definizione dello spazio articolare, la formazione di erosioni superficiali e di sclerosi focale dell'osso subcondrale. La progressione delle erosioni produce un allargamento dello spazio articolare ed una maggiore eburnizzazione dell'osso circostante, specie sul versante iliaco, creandovi una banda irregolare di radio-opacità.

L'evoluzione naturale della condrite e della flogosi dei legamenti conduce all'ossificazione intra-articolare, con formazione di ponti ossei, fino alla fusione totale dello spazio articolare (86). Successivamente in questa zona compare osteopenia. Poiché tali lesioni impiegano anni a formarsi,

l'esame radiologico può inizialmente essere negativo; in questo caso la TC può facilitare il riconoscimento precoce delle erosioni ossee subcondrali e l'eventuale presenza di cisti.

Nel bacino il coinvolgimento flogistico interessa comunemente le sedi di inserzione dei legamenti sacro-tuberoso e sacro-spinoso; l'entesopatia si osserva pure lungo la cresta iliaca, i rami inferiori dell'ischio e del pube, intorno al grande trocantere. Radiologicamente, tali sedi presentano margini sfumati ed irregolari, cui si associano, negli stadi più evoluti, ossificazioni delle entesi e dei tessuti molli adiacenti (93).

A livello della colonna vertebrale, la condrite del disco intervertebrale può svilupparsi in ogni sede, ma predilige i margini esterni dell'annulus fibrosus. Frequente è l'osteite vertebrale subcondrale, radiologicamente visibile come una zona radio-trasparente, circondata da un'area radio-opaca (ostie di Romanus). Poiché la condrite tende, con la guarigione, alla evoluzione in fibrosi, si osserva una calcificazione secondaria dell'annulus, specie negli stadi più esterni, che forma ponti ossei tra un corpo vertebrale e l'altro, visibili radiologicamente come sindesmofiti. L'osteite e la distruzione degli spigoli superiore ed inferiore del corpo vertebrale comportano la scomparsa della normale concavità del profilo anteriore della vertebra, che assume aspetto rettilineo (squaring). Lo sviluppo ulteriore dei sindesmofiti e la loro fusione sono responsabili del quadro finale della colonna detta "a canna di bambù". Sebbene l'osteite e la condrite siano predominanti alla periferia del disco, foci infiammatori possono tuttavia svilupparsi ovunque nell'ambito del disco stesso e

possono erodere i piatti articolari vertebrali, l'arco neurale e le apofisi articolari (86).

Le articolazioni diartrodiali vertebrali e costo-vertebrali possono essere ampiamente e diffusamente interessate, con successiva distruzione e fusione. Radiologicamente, questa condizione è facilmente apprezzabile nella colonna cervicale, dove la fusione ossea conduce ad una apparente perdita dello spazio articolare stesso. A livello dell'articolazione atlo-assiale, analogamente all'artrite reumatoide, possono verificarsi fenomeni di sublussazione. In alcuni casi può presentarsi la combinazione paradossa di un'articolazione atlo-assiale instabile e di una colonna cervicale rigida, per fusione delle articolazioni centrali ed apofisarie.

A carico delle articolazioni manubrio-sternali e della sinfisi pubica si osserva osteite subcondrale, che può condurre alla completa fusione dei capi ossei (sinostosi). Radiologicamente, sono presenti erosioni subcondrali, allargamento dello spazio articolare ed occasionale periostite. Nelle fasi di remissione e/o guarigione, le articolazioni possono apparire allargate, con neoformazione ossea marginale reattiva.

Tra le articolazioni periferiche, l'anca, la spalla ed il ginocchio possono essere colpite da sinovite cronica, istologicamente simile a quella dell'artrite reumatoide, ma, rispetto a questa, meno intensa. Anche radiologicamente il quadro è analogo a quello reumatoide, esiste però una maggiore tendenza alla erosione centrale, per penetrazione del panno dalla cartilagine nello scheletro sottostante, con esuberante proliferazione ossea a livello delle strutture periarticolari. Inoltre,

l'asimmetricità, la mancanza di osteopenia, le erosioni "whiskery" e la periostite marginale sono altri caratteri distintivi della SA rispetto all'artrite reumatoide (86).

Nell'anca, la combinazione della riduzione concentrica dello spazio articolare e dell'osteofitosi è una caratteristica peculiare. Gli osteofiti, all'inizio, si localizzano sul profilo laterale della testa femorale; successivamente si forma un "collare" intorno al collo femorale, in corrispondenza del margine della superficie articolare. Contemporaneamente si assiste alla migrazione assiale, per riduzione concentrica dello spazio articolare, che evolve in "protrusio acetabuli" ed in fusione ossea intra-articolare. Le cisti subcondrali sono frequenti (93).

La spalla è, per frequenza, la seconda articolazione periferica interessata (33%). Le alterazioni, spesso bilaterali, possono comparire isolate e sono del tutto sovrapponibili a quelle riscontrabili nell'artrite reumatoide. La differenziazione è possibile per il minor grado di osteopenia iuxta-articolare, per le erosioni di minori dimensioni, per la maggiore espressività della proliferazione ossea (specie all'inserzione del legamento coraco-claveare). Quando le erosioni sono localizzate in corrispondenza del profilo supero-esterno della testa omerale, si osserva nell'insieme un aspetto cosiddetto "ad ascia".

Le lesioni al ginocchio assomigliano molto a quelle dell'artrite reumatoide, ma sono in genere meno severe e si distinguono per l'interessamento generalmente monolaterale o asimmetrico, la riduzione dello spazio articolare e la tendenza all'anchilosi fibrosa per la formazione di tessuto di granulazione. Altro segno distintivo rispetto

all'artrite reumatoide è la maggiore frequenza della sclerosi ossea subcondrale e della proliferazione periostale in corrispondenza delle entesi.

Il coinvolgimento del piede si verifica nel 15% dei casi delle forme evolute, con distribuzione bilaterale, simmetrica od asimmetrica. Talora, come già ricordato, il quadro clinico dell'affezione può essere aperto da una talalgia, anche senza evidenza radiologica. Le articolazioni metatarso-falangee sono predilette, con rigonfiamento dei tessuti molli, riduzione dello spazio articolare, erosioni sul lato mediale con adiacente neoformazione ossea, periostite in corrispondenza della diafisi dei metatarsi e delle falangi. L'anchilosi ossea è tardiva. La sublussazione metatarso-falangea è meno grave e frequente rispetto a quella dell'artrite reumatoide. Nel calcagno, le alterazioni si osservano nelle stesse sedi dell'artrite reumatoide, ma sono più superficiali e di solito si associano a neoformazione ossea reattiva. Sulla superficie plantare ed all'inserzione dell'aponevrosi medesima si formano speroni ossei mal definiti. Frequenti sono la borsite retrocalcaneare, l'ispessimento del tendine di Achille e l'erosione calcaneare posteriore.

Poco frequente risulta l'interessamento della mano e del polso, in genere asimmetrico. Le lesioni sono costituite da tumefazione dei tessuti molli periarticolari, modesta osteopenia iuxta-articolare, riduzione dello spazio articolare ed erosioni. Queste ultime risultano meno evidenti rispetto all'artrite reumatoide. Tutte le articolazioni della mano e del polso possono essere coinvolte, compreso il compartimento articolare in corrispondenza dello stiloide ulnare.

Il coinvolgimento dell'articolazione temporo-mandibolare si verifica con un'incidenza variabile dal 4% al 32% (94). L'esame radiologico dimostra un interessamento, il più delle volte, bilaterale. Le lesioni, relativamente simmetriche, sono rappresentate da: - riduzione dello spazio articolare, generalmente omogeneo, cioè esteso a tutta la cavità articolare; - erosioni, più frequentemente localizzate sulla superficie interna del condilo; - becchi ed espostosi, particolarmente esuberanti lungo il margine anteriore del condilo, morfologicamente simili a quelli osservati in corso di artrosi; - sclerosi ossea nelle regioni temporale e/o temporo-mandibolare, con possibile aspetto a "chiazze" in corrispondenza delle erosioni.

## **MANIFESTAZIONI SISTEMICHE**

Nelle fasi precoci di malattia possono essere presenti modici sintomi costituzionali come anoressia, perdita di peso, malessere generale, comunque più frequenti nelle forme giovanili. In alcuni soggetti l'astenia rappresenta un sintomo dominante oltre al dolore ed alla rigidità articolare, potendo essere presente nel 50% dei casi (95).

La SA si accompagna ad un aumento della mortalità rispetto alla popolazione generale, con un rischio relativo di 1,5 (96). Questa mortalità si associa alla presenza di artrite periferica all'esordio della malattia, ad un età d'esordio elevata ed all'importanza della sindrome infiammatoria biologica di accompagnamento. Le cause del decesso sono principalmente rappresentate, oltre all'amiloidosi renale associata ad un ipergammaglobulinemia (97), ad un aumento della morbilità cardiovascolare (98).

Non si è verificato un aumento globale del rischio di tumore solido, eccetto il cancro renale (RR: 5,9) (99).

D'altra parte, un lavoro recente retrospettivo sulla base dei dati dei medici di medicina generale inglesi trova un rischio relativo di linfoma (Hodgkin e non Hodgkin) di 2,8 per la SA, vicino a quello della poliartrite reumatoide (3,0). Il rischio di linfoma è significativamente associato al sesso maschile e all'età avanzata (100).

### ***Coinvolgimento oculare***

La principale manifestazione oftalmica associata alle spondiloartriti è l'uveite. Si tratta di un'uveite anteriore acuta che spesso complica l'evoluzione di una SA definita; il rischio che si verifichi una uveite aumenta con la durata della malattia. Meno spesso, l'uveite può rappresentare la manifestazione di esordio di una SA, fino ad allora passata inosservata per la pochezza della sintomatologia. Infine, può rimanere isolata anche per un lungo periodo di tempo.

In un gruppo di pazienti affetti da uveite anteriore associata all'antigene HLA-B27, la diagnosi di spondiloartropatia è stata fatta nel 78% dei casi, e nei due terzi dei casi in occasione dell'episodio infiammatorio oculare (101).

La presenza di un'uveite anteriore correla con l'antigene di istocompatibilità HLA-B27; inoltre, uno studio genetico su sequenze microsatellite, realizzato in fratelli affetti da uveite anteriore acuta, con o senza spondiloartropatie, ha permesso d'identificare sul braccio corto del cromosoma 9 un locus che predispone particolarmente alle uveiti (102).

Le uveiti anteriori acute delle spondiloartropatie e quelle che sono associate a HLA-B27 rappresentano le forme d'uveite più frequenti (40-70% delle cause d'uveiti anteriori secondo gli studi) e hanno caratteristiche semeiologiche particolari. Si tratta di uveiti acute, ricorrenti e sempre sintomatiche. Così, la ricerca dell'antigene HLA-B27 dovrebbe essere sistematica in oculistica quando si verifica un'uveite con tali caratteristiche fenotipiche, mentre, ogni screening sistematico nel corso della spondiloartropatia è inutile, in assenza di sintomi clinici di uveite.

In corso di SA, l'uveite anteriore non si complica abitualmente con un'interessamento flogistico della camera posteriore dell'occhio. Tuttavia, un'infiammazione oculare anteriore severa oppure ripetuta si può propagare per contiguità sotto forma d'uveite intermedia (vitrite, periflebite) ed evolvere verso un edema maculare cistoide o una papillite. La malattia colpisce abitualmente in maniera unilaterale. La sintomatologia risulta variabile e caratterizzata da rossore oculare, dolori spesso intensi, fotofobia e riduzione dell'acuità visiva da moderata a severa, caratteristica che la differenzia da una congiuntivite. Solitamente, l'uveite guarisce in 1 o 2 mesi, tuttavia le recidive sono frequenti. Può colpire tutte e due gli occhi (101). L'attacco bilaterale simultaneo è possibile, ma raro.

Due parametri permettono di quantificare l'intensità dell'infiammazione: il fenomeno di Tyndall, che corrisponde alla presenza di cellule nella camera anteriore dell'occhio, ed il flare, che corrisponde allo stravasamento di proteine nell'umor acqueo. La reazione infiammatoria dell'uveite nelle spondiloartropatie è abitualmente severa, con una forte reazione fibrinosa, che si traduce in un flare proteico proporzionalmente più importante che il Tyndall cellulare.

L'intensità di questa infiammazione può condurre alla formazione d'un ipopion, tanto che tra le eziologie non infettive dell'ipopion, l'uveite HLA-B27 risulta la più frequente. Nel corso dell'infiammazione oculare acuta, la pressione intra-oculare è spesso bassa nell'occhio colpito, a causa della diminuzione di produzione dell'umor acqueo da parte del corpo ciliare.

Più raramente, sono descritte anche delle uveiti bilaterali, insidiose, croniche che possono colpire il segmento posteriore, soprattutto in caso di malattie infiammatorie intestinali, di psoriasi, o di sindromi di Fiessinger-Leroy (97,103-105).

La diagnosi differenziale principale dell'uveite anteriore acuta in corso di spondiloartropatie è l'uveite anteriore della malattia di Beçhet, che solitamente si presenta spesso sottoforma di una panuveite con attacco alla retina severo, a tipo di vascularite occlusiva, ma che nel 10% dei casi si mantiene come tale.

L'uveite anteriore acuta in corso di spondiloartropatie ha una prognosi generalmente favorevole, in assenza di ritardo terapeutico. La più frequente delle sue complicanze è rappresentata dalla formazione di sinechie tra iride e capsula anteriore del cristallino, che può essere responsabile di un glaucoma secondario.

L'insorgenza di una cataratta può essere promossa da un'infiammazione oculare, dalle sinechie irido-cristalline, e dai trattamenti corticosteroidi topici e/o sistemici. Quando si renda necessario, il trattamento chirurgico della cataratta deve essere realizzato solo a distanza da una fase di acuzie flogistica.

La complicanza più severa è l'edema maculare cistoide perchè in grado di compromettere il visus. Si tratta di un ispessimento maculare conseguente alla flogosi ripetuta del segmento anteriore. La sua frequenza è stimata attorno al 10% dei casi (101).

Il trattamento della uveite anteriore acuta crisi consiste nell'installazione di un collirio steroideo (desametasone); l'associazione di un collirio

midriatico permette di ridurre la formazione di sinechie irido-cristalline e di esercitare un'azione antalgica aumentando lo spasmo ciliare.

Nelle forme molto severe, specialmente quando l'infiammazione colpisce il segmento posteriore dell'occhio, sono indicate le iniezioni peri-oculari di corticosteroidi. La necessità di ricorrere ad un trattamento corticosteroidico o agli immunosoppressori per via sistemica rimane eccezionale.

La frequenza delle ricadute sembra diminuire spontaneamente con l'evoluzione della malattia, tuttavia se queste sono frequenti (più di 4 episodi all'anno), intestinale concomitante, l'utilizzo della sulfasalazina o degli anti-TNF $\alpha$  può essere preso in considerazione.

### ***Coinvolgimento cardiaco e vascolare***

Le manifestazioni cardiovascolari sono più frequenti nei soggetti affetti da SA rispetto ai soggetti sani. Esse interessano principalmente la radice dell'aorta e della valvola aortica, il tessuto di conduzione sottostante, il miocardio e, molto più raramente, il pericardio.

L'infiammazione che colpisce la parte prossimale dell'aorta ascendente (*aortite*), presente nel 2% dei pazienti affetti da SA determina solitamente dilatazione dell'aorta e malfunzionamento valvolare. Questa frequenza sembra incrementare con l'aumentare dell'età di malattia.

L'aortite si limita abitualmente ai primi centimetri dell'aorta ascendente. Le anomalie istologiche comportano una distruzione focale delle strutture muscolari ed elastiche della media, invasa da un infiltrato infiammatorio

linfoplasmocitario, una proliferazione dell'intima ed un ispessimento dell'avventizia (106).

Le modificazioni valvolari aortiche consistono in una dilatazione dell'anello, un ispessimento fibrotico ed una ritrazione delle cuspidi, senza stenosi. L'ispessimento fibrotico si può estendere alla regione sotto-aortica. L'ecografia trans-esofagea rileva delle anomalie della radice dell'aorta e delle valvole aortica e mitrale nel 50% dei pazienti affetti da SA (107). L'evoluzione è di solito progressiva.

Come per le uveiti, l'insufficienza aortica sembra più da correlarsi all'antigene di istocompatibilità HLA-B27 che alla effettiva concomitanza di una SA (108).

I disordini della conduzione sono le anomalie cardiache le più frequenti e colpiscono fino al 30% dei pazienti (106).

Una vera e propria pericardite si verifica in meno dell' 1% dei pazienti ed è stata descritta principalmente nel contesto di una sindrome di Fiessinger-Leroy-Reiter.

### ***Coinvolgimento polmonare***

La manifestazione più frequente della SA sull'apparato respiratorio è una sindrome restrittiva dovuta al coinvolgimento delle strutture ossee della gabbia toracica. Diversi studi hanno messo in evidenza una possibile manifestazione a livello del tessuto polmonare stesso, il cui aspetto più completo ed evoluto è rappresentato dalla cosiddetta "malattia fibrobollosa dei polmoni", presente in circa l'1.3% dei casi (109).

### ***Impatto sul tessuto osseo***

L'osteoporosi si verifica praticamente sempre in corso di SA. La perdita di densità ossea osservata nella SA può essere considerata come una manifestazione sistemica della malattia, correlata all'infiammazione. Gli studi di prevalenza delle fratture vertebrali in corso di SA riportano valori compresi tra il 10 ed il 18%, con un rischio relativo di 7,6 (110,111). Le fratture vertebrali nella spondiloartrite anchilosante si localizzano più spesso a livello dorsale.

### ***Coinvolgimento renale***

La comparsa delle manifestazioni renali nel corso dell'evoluzione delle spondiloartropatie è rara. Una complicanza renale nel corso delle spondiloartropatie che durano da diversi anni deve fare discutere un problema iatrogeno secondario all'assunzione di FANS.

Vilar et al. nel 1997 hanno studiato la funzione glomerulare e tubulare in 40 pazienti affetti da SA, con un età media di malattia di 12 anni, escludendo i fattori confondenti come il diabete, la gotta, le infezioni urinarie, la litiasi, e l'amiloidosi. Delle anomalie renali sono stati osservate nel 35% dei casi: microematuria nel 22,5%, micro-albiminuria nel 10,3%; riduzione della clearance della creatinina nel 10,5% (112).

Strobel et Frischka hanno condotto nel 1998 una revisione sistematica della letteratura dei casi documentati di manifestazioni renali in corso di spondiloartriti (113). Nel 62% dei casi l'interessamento renale in corso di SA è dovuto all'amiloidosi secondaria, la quale si rende responsabile di oltre la metà dei decessi di origine renale.

La presenza di manifestazioni articolari periferiche ed una ipergammaglobulinemia sembrano rappresentare dei fattori di rischio.

### ***Coinvolgimento gastro-intestinale***

Le principali manifestazioni digestive associate alle spondiloartropatie sono le malattie infiammatorie croniche dell'intestino (MICI). Il legame tra le MICI e le spondiloartropatie è un legame ampiamente noto anche se rimane non del tutto spiegato.

Un'artropatia infiammatoria cronica rappresenta la principale manifestazione extra-intestinale delle MICI, portando alla diagnosi di spondiloartropatia nei 10-30% dei pazienti (114). Possono essere presenti artriti periferiche isolate, manifestazioni flogistiche dello scheletro assile oppure di una combinazione delle due. Di converso, una diagnosi di MICI viene formulata in circa il 5% dei pazienti colpiti da spondiloartrite.

## ***FISIOPATOGENESI DELLA SA***

I principali momenti patogenetici della SA sono i seguenti:

- Infiammazione,
- Erosione ossea,
- Formazione di sindesmofiti.

Questi processi interessano, come già detto, le entesi. A conferma del processo infiammatorio, utilizzando campioni istologici provenienti dall'anca e dalle articolazioni sacro-iliache di soggetti affetti da SA, è stato possibile studiare il tipo di popolazione cellulare che risiede nella zona. A questo proposito sono stati rinvenuti infiltrati con presenza di linfociti T e B, macrofagi ed osteoclasti derivati da midollo osseo e cellule coinvolte nella neoangiogenesi (115-117).

L'ipotesi più accreditata riguardante il processo infiammatorio propone che questo sia scatenato da una risposta autoimmune verso le strutture cartilaginee, come il collagene di tipo II o i proteoglicani (118-122). Uno studio in modelli murini immunizzati con proteoglicani, infatti, ha dimostrato l'invasione di cellule mononucleate nelle strutture cartilaginee di articolazioni sacro-iliache e nel disco intervertebrale, con conseguente sovvertimento anatomico ed anchilosi (123). È stata inoltre evidenziata una risposta sia dei linfociti CD4+ (124) che CD8+ (125) nei confronti dell'aggrecano e di peptidi derivati dal collagene nel sangue periferico e nei campioni di liquido sinoviale in pazienti con SA (126).

Mentre per l'artrite reumatoide, altra malattia infiammatoria articolare cronica, è ormai stabilita l'associazione tra infiammazione danno

strutturale, per la SA questo tipo di connessione non è ancora ben definita. In tal senso, la RM ha dato un grande contributo per capire meglio la patogenesi della malattia, in quanto essa è in grado di rilevare la flogosi midollare vertebrale e nelle articolazioni sacro-iliache, nonché l'erosione ossea, in fasi di malattia estremamente precoci. (127).

### ***Associazione tra infiammazione ed erosione ossea***

Utilizzando la RM, è stato possibile dimostrare come spesso infiammazione e degradazione ossea si presentino simultaneamente nella stessa zona, il che fa pensare che i due processi siano connessi. Anche utilizzando l'ultrasonografia per visualizzare l'erosione dell'osso a livello delle entesi e nel tendine di Achille, è stata riscontrata questa associazione (128).

Per capire meglio la patogenesi della SA e come i processi infiammatori ed erosivi potrebbero essere collegati, sono stati analizzati dei campioni chirurgici di entesi da pazienti con AS ed è stata riscontrata un'elevata espressione di catepsina K, una proteina collagenolitica, in cellule mono e multinucleate che invadono la superficie dell'osso ed il disco intervertebrale. Inoltre, un altro possibile fattore di distruzione ossea identificato nei campioni è la metalloproteinasi di matrice, classe delle collagenasi, MMP1 (129). Poiché questi enzimi sono specifici, si può ipotizzare che l'attività erosiva all'interno dell'osso sia mediata dall'azione degli osteoclasti. Questo accade soprattutto in un'altra patologia reumatologica: l'artrite reumatoide.

Nell'artrite reumatoide la formazione di osteoclasti a livello dei siti infiammati è essenziale per il processo erosivo e vi è una chiara dimostrazione di come il delicato bilancio tra riassorbimento e formazione ossea sia disturbato, più "spostato" verso il riassorbimento (130). La conseguenza di questo squilibrio causa un eccessivo riassorbimento osseo con distruzione delle articolazioni ed aumento del rischio di fratture (131).

Fisiologicamente, all'interno dell'osso, osteoclasti ed osteoblasti sono in equilibrio tra di loro, come anche le loro attività. L'equilibrio tra i due processi di riassorbimento e formazione di osso è alla base dell'omeostasi del tessuto.

Per quanto riguarda il processo di riassorbimento, questo è unicamente attuato dagli osteoclasti. Gli osteoclasti sono cellule multinucleate, originano da precursori mononucleati ematopoietici, che sotto l'influenza di specifici segnali si differenziano in osteoclasti maturi. L'osteoclastogenesi è un processo che richiede un adeguato microambiente in cui tutti i segnali risultano essenziali per la corretta maturazione delle cellule. I segnali importanti per il processo di differenziamento e maturazione di queste cellule sono l'M-CSF (fattore stimolante le colonie di macrofagi) e ranKL (attivatore del recettore del ligando nucleare fattore-kB) espressi da cellule mesenchimali precursori di osteoblasti, il che sta a sottolineare quanto i due processi siano collegati. Durante il processo di maturazione le cellule progenitrici si fondono tra loro dando vita a cellule multinucleate giganti che

diventeranno, in seguito all'acquisizione di markers specifici come la fosfatasi acida tartrato-resistente (TRAP), osteoclasti maturi (132,133).

Questo è quello che accade in condizioni normali. Nel corso di un processo flogistico che interessa il tessuto osseo, si può riscontrare un aumento della popolazione di osteoclasti ed inibizione della formazione di nuovo osso. Questo fa sì che il danno strutturale provocato dagli osteoclasti non possa in alcun modo essere riparato dagli osteoblasti in quanto essi sono inibiti nel loro processo di maturazione (134).

Durante il processo infiammatorio, le cellule coinvolte iniziano a produrre e secernere numerosi tipi di citochine che regolano e governano le varie fasi della flogosi. È stato dimostrato come molti tipi di queste citochine possano in modo diretto o indiretto incrementare l'osteoclastogenesi. In particolare, le citochine IL-1, IL-6, IL-17 e soprattutto il  $TNF\alpha$  inducono e potenziano l'espressione di RANKL, non solo nei precursori degli osteoblasti, ma anche in linfociti T attivati (135-138).

Studiando le cellule derivate dalle articolazioni sacro-iliache di pazienti affetti da SA, è stata riscontrata un'elevata espressione di  $TNF\alpha$  (139). Il  $TNF\alpha$  (fattore di necrosi tumorale  $\alpha$ ) è una delle principali citochine che governano i processi infiammatori; è stato riscontrato che tale citochina è capace di promuovere l'osteoclastogenesi, inducendo l'espressione di RANKL. Ancor più interessante è il fatto che abbia un importante ruolo anche nel processo di regolazione della formazione di osso, attivando DKK-1, il quale è il soppressore endogeno della via di trasduzione del segnale Wnt-dipendente, la quale porta al differenziamento in senso osteoblastico di cellule progenitrici (140).

Delle altre citochine un ruolo molto importante è quello svolto dall'IL-17. Questa è una citochina prodotta da una particolare sottopopolazione di linfociti T attivati, i linfociti  $T_H17$ . La citochina è nota per attività fortemente pro-infiammatoria e per la sua attività distruttiva inducendo la sintesi di enzimi che degradano la matrice, come le metalloproteinasi di matrice (141). Pare che l'IL-17 sia implicata anche nel processo di osteoclastogenesi, incrementando l'espressione di RANKL in fibroblasti sinoviali; questo è il maggior punto di connessione tra l'attivazione delle cellule T e l'erosione ossea infiammatoria (142).

Ritornando al  $TNF\alpha$ , il suo coinvolgimento nell'infiammazione e in tutti e due i processi di riassorbimento e formazione di osso, fanno della citochina un importante bersaglio terapeutico nelle patologie infiammatorie croniche caratterizzate da degradazione ossea. In effetti l'utilizzo degli antagonisti del  $TNF\alpha$  nell'artrite reumatoide previene l'erosione andando a bloccare l'infiammazione (143). Questo studio ha, quindi, dimostrato come in questa malattia infiammazione ed erosione siano processi strettamente collegati.

Nella SA, invece la terapia basata sul blocco del  $TNF\alpha$  agisce sicuramente controllando e diminuendo il processo flogistico, ma senza controllare e quindi diminuire il processo di degradazione ossea alle entesi (144-146).

Questi studi conducono quindi all'ipotesi che nella SA il processo di erosione ossea non sia completamente collegato all'infiammazione e che il pattern di degradazione ossea causata dall'attività osteoclastica sia diverso da quello che avviene nell'artrite reumatoide (147).

### ***Associazione tra infiammazione ed osteoproliferazione***

Una caratteristica importante della SA è rappresentata dall'incontrollata crescita di osso che può essere considerata come il vero danno strutturale della malattia, in grado di arrecare al paziente la maggiore disabilità. La crescita di osso colpisce soprattutto la colonna vertebrale con la formazione dei sindesmofiti. Nonostante i prerequisiti richiesti per la neoformazione ossea non siano del tutto conosciuti, è stato ipotizzato che una componente meccanica e/o infiammatoria potrebbe innescare questo processo.

Nel caso della componente meccanica, il fatto che queste lesioni si ritrovino frequentemente nelle entesi può indicare che l'osteoproliferazione si verifichi in risposta ad uno stress meccanico. Nell'altra ipotesi, invece, si può considerare la neoformazione di osso come processo di riparazione a seguito dell'infiammazione, supportata dal fatto che numerosi sindesmofiti sono stati trovati in siti in cui vi era, o era stato, un processo flogistico (148).

Fisiologicamente, vi sono due processi che portano alla formazione di osso durante l'embriogenesi: l'ossificazione endocondrale e l'ossificazione intramembranosa.

Nell'ossificazione intramembranosa, nel contesto di un tessuto connettivo mesenchimale riccamente vascolarizzato, le cellule mesenchimali si differenziano direttamente in osteoblasti. Questi iniziano a produrre matrice ossea e a deporre la componente minerale dell'osso, che a contatto con gli osteoblasti fanno sì che essi stessi si differenzino in osteociti. Mano a mano che questo processo continua si ha la

formazione di osso. Il processo di ossificazione membranosa avviene nella formazione delle ossa piatte.

Nel processo di formazione ossea endocondrale, le cellule mesenchimali differenziano in condrociti prima di formare la matrice ossea. Questo tipo di ossificazione avviene mediante sostituzione con tessuto osseo di un abbozzo cartilagineo preformato. Durante l'embriogenesi, ad un certo punto le cellule costituenti dell'abbozzo, i condrociti, si ipertrofizzano degenerano ed iniziano a morire; contemporaneamente la parte centrale dell'abbozzo si vascolarizza e questo porta le cellule condrogeniche a differenziarsi in cellule osteoprogenitrici. Gli osteoblasti che cominciano a formarsi iniziano a secernere matrice ossea che nel corso del processo sostituirà tutta la cartilagine (149).

Di questi due processi è stato ipotizzato che almeno quello endocondrale ricorra nella SA. (150).

L'ossificazione endocondrale è governata da due principali pathways molecolari, collegati fra loro e mediati da: BMPs (bone morphogenic proteins, proteine morfogenetiche dell'osso) nella fase iniziale del processo e Wnt (famiglia di glicoproteine wingless) nelle fasi successive. Le BMPs sono dei fattori di crescita, citochine appartenenti alla superfamiglia dei fattori di crescita trasformanti  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) che hanno un'ampia serie di effetti come la regolazione di proliferazione, differenziazione, motilità e morte su diversi tipi cellulari (151). Il pathway canonico prevede che le BMPs agiscano come dimero e si leghino ad un complesso recettoriale composto dai recettori di tipo I e II. Il legame provoca l'eterodimerizzazione dei recettori, con il tipo II che fosforila il

tipo I. I recettori, a questo punto attivi e dotati di attività serin-treonin chinasi innescano una cascata di fosforilazione che coinvolge alcuni membri della famiglia di Smad (1/5/8). Queste proteine, una volta fosforilate, si associano con un'altra proteina Smad, la Smad-4. Il complesso ora è in grado di traslocare nel nucleo e regolare positivamente o negativamente la trascrizione di geni specifici (152).

In questa via di trasduzione del segnale molti meccanismi regolatori sono coinvolti (antagonismi intracellulari o extracellulari, interazioni con altre vie, differenti interazioni ligando-recettore), aumentandone così la complessità (151). Tra questi, i più conosciuti sono l'inibitore endogeno extracellulare Noggin, che viene secreto dai condrociti e la sclerostina, proteina specifica degli osteociti, codificata da SOST (153,154).

Una riattivazione di questa via embrionale che porta alla formazione di osso è stata proposta come parte essenziale durante i processi di riparazione ed omeostasi sia negli individui sani che nei pazienti affetti da patologie a carico dell'osso (155,156). Infatti, può essere ipotizzato che un'inopportuna attivazione di questa via del segnale promuova lo sviluppo di malattia caratterizzate da osteoproliferazione.

Utilizzando un modello di topo che sviluppa anchilosi dell'articolazione della zampa posteriore attraverso il processo endocondrale, è stato possibile studiare l'attività delle BMPs. È stato riportato che differenti tipi di BMPs sono coinvolti nelle varie fasi del processo. In particolare, la BMP-2 è associata ai primi stadi della condrogenesi, mentre BMP-7 e BMP-6 sembrano attive in fasi successive (pre- e ipertrofia dei condrociti) (157).

Oltre allo studio per identificare i vari tipi specifici di BMPs ed inibitori che agiscono nel processo patologico, l'identificazione di fattori che invece portano all'attivazione della via del segnale mediata dalle BMPs, è di fondamentale importanza soprattutto per trovare una potenziale correlazione tra infiammazione e formazione ossea (157). Alcuni studi hanno dimostrato che alcune BMPs, tra cui anche BMP-2 e BMP-6, risultano up-regolate da citochine pro-infiammatorie, il che evidenzia un eventuale collegamento tra infiammazione ed osteoproliferazione (158-160).

La famiglia delle glicoproteine wingless controlla le ultime fasi del processo endocondrale che porta alla formazione di osso. Nella via di trasduzione del segnale, le proteine Wnt si legano ad un complesso recettoriale formato da Lrp5, Lrp6 ed uno dei componenti della famiglia delle proteine Frizzled. Con la conseguente attivazione della proteina intracellulare Dishevelled e l'uso della proteina Axin, si ha la fosforilazione ed inattivazione dell'enzima glicogeno-sintasi-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ). Quando le Wnt non legano il recettore e quindi la via del segnale è inattiva, l'enzima GSK-3 $\beta$  risulta attivo ed a sua volta fosforila il substrato: la  $\beta$ -catenina, indirizzandola verso l'ubiquitinazione e degradazione. Quando il recettore è attivo, la  $\beta$ -catenina è libera di trans-migrare nel nucleo dove regola la trascrizione di numerosi geni andandosi a complessare con uno dei membri della famiglia dei fattori di trascrizione del TCF/Lef (fattore delle cellule T/fattore di elongazione linfoide). Alcuni di questi geni sono proprio quelli implicati nel differenziamento osseo in senso osteoblastico. Il segnale del Wnt viene addirittura considerato come il "master

regulator of bone remodelling” (161). Sono molte le molecole che interferiscono con l’attività di questa via del segnale, alcune extracellulari che interagiscono quindi con i recettori Lrp-5 o Lrp-6 o i recettori Frizzled. Tra questi antagonisti spicca il ruolo di DKK-1 e di sclerostina (162,163). Per capire meglio le dinamiche alla base di questi processi, per capire come essi siano implicati fra loro ed eventualmente con il processo infiammatorio, sono stati condotti numerosi studi. Nonostante ciò, le conoscenze al riguardo sono ancora molto scarse.

Anche in questo caso un possibile anello di congiunzione tra infiammazione e neoformazione ossea potrebbe essere il  $TNF\alpha$ . Il  $TNF\alpha$  è la più importante citochina che regola la flogosi ed è stato dimostrato che non solo promuove la formazione e l’attivazione degli osteoclasti e quindi il riassorbimento osseo, ma, contemporaneamente, inibisce l’osteoproliferazione andando ad interagire con il Wnt pathway (164).

Il  $TNF\alpha$  potrebbe trovare un ruolo anche in questo processo in quanto è stato dimostrato che induce l’attivazione del DKK-1 (Dickkopf-related protein-1), il principale antagonista della via del segnale di Wnt (140). Il fatto che il  $TNF\alpha$  attivi DKK-1 induce a pensare che una sua eventuale inibizione porti all’attivazione della via di Wnt, e quindi all’osteoproliferazione.

Studi condotti su modelli animali hanno, invece, dimostrato che bloccando l’azione del  $TNF\alpha$ , a livello articolare non si verificano osteoproliferazione ed anchilosi, il che starebbe a significare che il blocco del  $TNF\alpha$ , pur potendo intervenire nel processo di neoformazione ossea, non determina l’attivazione del Wnt pathway. Solamente

bloccando l'effetto del DKK-1 si può osservare una progressiva proliferazione di osteoblasti con conseguente anchilosi della zona colpita (165). Inoltre, sorprendentemente, il blocco del DKK-1 ha mostrato anche una riduzione dell'erosione ossea e degli osteoclasti sostenendo l'ipotesi che il segnale mediato da Wnt sia al centro di entrambi i processi, proliferativo e distruttivo (140).

Per quanto riguarda i livelli sierici di DKK-1, uno studio ha messo a confronto i valori di individui affetti da SA ed artrite reumatoide rispetto a soggetti sani. Da questa analisi è emerso come i livelli sierici di DKK-1 nei pazienti con SA erano più bassi rispetto ai soggetti affetti da artrite reumatoide ed ai soggetti sani, deducendo che la sua diminuzione potrebbe essere un fattore centrale nella crescita di nuovi sindesmofiti. Infine, sono stati messi a confronto i livelli sierici di DKK-1, a seguito del trattamento con farmaci antagonisti del  $TNF\alpha$  in individui affetti da SA e AR. In questo caso i livelli di DKK-1 sono significativamente diminuiti solo nei pazienti con AR. Questo significa che il  $TNF\alpha$  è la citochina protagonista della AR e che il processo di infiammazione è strettamente collegato al danno strutturale anatomico. Diverso è, invece, il caso degli spondilitici; infatti il livello di DKK-1 nel siero di questi individui rimane alto nonostante la terapia bloccante il  $TNF\alpha$ , suggerendo che esso non è probabilmente coinvolto in prima linea nella regolazione della proliferazione ossea (166).

Anche i livelli di espressione di un altro inibitore dell'osteoproliferazione, la sclerostina, sono più bassi negli individui affetti da SA rispetto ai soggetti sani (167). La sclerostina è una proteina facente parte della

famiglia delle glicoproteine DAN (168). La sua funzione inibitrice è stata associata alla via del segnale mediato dalle BMPs, ma sembra essere differente rispetto ai classici antagonismi che avvengono nel pathway mediato da BMPs (169).

La sclerostina, infatti, esplica un'azione più simile a DKK-1 che ad altri antagonisti di BMPs; si pensa che come DKK-1, la sclerostina potrebbe dapprima bloccare la via del segnale Wnt e di conseguenza andare a colpire indirettamente anche il processo di neoformazione ossea mediato dalle BMPs (168). In questo studio non solo si valuta l'espressione della sclerostina negli individui spondilitici comprendola con controlli sani, ma si va a ricercare anche il livello sierico della proteina. Dai dati si evince che nei pazienti affetti da SA il livello sierico di sclerostina è più basso rispetto ai controlli sani; ancor più interessante è il paragone tra i livelli sierici e la progressione radiografica della malattia che rivela come queste siano collegate, ossia un livello basso di sclerostina sierica corrisponde alla maggior formazione di sindesmofiti. Questo risultato riveste un grande significato perché fa della sclerostina un potenziale futuro biomarker nella prevenzione della progressione del danno strutturale del rachide (167).

Nonostante siano stati effettuati numerosi studi sui meccanismi regolatori delle vie di trasduzione del segnale mediate da BMPs e Wnt, che portano ad un'eccessiva produzione di osso, ancora non si è arrivati ad identificare quale sia la molecola principale che potrebbe scatenare una loro attivazione incontrollata.

Un'altra considerazione interessante che è stata formulata è che molto probabilmente il bilancio tra le proteine positive e negative coinvolte nei pathways BMPs e Wnt rappresentino delle tappe decisive del processo di rimodellamento osseo; in modo particolare questo delicato equilibrio potrebbe determinare se la zona colpita sarà interessata da danno strutturale dovuto ad erosione ossea o formazione di osteofiti (165).

Alla luce di tutto ciò appare ancor meno chiara una diretta associazione tra infiammazione ed osteoproliferazione. Sempre più si sta facendo largo l'ipotesi che processo flogistico e neoformazione ossea siano processi clinicamente collegati, ma a livello molecolare disgiunti (150,170).

## **SCOPO**

Questo lavoro è incentrato sullo studio della malattia SA con lo scopo di definire nuovi marcatori cellulari e molecolari, sintomo di malattia e possibili bersagli terapeutici futuri.

A tal fine, il nostro interesse si è rivolto a:

- ✓ valutare il grado di osteoclastogenesi spontanea nelle colture di osteoclasti primari ottenuti da cellule mononucleate del sangue periferico (PBMCs) proveniente da individui affetti da SA. A tale scopo, sono state allestite due condizioni differenti di coltura: una in assenza di induttori, l'altra in presenza di induttori del differenziamento osteoclastico. Il grado di osteoclastogenesi è stato misurato attraverso il test TRAP;
- ✓ valutare il grado di apoptosi indotto dall'estratto della pianta *Emblica officinalis*. A tal fine, gli osteoclasti maturi ottenuti dopo induzione, sono stati trattati con l'estratto di *E. officinalis* e l'effetto apoptotico è stato misurato mediante saggio TUNEL;
- ✓ analizzare il profilo di espressione di geni coinvolti nei processi di osteogenesi e riassorbimento del tessuto osseo nei pazienti affetti da SA. In questo caso, l'RNA dei globuli bianchi è stato sottoposto ad analisi Real Time RT-PCR per i seguenti geni: Runx2, NFATc1, ER $\alpha$ , BMP-7,  $\beta$ -catenina, Lef1 e DKK-1.

## ***PAZIENTI E METODI***

### ***Raccolta dei campioni***

I campioni di sangue periferico utilizzati negli esperimenti di questa tesi sono stati raccolti dall'Unità Operativa di Reumatologia dell'Ospedale Sant'Anna di Ferrara, dopo approvazione dello studio da parte del Comitato Etico dell'Università di Ferrara e dell'Ospedale.

Ad ogni individuo sono stati prelevati circa 40 ml di sangue venoso in provette successivamente inviate in laboratorio, dopo consenso informato sottoscritto dal soggetto stesso. Sono stati arruolati 16 pazienti consecutivi affetti da SA HLA-B27 positiva, naïve ai farmaci anti-TNF $\alpha$ . Tutti i pazienti soddisfacevano i criteri di New York modificati per la SA. I pazienti assumevano FANS a seconda della necessità. I dati raccolti comprendevano: età, durata di malattia e gli indici aspecifici di flogosi. Anche eventuali manifestazioni extra-articolari sono state raccolte.

### ***Imaging***

In tutti i pazienti è stato eseguito uno studio radiografico e di RM del rachide e delle articolazioni sacro-iliache. Per misurare il danno anatomico irreversibile già avvenuto è stato utilizzato il modified Stoke Ankylosing Spondylitis Spine Score. Tutte le RM sono state eseguite con una macchina a 1,5 Tesla [Siemens Magnetom Avanto 1.5 T (Niobium-Titanium 18 Channels)]. Le sequenze utilizzate sono state: T-1 spin echo e short-tau inversion recovery (STIR).

Ogni radiografia e RM è stata interpretata con l'ausilio di un radiologo muscolo-scheletrico esperto. La definizione di lesioni attive alla RM si è basata sulle definizioni standardizzate. In particolare, le lesioni caratterizzate da edema midollare, definito come lesione iperlucente alle sequenze STIR, sono considerate attive. Per quello che riguarda la deposizione grassa, questa viene definita come segnale iperlucente nelle sequenze T-1 spin echo (171,172)

### ***Separazione delle cellule mononucleate di sangue periferico (PBMCs)***

Il campione di sangue è stato dapprima diluito 1:1 in PBS " Phosphate – buffered saline" (136,9 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 10,13 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), poi stratificato sulla soluzione Histopaque 1077 (Sigma) e sottoposto a centrifugazione (2000 rpm per 30 minuti a temperatura ambiente) per ottenere la separazione dei componenti del sangue.

Prelevata la fase intermedia, essa è stata diluita (1:5 in PBS) e sottoposta a centrifugazione (1700 rpm per 10 minuti a temperatura ambiente) per eseguire un lavaggio. Una volta eliminato il surnatante si aggiungono circa 10 ml di PBS 1X e si centrifuga di nuovo (1200 rpm per 6 minuti); questo lavaggio si ripete una seconda volta.

Eliminato il surnatante si risospende il pellet in 1 ml di PBS 1X e si procede con la conta delle cellule dopo colorazione con Trypan blue.

Parte delle cellule raccolte (circa 300 x 10<sup>3</sup> cell.) sarà destinata all'estrazione dell'RNA e all'analisi dell'espressione genica. Le restanti

cellule saranno, invece, destinate per l'allestimento delle colture per la valutazione dell'osteoclastogenesi. Il pellet cellulare è stato, quindi, risospeso in terreno di coltura D-MEM (Dulbecco's-Minimum Essential Medium) addizionato di siero fetale di vitello ("Fetal Calf Serum", FCS) al 10%, precedentemente scomplementato attraverso un trattamento a 56 per 30 minuti.

### ***Colture primarie di osteoclasti umani***

Le PBMCs isolate sono state piastrate alla concentrazione di  $3 \times 10^3$  PBMCs/cm su vetrini per coltura cellulare da 8 pozzetti (0,8 cm) e successivamente poste in incubatore a 37, in atmosfera umidificata all'80% e con CO<sub>2</sub> al 5%.

Sono state allestite due condizioni di coltura:

- osteoclastogenesi spontanea;
- osteoclastogenesi indotta.

Nell'osteoclastogenesi spontanea le PMBCS dopo essere state piastrate nei vetrini, vengono mantenute in coltura per 14 giorni in terreno di coltura D-MEM a cui sono stati addizionati:

FCS al 10%, glutammina (2 mM), gli antibiotici streptomina (50 mg/ml) e penicillina (100 mg/ml), avendo cura di mantenere sempre anche la componente linfocitaria.

Per quanto riguarda l'osteoclastogenesi indotta, dopo 2 ore dalla piastratura delle PMBCs, le cellule in sospensione sono state rimosse, mentre i rimanenti monociti sono stati mantenuti in coltura per 14 giorni, in terreno di coltura D-MEM a cui sono stati addizionati: FCS al 10%,

glutammina (2mM), gli antibiotici streptomina (50 mg/ml) e penicillina (100 mg/ml) e gli induttori del differenziamento osteoclastico M-CSF umano (25 ng/ml), RANKL (30 ng/ml) e PTH 10 M.

Dopo 14 giorni si rileva la presenza di osteoclasti maturi, sia nella condizione di osteoclastogenesi spontanea sia indotta, verificando la positività al test della TRAP (fosfatasi acida tartrato-resistente).

### ***Estrazione dell'RNA e retrotrascrizione***

Una parte delle PBMCs, ricavate dai campioni di sangue periferico, viene destinata per l'estrazione dell'RNA. Dopo un lavaggio con PBS 1X, le cellule vengono lisate e raccolte al fine di estrarre DNA e RNA: per l'estrazione viene utilizzato il Kit "QIAGEN Rneasy Plus Micro". La migrazione elettroforetica degli RNA estratti su gel d'agarosio all'1% permette di verificare l'integrità del campione e di stabilire il volume della soluzione di RNA da sottoporre a reversione.

La reversione dell'RNA estratto in cDNA viene effettuata tramite il Kit "High Capacity cDNA Reverse Transcription" (Applied Biosystems). Per ogni campione da revertire si prepara in eppendorf una soluzione con la quantità di RNA stabilita e acqua nucleasi-free, per un volume totale di 10 microl. Si prepara quindi una seconda mix con l'enzima e i substrati necessari per la reazione di reversione. I volumi per campione sono: 2 microl di RT-Buffer 10X, 0,8 microl di dNTPs Mix 25X (100 mM), 2 microl di RT-Random Primers 10X, 1 microl di Multiscribe Reverse Transcriptase 50 U/microl, 4.2 microl di acqua nucleasi-free (volume totale uguale 10 microl). Ad ogni provetta con l'RNA vengono quindi

aggiunti 10 microl di mix di reazione, per un volume finale di 20 microl; infine si posizionano le provette in un thermal-cycler, programmando i seguenti step:

10' a 25 (per equilibrare la reazione)

120' a 37 (azione enzimatica)

5' a 85 (inattivazione dell'enzima)

Hold a 4 (conservazione).

### ***RT-PCR quantitativa***

Negli esperimenti descritti in questa tesi è stata utilizzata la tecnologia TaqMan: essa prevede l'impiego di oligonucleotidi sonda, complementari ai geni bersaglio e coniugati in 5' a un colorante "reporter" fluorescente (FAM 6 – carboxyfluorescein per i geni in analisi e VIC per il gene di riferimento) e in estremità 3' ad un "quencher" (TAMRA 6 – carboxytetramethylrhodamine).

Il quencher assorbe e maschera la fluorescenza emessa dal reporter (eccitato dallo strumento) fino a quando l'attività esonucleasica 5'----3' della Taq DNA – polimerasi in fase di amplificazione non li separa. La fluorescenza rimane quindi per i primi 20 cicli circa ad un livello basale; quando invece la quantità di amplificato comincia a crescere in maniera esponenziale, si ha un corrispondente aumento della fluorescenza stessa.

L'indicatore della quantità di cDNA di partenza è il cosiddetto ciclo soglia (Ct), ossia la frazione di ciclo in cui comincia l'aumento esponenziale. Il

valore del Ct è inversamente proporzionale alla quantità di cDNA di partenza ed è da esso che parte l'elaborazione dei dati.

L'uso di geni di riferimento, che sono espressi in modo abbondante e uniforme nei vari tipi cellulari, permette di normalizzare i valori.

Le PCR vengono eseguite in duplicato per ogni campione e, nella stessa reazione, i cDNA vengono analizzati per il gene d'interesse e per il gene di riferimento.

I valori di Ct sono presi come valori medi dei duplicati. Si calcola quindi il deltaCt come la differenza tra il Ct del gene target e quello dell'housekeeping (riferimento, in questo caso il gene GAPDH). Si sceglie quindi un campione calibratore, ossia il valore del deltaCt del campione con i livelli più bassi del cDNA target e che può permettere il confronto dell'espressione genica tra gli altri campioni. Si calcola in questo modo il deltadeltaCt, cioè la differenza tra il delta Ct di ogni campione e quello del calibratore. Secondo una elaborazione validata dal depositario della tecnologia, i livelli di espressione dei campioni possono essere espressi come  $2^{-\text{deltadeltaCt}}$ , valore definito "fold induction", che quantifica l'incremento di espressione rispetto al campione scelto come calibratore.

In questa tesi, i geni la cui espressione è stata presa in esame mediante tecnologia TaqMan, utilizzando le sonde specifiche (Applied Biosystems), sono Slug, Lef1, beta-catenina, DKK-1, Runx2, BMP-7, NFATc1 ed ERalfa. L'espressione è stata valutata in cellule provenienti da pazienti SA e cellule di soggetti sani. I risultati sono stati riportati come livelli di mRNA relativi d'espressione  $\pm$  ES. Le medie d'espressione

di ogni gene sono state confrontate tra quelle derivanti dai livelli d'espressione di pazienti SA e da quelle di soggetti sani attraverso il test t di Student per verificarne una eventuale significatività ( $P < 0,05$ ).

### ***Test TRAP (fosfatasi acida tartrato-resistente)***

Il test consente di verificare l'avvenuto differenziamento osteoclastico, 14 giorni dopo l'allestimento della coltura cellulare di PBMCs attraverso la rilevazione dell'attività fosfatasi acida dell'enzima TRAP, marcatore caratteristico degli osteoclasti.

Per entrambi i tipi di coltura (spontanea e indotta) è stato eseguito il test con il medesimo procedimento.

Le cellule sono state sottoposte al lavaggio con buffer cacodilico 0.1 M pH 7.2 (0.1 M sodio cacodilato, 0,0025%  $\text{CaCl}_2$ ), e successivamente fissate con la soluzione 3% paraformaldeide nel medesimo buffer per 15 minuti, al termine del quale si effettua un ulteriore lavaggio.

Per rilevare i livelli di TRAP è stato utilizzato il Kit Fosfatasi Acida (Sigma). A tal fine si prepara una soluzione costituita da sodio acetato 2.5 M pH 5.2, naftol AS-BI acido fosforico 12.5 mg/ml, in N,N'-dimetilformamide, acido tartarico 0.67 M Ph 5.2 e sali fast garnet GBC purificati. Tutti i reagenti sono contenuti nel Kit.

La soluzione preriscaldata a 37 gradi cent per 5-10 minuti, viene posta a contatto con le cellule per 1h a 37 gradi cent.

Il naftolo AS-BI, rilasciato mediante idrolisi enzimatica, si accoppia al fast garnet GBC formando depositi insolubili nei siti di attività. Quindi solo le cellule contenenti una fosfatasi acida che non risente della presenza

dell'acido tartarico mostreranno la corretta colorazione, costituita da granuli citoplasmatici tra il violaceo e il rosso scuro.

Segue un lavaggio con acqua distillata per 3 minuti a temperatura ambiente.

Le cellule multinucleate TRAP positive con 3 o più nuclei vengono considerate osteoclasti maturi (Ocs). I risultati sono stati riportati come numero di OCs TRAP positivi  $\pm$  ES.

### ***Estratto della pianta *Emblica officinalis****

L'estratto di *E. officinalis* deriva dai frutti essiccati di questa pianta, e l'estrazione è stata fatta in etanolo con una resa de 9,33%, secondo il metodo riportato nel lavoro di Khan et al. del 2002 (173).

L'emblica (*Emblica officinalis*) è un albero o un cespuglio deciduo appartenente alla famiglia delle Euphorbiaceae (Indian Pharmaceutical Codex 1953) e cresce nelle zone tropicali e subtropicali del sudest asiatico, in particolare in Cina, India, Indonesia e nella penisola malese ed è sempre stata usata come antinfiammatorio e antipiretico nella medicina tradizionale cinese, tibetana ed Ayurvedica (174,175). Questo albero di piccola o media dimensione ha una corteccia caduca, liscia, verde grigio con foglie pennate e leggermente oblunghie. I frutti sono gialli o rosa, sferico-globulari (ampi 18-25 mm e lunghi 15-20 mm), più larghi che lunghi, con depressioni piccole e poco profonde lungo l'asse longitudinale, che partono dal picciolo. Tra i componenti attivi principali del frutto dell'*E. officinalis* sono stati isolati i tannini (emblicanina A e B, la punigluconina e la pedunculagina). E dotata di numerose attività

terapeutiche che, basata sulle sue proprietà antiossidanti, rendono questa pianta utile nel trattamento delle patologie degenerative associate all'invecchiamento. Per il contenuto in speciali tannini, L'E. officinalis è indicata per il trattamento del diabete, detossificazione del fegato e protezione della pelle dai segni dell'invecchiamento.

### ***Analisi dell'apoptosi***

Le cellule dopo 14 giorni di coltura vengono trattate con l'estratto della pianta *Emblica officinalis*. Un precedente studio ha testato la citotossicità di varie concentrazioni crescenti (0,5-5-50 e 500 microg/ml) dell'estratto della pianta su osteoclasti derivanti da sangue periferico, attraverso il saggio MTT. In questo saggio la vitalità cellulare viene determinata da una reazione colorimetrica, in cui

il sale tetrazolio (color giallo) MTT viene convertito in cristalli di formazano (color blu) dalle cellule metabolicamente attive e, quindi, vive. I risultati di questo studio hanno dimostrato che l'estratto dell'*Emblica officinalis* non ha effetti citotossici sulle cellule, ad eccezione della concentrazione massima, 500 microg/ml, che induce una lieve riduzione della vitalità degli osteoclasti (176).

Gli osteoclasti derivanti da PBMCs di pazienti SA e soggetti sani, nella condizione di osteoclastogenesi indotta, al 14 sono stati trattati per 72 h con differenti concentrazioni dell'estratto di *Emblica officinalis* (5, 50 e 500 microg/ml) a partire dalla soluzione madre di 50 microg/ml in H<sub>2</sub>O.

Per l'analisi dell'apoptosi è stato utilizzato il "DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System" (Promega) che misura il grado di frammentazione del DNA.

Gli osteoclasti maturi dopo trattamento con l'estratto della pianta sono stati fissati con un'incubazione a temperatura ambiente per 25 minuti in una soluzione contenente il 4% di paraformaldeide (in PBS 1X). Quindi, dopo un lavaggio in PBS 1X, le cellule sono state permeabilizzate con una soluzione 0.2% di Triton X-100 (in PBS 1X).

È stato poi effettuato un trattamento di 5-10 minuti in 100 microl di Equilibration Buffer (200 mM cacodilato di potassio pH 6.6; 25 mM Tris HCL pH 6.6; 0.2 mM DTT, 0.25 mg/ml BSA, 2.5 mM cloruro di cobalto).

Lo strato di cellule è stato quindi ricoperto con la "TdT Reaction Mix" contenente l'enzima "Terminal-deoxynucleotidyl-transferase" (TdT), in opportuno buffer (Equilibration Buffer), in presenza di Biotinylated Nucleotide Mix. La reazione è avvenuta a 37 gradi cent per 60 minuti, in una camera umida.

La reazione è stata bloccata immergendo il vetrino in SSC 2X (0,3 M NaCl, 0.03 M sodio citrato) per 15 minuti a temperatura ambiente. Successivamente, il vetrino è stato posto in perossido di idrogeno 0.3% per 3-5 minuti a temperatura ambiente, per bloccare le perossidasi endogene che potrebbero falsare i risultati sperimentali. Le cellule sono state quindi ricoperte con 100 microl di "Streptavidin-HRP" SOLUTION (1microg/ml) e lasciate per 30 minuti a temperatura ambiente.

Infine, il vetrino è stato posto in contatto con la soluzione cromogenica diaminobenzidina (DAB) (DAB substrato 1X Buffer e DAB cromogeno

1X, in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1X) fino al raggiungimento dell'intensità di colorazione desiderata (marrone scuro). La reazione è stata bloccata immergendo i vetrini in acqua. Il vetrino può essere allestito in glicerolo:TBS 9:1 dopo l'eventuale controcolorazione con ematossilina acida (blu scuro).

La misurazione dei livelli di apoptosi avviene calcolando la percentuale di nuclei apoptotici (nuclei marrone scuro) rispetto al numero di nuclei totale di cellule multinucleate TRAP positive, valutate in esperimenti indipendenti. I risultati sono stati riportati come percentuale di nuclei apoptotici  $\pm$  ES.

### ***Analisi statistica***

Per l'analisi e la presentazione dei dati è stato utilizzato il GraphPad Prism version 5.00. È stata eseguita un'analisi di varianza seguita dallo Student's t-test, considerando significativo un  $P < 0,05$ .

## **RISULTATI**

### ***Caratteristiche dei pazienti e parametri clinici***

I campioni di sangue periferico utilizzati in questi esperimenti sono stati prelevati da individui affetti da spondilite anchilosante ed individui sani, afferenti alla U.O. di Reumatologia dell'Arcipedale Sant'Anna di Ferrara.

Campioni	PBMCs	Sesso	Età
Paz. 1	18.560 x 10 <sup>3</sup> cellule	M	35
Paz. 2	25.000 x 10 <sup>3</sup> cellule	M	45
Paz. 3	25.000 x 10 <sup>3</sup> cellule	M	41
Paz. 4	46.000 x 10 <sup>3</sup> cellule	F	52
Paz. 5	17.200 x 10 <sup>3</sup> cellule	M	53
Paz. 6	22.720 x 10 <sup>3</sup> cellule	M	64
Paz. 7	18.240 x 10 <sup>3</sup> cellule	M	45
Paz. 8	12.480 x 10 <sup>3</sup> cellule	M	41
Paz. 9	48.640 x 10 <sup>3</sup> cellule	M	36
Paz. 10	52.320 x 10 <sup>3</sup> cellule	F	49
Paz. 11	55.350 x 10 <sup>3</sup> cellule	M	42
Paz. 12	69.760 x 10 <sup>3</sup> cellule	F	44
Paz. 13	62.720 x 10 <sup>3</sup> cellule	F	64
Paz. 14	19.200 x 10 <sup>3</sup> cellule	F	42
Paz. 15	31.787 x 10 <sup>3</sup> cellule	M	58
Paz. 16	35.626 x 10 <sup>3</sup> cellule	M	50
Ctr. 1	41.920 x 10 <sup>3</sup> cellule	M	33
Ctr. 2	39.680 x 10 <sup>3</sup> cellule	M	45
Ctr. 3	50.932 x 10 <sup>3</sup> cellule	F	26
Ctr. 4	37.867 x 10 <sup>3</sup> cellule	F	30
Ctr. 5	41.753 x 10 <sup>3</sup> cellule	F	43
Ctr. 6	34.987 x 10 <sup>3</sup> cellule	F	47

<b>Tabella 7. Caratteristiche cliniche e demografiche dei pazienti</b>	
secco (M/F)	12/7
età (anni)	47.7 ± 8.4
durata di malattia (anni)	12.4 ± 5.6
artrite periferica (S/N)	2/17
uveite (S/N)	3/16
dattilite (S/N)	4/15
ASDAS-CRP	2.7 ± 0.9
mSASSS	24.7 ± 7.2
HLA-B27 positivo	100%
I valori indicati sono la media ± SD	

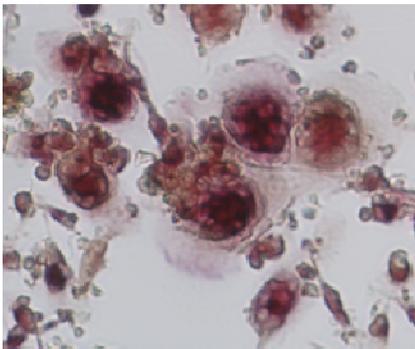
### ***Valutazione dell'osteoclastogenesi spontanea***

L'osteoclastogenesi spontanea viene spesso associata a condizioni patologiche caratterizzate da perdita di tessuto osseo, come ad esempio l'artrite reumatoide, in cui la maturazione eccessiva di osteoclasti, dovuta soprattutto all'attivazione dei linfociti T, favorisce il processo di riassorbimento osseo. Vi sono diversi studi che dimostrano come numerose citochine, (IL-1, IL-6, IL-17 e TNF $\alpha$ ) che mediano l'infiammazione, siano in grado di indurre l'osteoclastogenesi in modo diretto o indiretto (177-80). Inoltre uno studio coreano ha dimostrato che il grado di osteoclastogenesi in vitro stimolata da RANKL è maggiore nei pazienti SA rispetto ai soggetti sani (181). Per verificare queste ipotesi

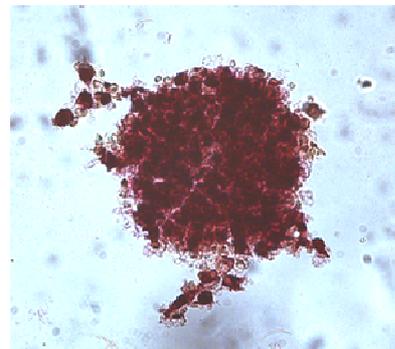
nel gruppo dei pazienti da noi studiato abbiamo eseguito gli esperimenti di seguito riportati.

La presenza degli osteoclasti (OCs) è stata indagata attraverso la rilevazione di un enzima specifico: la fosfatasi acida tartrato-resistente (TRAP). Il test TRAP è stato eseguito su tutti i campioni di PBMCs coltivati in assenza e in presenza di induttori del differenziamento osteoclastico (PTH, RANKL, M-CSF).

La positività al test TRAP di una cellula risulta dalla presenza di granuli citoplasmatici color violetto, come è riportato in figura 1. Le cellule TRAP positive che presentano tre o più nuclei vengono considerate osteoclasti maturi.



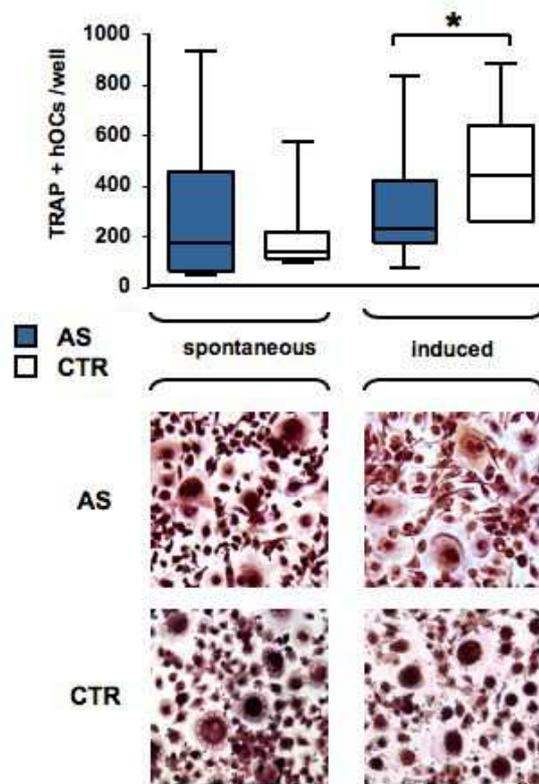
Paziente 7



Paziente 4

**Figura 1. Immagine di osteoclasti TRAP+, ingrandimento (20 x).** Queste cellule, derivanti da sangue periferico di 2 pazienti spondilitici, non sono state trattate con induttori dell'osteoclastogenesi.

Dopo 14 giorni di coltura, è stata valutata l'osteoclastogenesi e confrontato il fenomeno in tutti i campioni.



**Figura 2. Osteoclastogenesi spontanea ed indotta in colture di PBMCs di pazienti con SA (AS) e controlli sani (CTR):** L'analisi statistica è stata condotta confrontando le due condizioni. \*  $P < 0,05$ . Nel pannello inferiore immagini di OCs umani con la colorazione TRAP (ingrandimento 20x).

La seconda serie di esperimenti volta a determinare il grado di osteoclastogenesi indotta, ha messo in evidenza come la presenza degli induttori non sia necessariamente associata ad un aumento delle cellule TRAP positive. I campioni derivanti da soggetti sani rispecchiano i dati attesi, ossia dimostrano un'osteoclastogenesi indotta maggiore di quella spontanea, tranne un campione in cui la differenza tra le due condizioni prese in esame non è significativa. La figura 2 mostra il grado di osteoclastogenesi spontanea ed indotta degli osteoclasti dei soggetti affetti da SA e dei controlli sani.

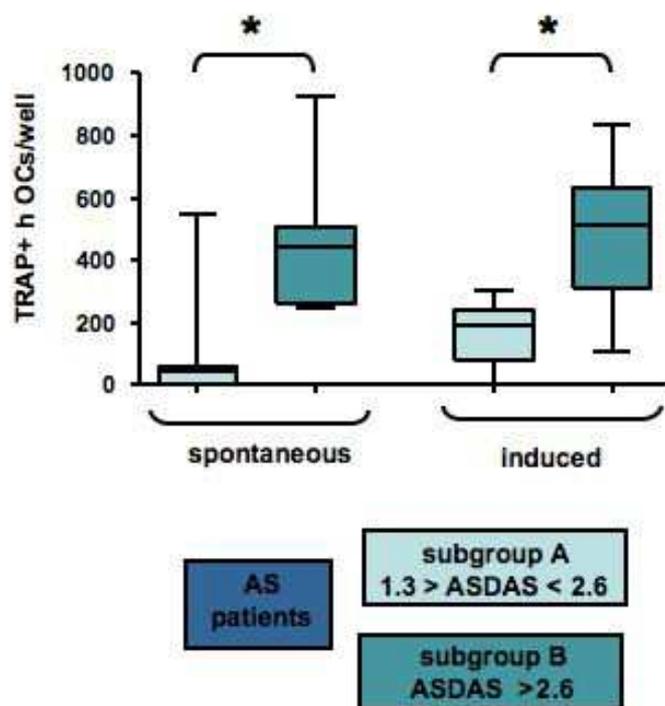
### ***Relazione tra attività di malattia e osteoclastogenesi***

Al fine di valutare la relazione esistente tra osteoclastogenesi ed attività di malattia, abbiamo suddiviso i pazienti in due sottogruppi a seconda del valore dell'ASDAS-CRP. Abbiamo considerato un gruppo A di pazienti con attività di malattia moderata ( $1,3 > \text{ASDAS-CRP} \leq 2,6$ ) ed un gruppo B con attività di malattia elevata ( $\text{ASDAS-CRP} > 2,6$ ). Il numero di pazienti in ogni gruppo è stata, rispettivamente, di 11 e 8.

Come mostrato in tabella 8, il 75% dei pazienti del sottogruppo A presenta lesioni a tipo degenerazione grassa con poche lesioni infiammatorie alla RM. L'edema midollare, di converso, è stato rilevato più frequentemente rispetto alla degenerazione grassa nei pazienti del sottogruppo B. Confrontando il numero degli osteoclasti nei due sottogruppi, abbiamo dimostrato che un elevato numero di osteoclasti era associato in maniera statisticamente significativa con alti valori di ASDAS-CRP (Figura 3).

**Tabella 8.** Parametri clinici

	paziente	ASDAS- CRP	BME	Degenerazione grassa
sottogruppo A	1	2.1	4	3
	2	1.8	1	3
	3	1.5	2	4
	4	1.4	2	5
	5	2.3	1	4
	6	2.1	2	3
	7	2.5	3	2
	8	2.3	2	4
	9	2.1	2	2
	10	1.4	1	6
	11	1.8	1	5
sottogruppo B	12	3.4	5	2
	13	3.8	6	1
	14	3.1	7	3
	15	4.1	6	3
	16	3.5	5	2
	17	3.9	8	2
	18	3.6	4	1
	19	3.8	7	3



**Figura 3. Osteoclastogenesi spontanea ed indotta in colture di PBMCs di pazienti con SA (AS) divisi in due sottogruppi sulla base dell'indice ASDAS-CRP: Sottogruppo A vs sottogruppo B spontanea: P= 0,0006; Sottogruppo A vs sottogruppo B indotta: P = 0,0012.**

### ***Valutazione dell'apoptosi dopo trattamento con *Emblica officinalis****

Uno studio recente effettuato nel nostro laboratorio ha dimostrato che estratti ottenuti dai frutti della pianta medicinale *Emblica officinalis* sono in grado di indurre l'apoptosi in osteoclasti primari umani senza causare effetti citotossici, se non lievi ad una concentrazione di 500 µg/ml (176).

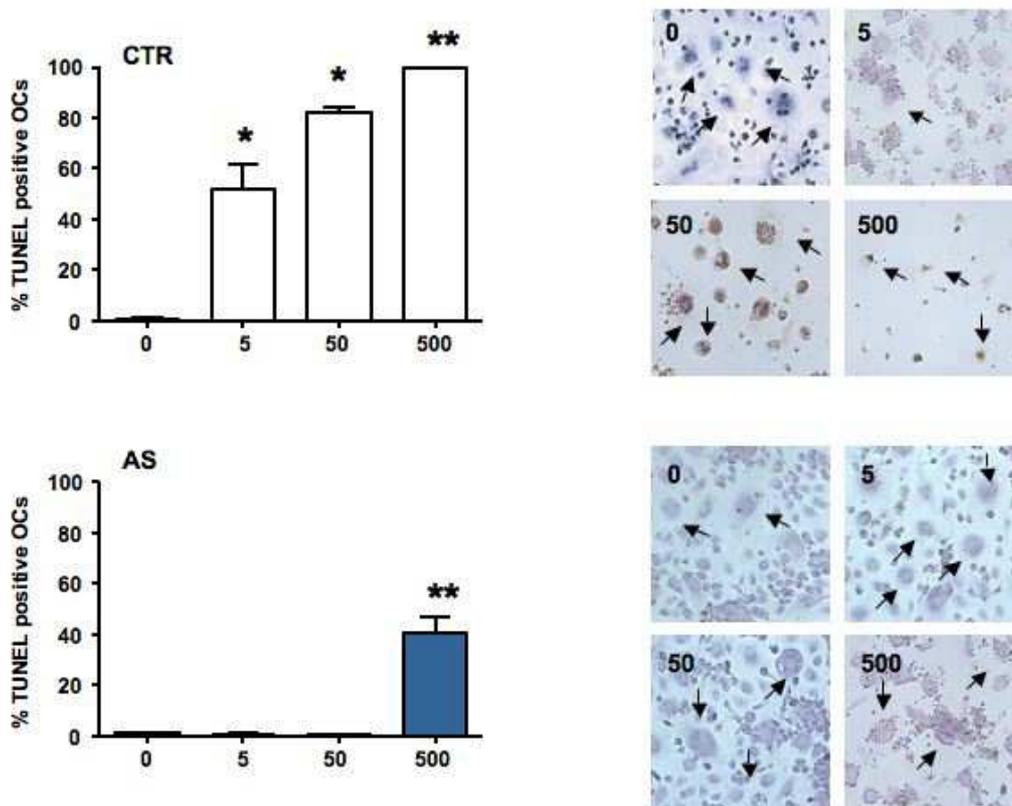
È stata quindi valutata la possibilità di interferire con il processo di apoptosi degli osteoclasti derivati da pazienti affetti da SA, con questi stessi estratti. Gli osteoclasti ottenuti dopo 14 giorni di coltura in presenza degli induttori, sono stati trattati per 72 ore con differenti concentrazioni dell'estratto di *E. officinalis*, 5, 50 e 500 µg/ml a partire da una soluzione madre di 50 µg/µl in H<sub>2</sub>O. Le cellule sono state, in seguito,

fissate e processate per il rilevamento del grado di apoptosi attraverso il saggio TUNEL, secondo le modalità descritte nella sezione “materiali e metodi”. Il processo che porta all’apoptosi di una cellula è composto da varie fasi che culminano con la morte cellulare. Tra queste fasi vi è la frammentazione del DNA della cellula ed è proprio questa fase che viene misurata con il saggio TUNEL. Questa tecnica prevede, infatti, che l’enzima DNA nucleotidil-trasferasi terminale aggiunga nei siti di DNA cellulare frammentato che presentano estremità 3’-OH libere, nucleotidi biotinilati che poi vengono rivelati mediante il sistema streptavidina-DAB. Gli OCs derivati dagli individui sani mostrano un elevato grado di apoptosi già alla concentrazione di 50 µg/ml dell’estratto della pianta, mentre alla concentrazione massima si ha la perdita della maggior parte delle cellule. Tale esperimento, rappresentativo dei risultati ottenuti anche con gli altri campioni di pazienti SA analizzati, dimostra che l’effetto proapoptotico dell’estratto della pianta *Emblica officinalis* è visibile solo alla concentrazione 500 µg/ml negli OCs derivanti da soggetti affetti da SA, quindi la concentrazione che normalmente induce apoptosi negli OCs da soggetti sani non è efficace negli OCs da SA.

L’effetto del trattamento con *E. officinalis*, è stato valutato globalmente attraverso il conteggio dei nuclei apoptotici. Come risulta dai dati riportati in figura 4, il fenomeno apoptotico è decisamente più apprezzabile nei controlli sani, mentre gli OCs derivanti da soggetti affetti da SA presentano una certa resistenza all’apoptosi. La dose 50 µg/ml sembra non avere nessun effetto proapoptotico negli OCs derivanti da pazienti SA. I controlli sani rispondono, invece, in maniera più uniforme e sembrano essere più sensibili al trattamento, in quanto mostrano una percentuale del 100% di apoptosi in tutti i campioni alla concentrazione

maggiore dell'estratto (500  $\mu\text{g/ml}$ ), e una percentuale che oscilla tra l'80-85% alla dose 50  $\mu\text{g/ml}$ , ad eccezione del controllo 3 che non denota segni di apoptosi a questa concentrazione.

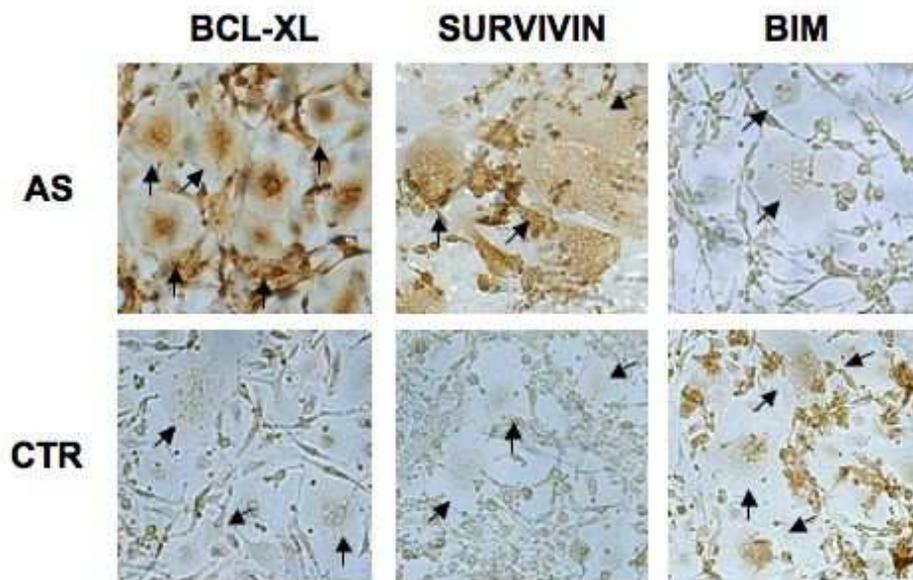
La dose corrispondente a 5  $\mu\text{g/ml}$  non ha indotto apoptosi in nessun caso.



**Figura 4. Trattamento degli OCs di pazienti con SA (AS) e volontari sani (CTR) con differenti concentrazioni (5-500  $\mu\text{g/ml}$ ) di estratti di *Emblica officinalis* per 72 ore, 14 giorni dopo l'induzione dell'osteoclastogenesi: Le poptosi delle cellule è stata valutata con il test TUNEL. I risultati quantitativi dell'esperimento sono riportati come % negli istogrammi (i dati rapprentano la media  $\pm$  SD di 20 determinazioni indipendenti; \* P= 0,001; \*\* P= 0,00001). Immagini rappresentative del test TUNEL per ogni esperimento sono riportate: il colore marrone indica le cellule ch vanno in contro ad apoptosi (ingrandimento 20x).**

### ***Valutazione del profilo di espressione di geni specifici***

Parte delle cellule ottenute da sangue periferico, pari a circa 300.000 cellule, sono state destinate all'analisi dell'espressione genica mediante la tecnica della Real-Time RT-PCR (Figura 5). Tale indagine è stata preliminarmente eseguita solamente in 7 pazienti ed in 4 controlli sani.



**Figura 5. Analisi immunocitochimica di OCs di pazienti con SA (AS) e volontari sani (CTR):** È stata valutata l'espressione basale di Bcl-XL, Survivin e Bim (in gradimento 20x). Le frecce indicano la immunopositività.

I geni che sono stati presi in esame sono:

**-Runx2:** (runt-related transcription factor 2) è il più importante fattore di trascrizione che regola il differenziamento in senso osteoblastico, infatti diversi studi hanno dimostrato come questo fattore sia necessario e sufficiente nel processo di differenziamento degli osteoblasti (182,183).

Le sequenze consenso riconosciute da questo fattore di trascrizione sono state trovate nella maggior parte dei promotori dei geni che regolano l'osteoblastogenesi.

**-NFATc1:** (nuclear factor of activated T-cells 1) è il fattore di trascrizione principalmente coinvolto nei processi di formazione degli osteoclasti e nella regolazione del processo di riassorbimento osseo (184). Recenti studi suggeriscono un coinvolgimento di NFATc1 anche in processi di osteoblastogenesi, attraverso la regolazione della trascrizione di geni del differenziamento degli osteoblasti, come ad esempio Osterix (185).

**-ER $\alpha$ :** il recettore dell'estrogeno- $\alpha$  favorisce l'osteoblastogenesi e inibisce l'osteoclastogenesi (186,187) attivando la trascrizione di geni coinvolti nella formazione del tessuto osseo, come Runx2 (188). Interessante è notare come questo recettore e NFATc1 siano modulati positivamente dallo stesso sistema, Ca<sup>2+</sup>/calmodulina/calcineurina (189).

**-BMP-7:** (bone morphogenetic protein 7) proteina coinvolta positivamente nella regolazione del processo di ossificazione endocondrale;

**-Slug:** fattore di trascrizione regolato positivamente dal pathway del Wnt, coinvolto in numerosi processi cellulari e recentemente correlato positivamente con la maturazione degli osteoblasti (190).

**- $\beta$ -catenina:** proteina attivata dalla via di trasduzione del segnale del Wnt, capace di attivare la trascrizione di geni coinvolti nel differenziamento osteoblastico, come ad esempio Runx2 (191).

**-Lef1:** (lymphoid enhancer-binding factor 1) forma un complesso legando il fattore di trascrizione TCF, il fattore delle cellule T; in seguito lega la  $\beta$ -catenina, regolando la trascrizione di specifici geni;

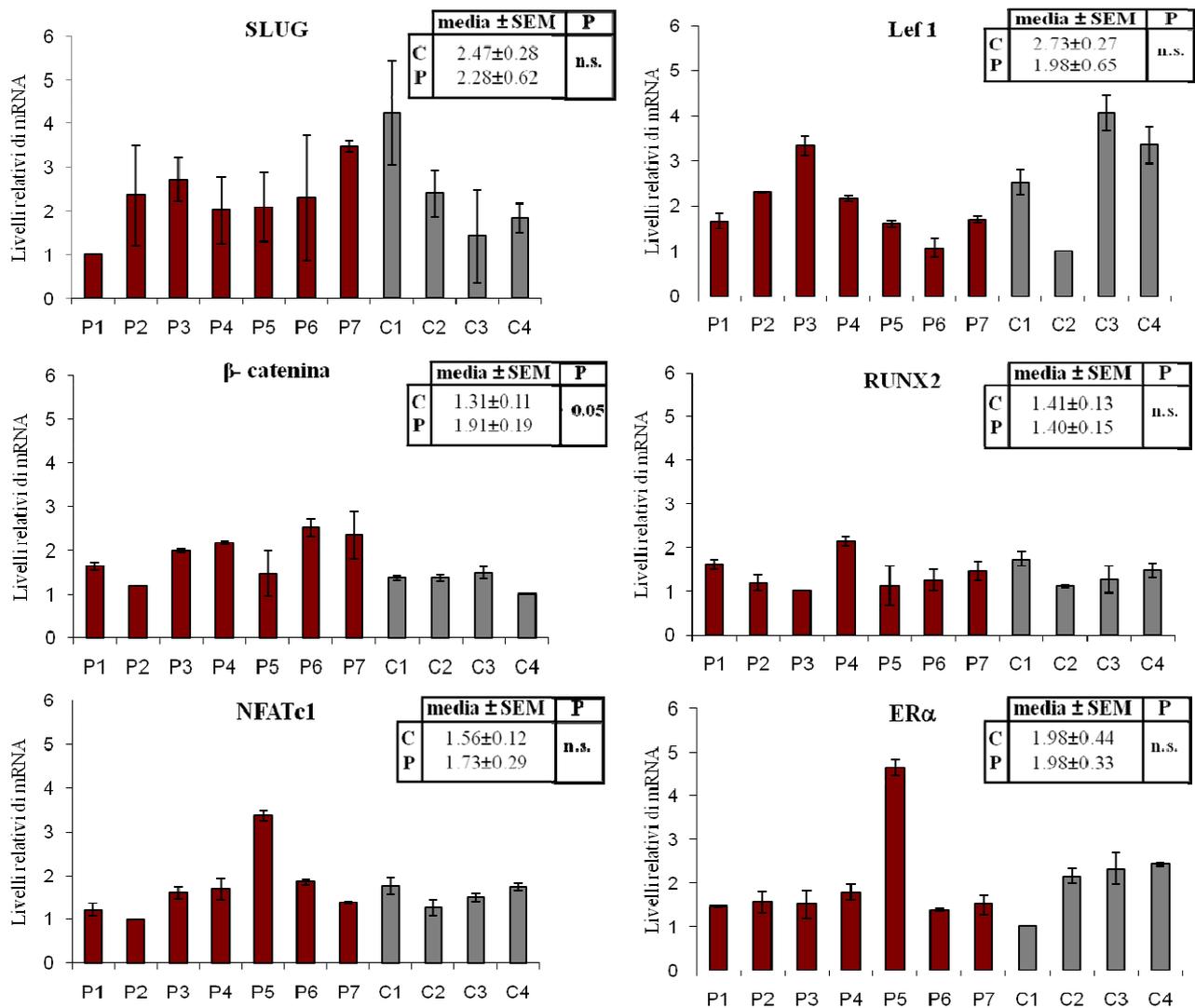
**-DKK-1:** (dickkopf-related protein 1) principale antagonista della via del segnale del Wnt.

**Tabella 9:** Analisi complessiva dei livelli di espressione dei geni analizzati mediante RT-PCR quantitativa, riscontrati nei globuli bianchi derivati da sangue periferico di tutti i campioni

gene	livello di espressione
Slug	+
Lef-1	+++++
B-catenina	+++++
DKK-1	N.D.
Runx2	+++
BMP-7	N.D.
NFATc1	++++
Er $\alpha$	++

Il livello di espressione complessivo di ogni gene, riscontrato in tutte le cellule ed analizzato mediante RT-PCR quantitativa, viene comparato con quello degli altri

In tabella 9 sono riportati i livelli di espressione dei singoli geni: i dati risultano da un'analisi complessiva di tutti i campioni mediante RT-PCR quantitativa. I risultati dimostrano che i geni Lef1,  $\beta$ -catenina, Runx2 e NFATc1 sono quelli più espressi in tutte le cellule rispetto agli altri geni esaminati. Al contrario, i livelli di espressione di DKK-1 e BMP-7 sono risultati non valutabili e, pertanto, esclusi dall'analisi comparativa successiva. La figura 6 mostra il livello di espressione dei geni coinvolti nella regolazione della formazione e del riassorbimento del tessuto osseo.



**Figura 6. Analisi del livello di espressione di geni coinvolti nella regolazione della formazione e riassorbimento di tessuto osseo.** L'RNA estratto dai globuli bianchi dei campioni (pazienti con SA, P1-P7; soggetti sani, C1-C4) viene retrotrascritto in cDNA per valutare i livelli di espressione dei vari geni mediante la tecnica Real-Time RT-PCR. I risultati sono stati normalizzati utilizzando il gene di riferimento GAPDH secondo il metodo ddct. I risultati riportati nei grafici sono indicati come *fold induction* dell'espressione dell'mRNA nei confronti del campione calibratore, cioè il valore d'espressione più basso per ciascuno dei geni. Il livello di espressione di ogni gene è stato confrontato tra quello ottenuto da pazienti SA e quello dei controlli. Nelle tabelle (in alto, a destra di ogni grafico) sono state riportate le medie dei livelli d'espressione relativi di mRNA di ogni gene dei controlli sani (C) e dei pazienti SA (P) seguite dal valore dell'errore standard (SEM).

I geni di cui è stata valutata l'espressione sono tutti correlati con il processo di formazione e rimodellamento del tessuto osseo, che nella spondilite anchilosante risultano alterati. In particolare, i geni Runx2, NFATc1, ER $\alpha$ , BMP-7 sono associati con il processo di osteogenesi in generale. I geni Slug, DKK-1, Lef1 e  $\beta$ -catenina, invece, sono più strettamente associati al pathway del Wnt.

Il profilo d'espressione di questi geni è stato, quindi, preso in esame in ogni campione.

I dati riportati in figura 6 mostrano un'alta variabilità di espressione dei geni considerati.

Merita un'osservazione particolare il fatto che il gene per  $\beta$ -catenina sia significativamente più espresso nei soggetti affetti da SA rispetto ai controlli, a sostegno del ruolo della via del segnale mediata da Wnt. I geni per SLUG, Runx2 e Lef-1 non mostrano, invece, differenze di espressione apprezzabili tra gli individui affetti da SA e i controlli sani.

Per quanto riguarda i geni NFATc1 e ER $\alpha$ , questi risultano nella norma o addirittura poco espressi rispetto agli individui sani, ad eccezione del paziente 5 che mostra un'elevata espressione di entrambi i geni.

## ***DISCUSSIONE***

In questa tesi si è cercato di ampliare la conoscenza sulla spondilite anchilosante, malattia infiammatoria cronica facente parte delle spondiloartropatie, allo scopo di fornire informazioni utili per eventuali terapie non ancora sperimentate. La patogenesi della SA è, infatti, ancora non del tutto conosciuta e studi in questo senso riportano varie ipotesi in alcuni casi in contrapposizione fra loro, a sottolineare la necessità di ulteriori ricerche.

Uno dei nostri primi propositi è stato quello di valutare il grado di osteoclastogenesi spontanea in vitro nei pazienti affetti da SA. Il processo che porta al differenziamento di una cellula osteoclastica è finemente regolato in condizioni normali, ma in letteratura si possono trovare numerosi studi che dimostrano come questo fenomeno sia notevolmente alterato e incrementato in diverse patologie caratterizzate da perdita di densità ossea.

Dai nostri risultati non è stato possibile confermare questo fenomeno nella spondilite anchilosante: la variabilità del grado di osteoclastogenesi osservata nei pazienti affetti da SA ci porta a concludere che non vi siano differenze significative nell'osteoclastogenesi spontanea in vitro fra pazienti affetti da SA e individui sani.

L'ipotesi, quindi, è che l'osteoclastogenesi spontanea non sia una caratteristica essenziale presente in tutti i soggetti affetti da SA, ma solo forse di un certo gruppo. È opportuno, però, sottolineare il fatto che il numero di campioni presi in esame in questa tesi è limitato e che ulteriori

esperimenti devono essere effettuati per confermare la validità di tale ipotesi.

Alla luce di questi risultati, il nostro secondo obiettivo è stato quello di studiare la possibilità di interferire con il ciclo cellulare delle cellule in questione attraverso la valutazione della possibilità di modulare l'apoptosi. Questo tipo di approccio può, infatti, rappresentare una strategia terapeutica in quelle patologie in cui la perdita di massa ossea è dovuta ad una alterazione dell'equilibrio dell'attività degli osteoblasti e osteoclasti, in favore di questi ultimi.

L'apoptosi è un tipo di morte cellulare programmata che riveste una funzione di turnover molto importante nelle cellule che formano tessuti ed organi. È noto che l'apoptosi può essere innescata mediante due meccanismi, uno estrinseco (che coinvolge recettori di membrana) e uno intrinseco (che coinvolge soprattutto i mitocondri). Entrambe le vie convergono nell'attivazione della famiglia delle caspasi, proteasi cellulari in grado di promuovere cambiamenti della morfologia della cellula che culminano, infine, con la morte della stessa (193).

I recettori maggiormente coinvolti nella via estrinseca che porta all'apoptosi sono i recettori del TNF, i recettori TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) e i recettori FAS (o CD95); questi una volta legato il loro ligando innescano una cascata di trasduzione del segnale all'interno della cellula, che porta all'attivazione delle caspasi stesse.

Studi precedenti condotti nel nostro laboratorio hanno dimostrato l'effetto proapoptotico sugli osteoclasti da parte dell'estratto di una pianta medicinale: l'*Emblica officinalis*. I risultati di questo studio mettono in luce

il possibile meccanismo d'interferenza dell'estratto della pianta nel ciclo cellulare degli osteoclasti. Infatti è stata riscontrata un'elevata espressione del recettore Fas dopo trattamento con *E. officinalis*. È stata, inoltre, riscontrata una possibile interferenza nel legame del fattore di trascrizione NF- $\kappa$ B (essenziale per lo sviluppo degli osteoclasti) con le sequenze consenso, grazie alla capacità di questo estratto di sequestrare il fattore di trascrizione impedendone il legame al DNA.

Interessati a valutare il grado di apoptosi negli osteoclasti di pazienti affetti da SA, abbiamo trattato le cellule con l'estratto di *E. officinalis*. Comparando i risultati con quelli ottenuti da medesimi esperimenti effettuati su osteoclasti di soggetti sani, si è osservato che gli osteoclasti derivanti da pazienti affetti da SA sono più resistenti all'azione dell'estratto della pianta e vanno incontro ad apoptosi solo ad una concentrazione più elevata (500  $\mu$ g/ml) di estratto. Pertanto, l'ipotesi è che gli osteoclasti dei pazienti affetti da SA possano essere più resistenti ad un eventuale microambiente sfavorevole, come quello causato da un processo flogistico. Anche se alla dose di 500  $\mu$ g/ml l'estratto di *E. officinalis* si è dimostrato efficace nell'indurre l'apoptosi degli Ocs nei pazienti SA, un suo eventuale impiego terapeutico potrà essere in futuro preso in esame solo approfondendo gli effetti che questa dose può avere negli altri tipi di cellule.

L'ultima parte di questa tesi è stata dedicata ad una valutazione preliminare dell'espressione di geni specifici coinvolti nei processi di osteoblasto- e osteoclasto-genesi in globuli bianchi di pazienti SA. Studi

recenti suggeriscono che la crescita anomala di osso nella spondilite anchilosante sia dovuta ad un'incontrollata attivazione dei pathways che governano l'osteoproliferazione, ed in particolare quelli regolati dalle BMPs e dalle Wnt. Di queste due vie di trasduzione del segnale, abbiamo preso in considerazione soprattutto le proteine coinvolte nel pathway del Wnt.

Dai nostri risultati emerge una conferma dell'ipotesi che questa via del segnale possa essere coinvolta nel processo di osteoproliferazione che causa la crescita di sindesmofiti, in quanto uno dei geni principalmente coinvolti (beta-catenina) risulta, a livello di mRNA, maggiormente espresso nelle cellule provenienti da individui affetti da SA rispetto a quelle derivate da soggetti sani (194). A sostegno di questo non è stata trovata espressione di DKK-1, principale antagonista della via. Il pathway regolato dalle Wnt porta all'attivazione di numerosi geni coinvolti nel processo di formazione di osteoblasti, come Runx2 e Slug. I nostri dati nell'espressione di questi geni non mostrano, tuttavia, differenze significative tra pazienti SA e soggetti sani. È doveroso però sottolineare la necessità di ulteriori studi che prendano in esame il livello d'espressione proteico di questi geni, al fine di definire nuovi marcatori molecolari della malattia e un loro possibile utilizzo in una eventuale strategia terapeutica.

Relativamente a geni correlati con il processo di osteoclastogenesi, sono stati misurati i livelli di espressione del fattore di trascrizione NFATc1, associato positivamente con i processi di differenziamento e maturazione degli osteoclasti, e del recettore dell'estrogeno alfa che ha,

invece, un effetto negativo sugli osteoclasti inducendone l'apoptosi. Questa analisi non è stata informativa, in quanto il livello d'espressione di questi due geni non risulta alterato nei pazienti affetti da SA ad eccezione di un singolo campione, che presenta livelli molto elevati di entrambi i geni e per il quale varrà la pena approfondire l'indagine molecolare e clinica.

I dati raccolti in questa tesi anche se preliminari e riferiti ad un numero ristretto di pazienti, tuttavia, insieme ad altri, potranno portare alla scoperta di marcatori cellulari e molecolari specifici della spondilite anchilosante, da utilizzare in futuro come possibili bersagli nello sviluppo di nuove strategie terapeutiche.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Schlosstein L, Terasaki PI, Bluestone R, Pearson CM. High association of an HL-antigen, W27, with ankylosing spondylitis. *N Engl J Med* 1973; 288: 704-6.
2. Brewerton DA, Hart FD, Nicholls A, Caffrey M, James DC, Sturrock RD. Ankylosing spondylitis and HL-A 27. *Lancet* 1973; 1: 904-7.
3. Gorer PA, Gorman OP. The cytotoxic activity of isoantibodies in mice. *Transpl Bull* 1956; 3: 142.
4. Dausset J. Iso-leuco-anticorps. *Acta Haematol* 1958; 20: 156-66.
5. Aho K, Ahvonen P, Lassus A, Sievers K, Tiilikainen A. HL-A 27 and reactive arthritis. *Lancet* 1973; 2: 157.
6. Brewerton DA, Caffrey M, Nicholls A, Walters D, Oates JK, James DC. Reiter's disease and HL-A27. *Lancet* 1973; 302: 996-8.
7. Morris RI, Metzger AI, Bluestone R, Terasaki PI. HL-A-W27. A useful discriminator in the arthropathies of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 1974; 290: 1117-9.
8. Brewerton DA, Caffrey M, Nicholls A, Walters D, James DC. HL-A27 and arthropathies associated with ulcerative colitis and psoriasis. *Lancet* 1974; 1: 956-8.
9. Karvonen J, lassus A, Sievers V, Tiilikainen A. HLA antigens in psoriatic arthritis. *Ann Clin Res* 1974; 6: 304-7.
10. McClusky OE, Lordon RE, Arnett FR Jr. HLA27 in Reiter's syndrome and psoriatic arthritis: a genetic factor in disease susceptibility and expression. *J Rheumatol* 1984; 11: 571.

11. Moll JHM; Haslock I, MacRae IF, Wright V. Association between ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis, Reiter's disease, the intestinal arthropathies, and Behçet's syndrome. *Medicine* 1974; 53: 343-64.
12. Lucherini T, Cervini C. *La spondilite anchilosante*. Roma, EMES, 1955.
13. de Sèze S, Phankim-Chapuis M. Naissance de la pelvi-spondylite rhumatismale. *Rev Prat* 1960; 10: 2785.
14. Lenocho F. Storia della spondiloartrite anchilopoietica di Strümpell-Bechterew-Pierre Marie. *Reumatismo* 1964; 16: 373-5.
15. Strümpell A. *Lehrbuch des speziellen Patologie und Therapie der inneren Krankheiten*. Leipzig, Vogel, 1884; vol II/2, p. 152.
16. Bechterew W. Steifigkeit der Wirbelsäule und ihre Verkrümmung als besondere Erkrankungsform. *Neurol Zbl* 1893; 12: 426 (riprodotto in traduzione inglese su *Clin Orthop* 1979; 143: 4-7).
17. Leden I. Did Bechterew describe the disease which is named after him? A question raised due to centennial of his primary report. *Scand J Rheumatol* 1994; 23: 42-5.
18. Bechterew W. Von der Verwachsung oder Steifigkeit der Wirbelsäule. *Dtsch Z Nervenheilk* 1897; 11: 27.
19. Strümpell A. Bemerkungen über chronischen-ankylosierende Entzündung der Wirbelsäule und der Hüftgelenke. *Dtsch Z Nervenheilk* 1897; 11: 338 (riprodotto in traduzione inglese su *Clin Orthop* 1971; 74: 4-6).

20. Marie P, Astié C. Sur un cas de cyphose hérédo-traumatique. Presse Méd 1897; 5: 205.
21. Marie P. Sur la spondylose rhizomélique. Rev Méd 1898; 18: 285.
22. Bechterew W. Über ankylosirende Entzündung der Wirbelsäule. Dtsch Z Nervenheilk 1899; 15: 37.
23. Leri A. La spondylose rhizomélique. Rev Méd 1899; 19: 597/691/801.
24. Sivén VO. Zur Kenntniss der sogen. Chronisch ankylozierende entzündung der Wirbelsäule. Ztschr Klin Med 1903; 49: 343. Citato da: Bywaters EG. Historical perspectives in the aetiology of ankylosing spondylitis. Br J Dermatol 1983; 22: S2: 1-4.
25. Benoist M. Historical perspectives. Pierre Marie. Pioneer investigator in ankylosing spondylitis. Spine 1995; 20: 849-52.
26. Ascoli V. Contributo allo studio della spondilite rizomelica. Il Policlinico Sez Med 1898; 5: 537.
27. Jayson MIV. Leonard Trask: the wonderful invalid. The first American description of ankylosing spondylitis. Arthritis Rheum 2003; 48: 612-3.
28. Boland EW. Ankylosing spondylitis. In: Comroe's Arthritis and Allied Conditions. Philadelphia, Lea & Febifger, 1949.
29. O'Connell D. Ankylosing spondylitis. The literature up to the close of the nineteenth century. Ann Rheum Dis 1956; 15: 119-23.
30. Eknoyan G, de Santo NG. Realdo Colombo (1516-155). A reappraisal. Am J Nephrol 1997; 17: 261-8.

31. Kahn MF, Beraneck L, Daudin M. Les rhumatismes dans la littérature française non médicale. *Rév Rhum Mal Osteoartic* 1987; 54: 583-7.
32. Pugh MT. Bernard Connor (1666-1698). *Rheumatology* 2002; 41: 942-3.
33. Lyons PM. Remarkable case of rapid ossification of the fibrocartilagineous tissues, or pure general ankylosis. *Lancet* 1831; 1: 27.
34. Glaser F. Beitrag zur Lehre von der chronisch ankylosirenden Entzündung der Wirbelsäule. *Mittelheilungen aus den Grenzgeb. Der medicin u. Chirurgie*. VIII, 1901.
35. Kunz E, Kraupa E. Zur Kenntniss der metastatischen Iritis bei Spondyloarthritis ankylopoietica. *Klin Monatsbl f Augenh* 1935; 95: 486.
36. Bernstein L, Broch OL. Cardiac complications in spondylarthritis ankylopoietica. *Acta Med Scand* 1949; 135: 185.
37. Segal J, Harvey WP, Hufnagel C. A clinical study of one hundred cases of severe aortic insufficiency. *Am J Med* 1956; 21: 200-10.
38. Glasser O. Wilhelm Conrad Röntgen and the early history of the Roentgen rays. 2<sup>nd</sup> Edit, Novato, CA, USA, Norman Publishing, 1993.
39. Krebs W. Zur Frage der sogenannten rheumatischen Erkrankungen der Wirbelsäule. *Dtsch Med Wschr* 1930; 1: 220/270.

40. Fraenkel E. Über chronische ankylosierende Wirbelsäulenversteifung. Fortschr Geb Roentgenstr 1904; 7: 62. Citato da: Buckley EW. Spondylitis deformans. Br Med J 1931, 1: 1108-26.
41. Valentini. Beitrag zur chronische, ankylosierenden Entzündung der Wirbelsäule und der Hüftgelenke. Dtsch Zeitschr Nervenheilk 1899; 15. Citato da: Neurologisches Centralblatt (Mendel E, ed), Leipzig, Veit, 1900, p.326.
42. Romanus R, Yden S. Pelvispondylitis ossificans. Rheumatoid or ankylosing spondylitis. Copenhagen, Munksgaard, 1955.
43. Sicard JA, Forestier J. Méthode radiographique d'exploration de la cavité épidurale par la Lipiodol. Rév Neurol 1921; 28: 1264.
44. Palés L. Paléopathologie et pathologie comparative. Paris, Masson, 1930.
45. Dastague J, Gervais V. Paléopathologie du Squelette Humaine, Paris, Boubée, 1992.
46. Ruffer MA. Arthritis deformans and spondylitis in ancient Egypt. J Pathol Bacteriol 1918; 22: 192.
47. Zorab PA. The historical and prehistorical background of ankylosing spondylitis. Proc R Soc Med 1961; 54: 415-20.
48. Morel P. Delmetz JL. Pathologie osseuse du Haut Moyen-Age. Contribution aux problèmes des Burgundes. Paris, Masson, 1961.
49. Rogers J, Watt I, Dieppe PA. Arthritis in Saxons and medioeval skeletons. Br Med J 1981; 283: 1668.

50. Martínez-Lavín M, Mansilla J, Pineda C, Pijoán C. Ankylosing spondylitis in indigenous to Mesoamerica: J Rheumatol 1995; 22: 2327-30.
51. Bloom RA, Smith P. On the antiquity of the seronegative spondyloarthropathies: evidence from ancient Judea. Skeletal radiol 1992; 21: 111-4.
52. Rogers J, Watt I, Dieppe PA, Paleopathology of spinal osteophytosis, vertebral ankylosis, ankylosing spondylitis,, and vertebral hyperostosis. Ann Rheum Dis 1985; 44: 113-20.
53. Feldtkeller E, Lemmel EM, Russell AS. Ankylosing spondylitis in the pharaohs of ancient Egypt. Rheumatol Int 2003; 23: 1-5.
54. Appelboom T, Russell A. Moses: did he inherit the spondyloarthritis of the Pharaohs? Arthritis Care Res 2003; 49: 142-3.
55. Costa A, Weber G. Le alterazioni morbose del sistema scheletrico in Cosimo dei Medici il Vecchio, in Piero il gottoso, in Lorenzo il Magnifico, in Giuliano duca di Nemours. Arch De Vecchi Anat Pat 1955; 23: 1-69.
56. Pizon P. La pathologie osteo-articulaire de quatre Medicis. Presse Méd 1956; 64: 1483-4.
57. Quagliata FF, Zini L. Hyperuricemia and intelligence through the genes of the greatest Florentine family: the Medici of Cafaggiolo. Clin Rheumatol 1986; 8: 283.
58. Espinel CH. Michelangelo' s gout in a fresco by Raphael. Lancet 2000; 355: 2149.

59. Léca AP. Histoire illustrée de la Rhumatologie. Paris, Dacosta 1987.
60. Carcassi U. I medici di Cafaggiolo: genio e sregolatezza. *Reumatismo* 2003; 55 (Suppl 5) 212.
61. Vezyroglou G, Mitropoulos A, Antoniadis C. A metabolic syndrome in diffuse idiopathic skeletal hyperostosis. A controlled study. *J Rheumatol* 1996; 23: 672-6.
62. Trnavsky K, Sabota L. Karel Capek – czech writer, sufferer from ankylosing spondylitis. *Clin Rheumatol* 1992; 11: 337-40.
63. Khan MA. My self-portrait. *Clin Rheumatol* 2001; 20: 1-2.
64. Dougados M, Baeten D. Spondyloarthritis. *Lancet*, 2011; 377: 2127-37.
65. Kellgren JH, Jeffrey MR, Ball J, eds. The epidemiology of chronic rheumatism, vol. 1. Oxford: Blackwell; 1963: 326.
66. Bennett PM, Wood PHN. In: Bennett PM, Wood PHN, eds. Population studies of the rheumatic diseases. Amsterdam International Congress Series No. 148. Amsterdam: Excerpta Medica Foundation; 1966: 456.
67. Van der Linden S, Valkenburgh HA, Cats A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria. *Arthritis Rheum* 1984; 27: 361-8.
68. Rudwaleit M, van der Heijde D, Landewé R, Listing J, Akkoc N, Brandt J, Braun J, Chou CT, Collantes-Estevez E, Dougados M, Huang F, Gu J, Khan MA, Kirazli Y, Maksymowych WP, Mielants

- H, Sørensen IJ, Ozgocmen S, Roussou E, Valle-Onate R, Weber U, Wei J, Sieper J. *Ann Rheum Dis* 2009; 68: 777-83.
69. Lopez de Castro JA. The HLA peptidome: building on the cornerstone. *Arthritis Rheum* 2010, 62: 316-9.
70. Taurog JD. The mystery of HLA-B27: if it isn't one thing, it's another. *Arthritis Rheum* 2007; 56: 2478-81.
71. De Langhe E, Lories R, Maenaut K, De Vlam K. The kaleidoscopic presentation of the spondyloarthritis concept in a female patient. *Joint Bone Psine* 2011; 78: 638-40.
72. Olivieri I, Salvarani C, Cantini F, Ciancio G, Padula A. Ankylosing spondylitis and undifferentiated spondyloarthropathies: a clinical review and description of a disease subset with older age at onset. *Curr Op Rheumatol* 2001; 13: 280-4.
73. Ramos M, Alvarez I, Sesma L, Logean A, Rognan D, Lopez de Castro JA. Molecular mimicry of an HLA-B27-derived ligand of arthritis-linked subtypes with chlamydial proteins. *J Biol Chem* 2002; 277: 37573-81.
74. Brown MA, Laval SH, Brophy S, Calin A. Recurrence risk modelling of the genetic susceptibility to ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2000; 59: 883-6.
75. Hermann E, Yu DT, Meyer zum Büschenfelde KH, Fleischer B. HLA-B27-restricted CD8 T cells derived from synovial fluids of patients with reactive arthritis and ankylosing spondylitis. *Lancet* 1993; 342: 646-50.

76. Atanguduz P, Appel H, Kuon W, Wu P, Thiel A, Kloetzel PM, Sieper J. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 892-901.
77. May E, Dorris ML, Satumtira N, Iqbal I, Rehman MI, Lightfoot E, Taurog JD. CD8 alpha beta T cells are not essential to the pathogenesis of arthritis or colitis in HLA-B27 transgenic rats. *J Immunol* 2003; 170: 1099-105.
78. Taurig JD, Dorris ML, Satumtira N, Tran TM, Sharma R, Dressel R, van der Brandt J, Reichardt HM. Spondylarthritis in HLA-B27/human beta2-microglobulin-transgenic rats is not prevented by lack of CD8. *Arthritis Rheum* 2009; 60: 1977-84.
79. Kollnberger S, Bird LA, Roddis M, Hacquard-Bouder C, Kubagawa H, Bodmer HC, Breban M, McMichael AJ, Bowness P. HLA-B27 heavy chain homodimers are expressed in HLA-B27 transgenic rodent models of spondyloarthritis and are ligands for paired Ig-like receptors. *J Immunol* 2004; 173: 1699-710.
80. Chan AT, Kollnberger SD, Wedderburn LR, Bowness P. Expansion and enhanced survival of natural killer cells expressing the killer immunoglobulin-like receptor KIR3DL2 in spondylarthritis. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 3586-95.
81. Mear JP, Schreiber KL, Münz C, Zhu X, Stevanovic S, Rammensee HG, Rowland-Jones SL, Colbert RA. Misfolding of HLA-B27 as a result of its B pocket suggests a novel mechanism for its role in susceptibility to spondyloarthropathies. *J Immunol* 1999; 163: 6665-70.

82. Dangoria NS, DeLay ML, Kingsbury DJ, Mear JP, Uchanska-Ziegler B, Ziegler A, Colbert RA. HLA-B27 misfolding is associated with aberrant intermolecular disulfide bond formation (dimerization) in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 2002; 277: 23459-68.
83. Turner MJ, Sowders DP, DeLay ML, Mohapatra R, Bai S, Smith JA, Brandewie JR, Taurog JD, Colbert RA. HLA-B27 misfolding in transgenic rats is associated with activation of the unfolded protein response. *J Immunol* 2005; 175: 2438-48.
84. Smith JA, Turner MJ, DeLay ML, Klenk EI, Sowders DP, Colbert RA. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response are linked to synergistic IFN-beta induction via X-box binding protein1. *Eur J Immunol* 2008; 38: 1194-203.
85. DeLay ML, Turner MJ, Klenk EI, Smith JA, Sowders DP, Colbert RA. HLA-B27 misfolding and the unfolded protein response augment interleukin-23 production and are associated with Th17 activation in transgenic rats. *Arthritis Rheum* 2009; 60: 2633-43.
86. Resnick D, Niwayama G. Ankylosing spondylitis. In: Resnick D: *Bone and joint imaging*. WB Saunders Co. Philadelphia, 1989, cap 24, pag 299-319.
87. Bluestone HG. Anatomic and genetic considerations in the pathogenesis of ankylosing spondylitis. *J Rheumatol* 1988; 15 (Suppl 16): 29-30.
88. Dihlmann W. Kritik der Sacroillitis Stadieneinteilung (grading-staging) bei Spondylitis Ankylosana. *Z Rheumatol* 1983; 42: 49-57.

89. Brower AC. Spondyloarthropathies. Imaging. In: Klippel JH, DieppePA, eds. Rheumatology, Mosby Ed, St. Louis, 1994, cap 6, pag 1-8.
90. Mens JMA. Correlation of joint involvement in rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis with the synovia: cartilagineous surface ratioof varoiious joints. Arthritis Rheum 1987; 30: 359-60.
91. Resnick D. Osteophytes, syndesmophytes and other "sights". Postgr Radiology 1981; 1: 217-32.
92. Khan MA. Newer clinical and radiographic features of seronegative spondyloarthropathies. Curr Opin Rheumatol 1989; 1: 139-43.
93. Scutellari PN, Orzincolo C. Imaging dell'anca reumatica. Radiol Med 1993; 86: 456-66.
94. El-Khoury GY, Larson RK, Kathol MH, Berbaum KS, Furst DE. Seronegative and seropositive rheumatoid arthritis: radiographic differences. Radiology 1988; 168: 517-20.
95. Derris-Labous E, Messow M, Dougados M. Assessment of fatigue in the management of patients with ankylosing spondylitis. Rheumatology 2003; 42: 1523-8.
96. Braun J, Pincus T. Mortality, course of disease and prognosis of patients with ankylosing spondylitis. Clin Exp Rheumatol 2002; 20 (Suppl 28): S16-S22.
97. Kiss S, Letzko E, Qamruddin S, Baltatzis S, Foster CS. Long-term progression, prognosis, and treatment of patients with recurrent ocular manifestations of Reiter's syndrome. Ophthalmology 2003; 110: 1764-9.

98. Peters MJ, van der Horst-Bruinsma E, Dijkmans BA, Nurmohamed MT. Cardiovascular risk profile of patients with spondyloarthropathies, particularly ankylosing spondylitis and psoriatic arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 2004; 34: 585-92.
99. Feltelius N, Ekbom A, Blomqvist P. Cancer incidence among patients with ankylosing spondylitis in Sweden 1965-95: a population based cohort study. *Ann Rheum Dis* 2003; 62: 1185-8.
100. Shibata A, Zhao S, Makuch RW. Lymphoma risk in ankylosing spondylitis is greater than that observed in the general population. *Ann Rheum Dis* 2004; 63 (Suppl I): 98.
101. Monnet D, Breban M, Hudry C, Dougados M, Brézin AP. Ophthalmic findings and frequency of extraocular manifestations in patients with HLA-B27 uveitis: a study of 175 cases. *Ophthalmology* 2004; 111: 802-9.
102. Martin TM, Zhang G, Luo J, Jin L, Doyle TM, Rajska BM, Coffman JE, Smith JR, Becker MD, Mackensen F, Khan MA, Levinson RD, Schumacher HR, Wade NK, Rosenbaum JT, Reveille JD. A locus on chromosome 9p predisposes to a specific disease manifestation, acute anterior uveitis, in ankylosing spondylitis, a genetically complex, multisystem, inflammatory disease. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 269-74.
103. Durrani K, Foster CS. Psoriatic uveitis: a distinct clinical entity? *Am J Ophthalmol* 2005; 139: 106-11.

104. Lyons JL, Rosenbaum JT. Uveitis associated with inflammatory bowel disease compared uveitis associated with spondyloarthropathy. *Arch Ophthalmol* 1997; 115: 61-4.
105. Paiva E, Macaluso D, Edwards A, Rosenbaum JT. Characterisation of uveitis in patients with psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis* 2000; 59: 67-70.
106. Bergfeldt L. HLA-B27-associated cardiac disease. *Ann Intern Med* 1997; 127: 621-9.
107. Roldan C, Chavez J, Wiest P, Qualls CR, Crawford MH. Aortic root disease and valve disease associated with ankylosing spondylitis. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32: 1397-404.
108. Bergfeldt L, Insulander P, Lindblom D, Möller E, Edhag O. HLA-B27: an important genetic risk factor for lone aortic regurgitation and severe conduction system abnormalities. *Am J Med* 1988; 85: 12-8.
109. Hamilton KA. Pulmonary disease manifestations of ankylosing spondylitis. *Ann Intern Med* 1949; 31: 216-27.
110. El Maghraoui A. Osteoporosis and ankylosing spondylitis. *Joint Bone Spine* 2004; 71: 291-5.
111. Toussirot E, Wendling D. Bone mass in ankylosing spondylitis. *Clin Exp Rheumatol* 2000; 18 (Suppl 21): S16-S20.
112. Wendling D, Hory B, Saint-Hillier Y, Perol C. Rein et spondylarthrite ankylosante. *Rev Rhum* 1985; 52: 271-5.

113. Strobel ES, Fritschka E. Renal diseases in ankylosing spondylitis: review of the literature illustrated by case reports. *Clin Rheumatol* 1988; 17: 524-30.
114. Holden W, Orchard T, Wordsworth P. Enteropathic arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 2003; 29: 513-30.
115. Appel B, Kuhne M, Spiekermann S, Ebhart H, Grozdanovic Z, Köhler D, Dreimann M, Hempfing A, Rudwaleit M, Stein H, Metz-Stavenhagen P, sieper J, Loddenkepper C. Immunohistologic analysis of zygapophyseal joints in patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 2845-51.
116. Appel B, Kuhne M, Spiekermann S, Köhler D, Zacher J, Stein H, Sieper J, Loddenkepper C. Immunohistochemical analysis of hip arthritis in ankylosing spondylitis: evaluation of the bone-cartilage interface and subchondral bone marrow. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 1805-13.
117. Fraçois RJ, Neure L, Sieper J, Braun J. Immunohistological examination of open sacroiliac biopsies of patients with ankylosing spondylitis: detection of tumor necrosis factor alpha in two patients with early disease and tranforming growth factor beta in three more advanced cases. *Ann Rheum Dis* 2006; 65: 713-20.
118. McGonagle D, Gibbon W, Emery P. Classification of inflammatory arthritis by enthesitis. *Lancet* 1998; 352: 1137-40.
119. Bollow M, Fischer T, Reissbauer H, Backhaus M, Sieper J, Hamm B, Braun J. Quantitative analyses of sacroiliac biopsies in spondyloarthropathies: T cells and macrophages predominate in

- early and active sacroiliitis-cellularity correlates with the degree of enhancement detected by magnetic resonance imaging. *Ann Rheum Dis* 2000; 59: 135-40.
120. Braun J, Bollow M, Neure L, Seipelt E, Seyrekbasan F, Herbst H, Eggens U, Distler A, Sieper J. Use of immunohistologic and in situ hybridization techniques in the examination of sacroiliac joint biopsy specimens from patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 499-505.
  121. Poole AR. The histopathology of ankylosing spondylitis: are there unifying hypotheses? *Am J Med Sci* 1998; 316: 228-33.
  122. Maksymowych WP. Ankylosing spondylitis-at the interface of bone and cartilage. *J Rheumatol* 2010; 6: 2295-301.
  123. Bardos T, Szabó Z, Czipri M, Vermes C, Tunyogi-Csapo M, Urban RM, MiKecz K, Glant TT. A longitudinal study of an autoimmune murine model of ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2000; 64: 981-7.
  124. Zou J, Zhang Y, Thiel A, Rudwaleit M, Shi SL, Radbruch A, Poole R, Braun J, Sieper J. Predominant cellular immune response to the cartilage autoantigenic G1 aggrecan in ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2003; 42: 846-55.
  125. Zou J, Appel H, Rudwaleit M, Thiel A, Sieper J. Analysis of the CD8+ T cell response to the G1 domain of aggrecan in ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2005; 64: 722-9.
  126. Atagunduz P, Appel H, Kuon W, Wu P, Thiel A, Kloetzel PM, Sieper J. HLA-B27-restricted CD8+ T cell response to cartilage-derived

- self peptides in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 892-901.
127. Maksymowych WP. Disease modifications in ankylosing spondylitis. *Nature Rev Rheumatol* 2010; 6: 75-81.
128. McGonagle D, Wakefield RJ, Tan AL, D'Agostino MA, Toumi H, Hayashi K, Emery P, Benjamin M. Distinct topography of erosion and new bone formation in achilles tendon enthesitis: implications for understanding the link between inflammation and bone formation in spondylarthritis. *Arthritis Rheum* 2008; 58: 2694-9.
129. Neidhart M, Baraliakos X, Seemayer C, Zelder C, Gay RE, Michel BA, Boehm H, Gay S, Braun J. Expression of cathepsin K and matrix metalloproteinase 1 indicate persistent osteodestructive activity in long-standing ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2009; 68: 1334-9.
130. Goldring SR. Pathogenesis of bone and cartilage destruction in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2003; 42 (Suppl 2): ii11-ii16.
131. Schett G. Erosive arthritis. *Arthritis Res Ther* 2007; 9 (Suppl 1): S2.
132. Teitelbaum SL. Osteoclasts: what do they do and how do they do it? *Am J Pathol* 2007; 170: 427-35.
133. Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T, Tanaka H, Sasaki T, Nishihara T, Koga T, Martin TJ, Suda T. Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cell. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 7260-4.

134. Johnson ML, Kamel MA. The Wnt signaling pathway and bone metabolism. *Curr Opin Rheumatol* 2007; 19: 376-84.
135. Kotake S, Udagawa N, Talahshi N, Matsuzaki K, Itoh K, Ishiyama S, Saito S, Inoue K, Kamatani N, Gillespie MT, Martin TJ, Suda T. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J Clin Invest* 1999; 103: 1345-52.
136. Lam J, Takeshita S, Barker JE, Kanagawa O, Ross FP, Teitelbaum SL. TNF-alpha induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand. *J Clin Invest* 2000; 106: 1481-8.
137. Wei S, Kitaura H, Zhou P, Ross FP, Teitelbaum SL. IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis. *J Clin Invest* 2005; 115: 282-90.
138. Wong PK, Quinn JM, Sims NA, van Nieuwenhuijze A, Campbell IK, Wicks IP. Interleukin-6 modulates production of T lymphocyte-derived cytokines in antigen-induced arthritis and drives inflammation-induced osteoclastogenesis. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 158-68.
139. Braun J, Bollow M, Neure L, Seipelt E, Seyrekbasan F, Herbst H, Eggens U, Distler A, Sieper J. Use of immunohistologic and in situ hybridization techniques in the examination of sacroiliac joint biopsy specimens from patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 499-505.
140. Diarra D, Stolina M, Polzer K, Zwerina J, Ominsky MS, Dwyer D, Korb A, Smolen J, Hoffman M, Scheinecker C, van der Heijde D,

- Landewé R, Lacey D, Richards WG, Schett G. Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat Med* 2007; 13: 156-63.
141. Miossec P. Interleukin-17 in rheumatoid arthritis: if T cells were to contribute inflammation and destruction through synergy. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 594-601.
142. Sato K, Suematsu A, Okamoto K, Yamaguchi A, Morishita Y, Kadono Y, Tanaka S, Kodama T, Akira S, Iwakura S, Cua DJ, Takayanagi H. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med* 2006; 203: 2673-82.
143. Smolen JS, Han C, van der Heijde D, Emery P, Bathon JM, Keystone E, Maini RN, Kalden JR, Aletaha D, Baker D, Han J, Bala M, St Clair EW. Radiographic changes in rheumatoid arthritis patients attaining different disease activity states with methotrexate monotherapy and infliximab plus methotrexate: the impacts of remission and tumour necrosis factor blockade. *Ann Rheum Dis* 2009; 68: 823-7.
144. van der Heijde D, Landewé R, Einstein S, Ory P, Vosse D, Ni L, Lin SL, Tsuji W, Davis JC Jr. Radiographic progression of ankylosing spondylitis after up to two years of treatment with etanercept. *Arthritis Rheum* 2008; 58: 1324-31.
145. van der Heijde D, Landewé R, Baraliakos X, Houben H, van Tubergen A, Williamson P, Xu W, baker D, Goldstein N, Braun J. Radiographic findings following two years of infliximab therapy in

- patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 2008; 58: 3063-70.
146. van der Heijde D, Salonen D, Weissman BN, Landewé R, Maksymowych WP, Kupper H, Ballal S, Gibson E, Wong R. Assessment of radiographic progression in the spines of patients with ankylosing spondylitis treated with adalimumab for up to 2 years. *Arthritis Res Ther* 2009; 11: R127.
  147. Tam LS, Gu J, Yu D. Pathogenesis of ankylosing spondylitis. *Nat Rev Rheumatol* 2010; 6: 399-405.
  148. Schett G, Rudwaleit M. can we stop progression of ankylosing spondylitis? *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2010; 24: 363-71.
  149. Gartner LP, Hiatt JL. *Istologia Edises*, 2°Edizione.
  150. Lories RJ, Luyten FP, de Vlam K. Progress in spondylarthritis. Mechanisms of new bone formation in spondyloarthritis. *Arthritis Res Ther* 2009; 11: 221.
  151. Massagué J. How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000; 1: 169-78.
  152. Miyazono AR, Mardjuadi A, Kunmartini S, Suryadhana NG, Setyohadi B, Sudarsono D, Lardy NM, Feltkamp TE. HLA-B27 subtypes positively and negatively associated with spondyloarthropathy. *J Rheumatol* 1997; 24: 1111-4.
  153. Winkler DG, Yu C, Geoghegan JC, Ojala EW, Skonier JE, Shpektor D, Sutherland MK, Latham JA. Noggin and sclerostin bone morphogenetic protein antagonists form a mutually inhibitory complex. *J Biol Chem* 2004; 279: 36293-8.

154. van Beezouij RL, Roelen BA, Visser A, van der Wee-Pals L, de Wilt E, Karperien M, Hamersma H, Papapoulos SE, ten Dijke P, Löwik CW. Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. *J Exp Med* 2004; 199: 805-14.
155. Steiling H, Wüstefeld T, Bugnon P, Brauchle M, Fässler R, Teupser D, Thiery J, Gordon JI, Trautwein C, Werner S. Fibroblast growth factor receptor signalling is crucial for liver homeostasis and regeneration. *Oncogene* 2003; 22: 4380-8.
156. Reddi AH. Cartilage morphogenetic proteins: role in joint development, homeostasis, and regeneration. *Ann Rheum Dis* 2003; 62 (Suppl 2): ii73-ii78.
157. Lories RJ, Derese I, Luyten FP. Modulation of bone morphogenetic protein signaling inhibits the onset and progression of ankylosing enthesitis. *J Clin Invest* 2005; 115: 1571-9.
158. Fowler MJ Jr, Neff MS, Borghaei RC, Pease EA, Mochan E, Thornton RD. Induction of bone morphogenetic protein-2 by interleukin-1 in human fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 248: 450-3.
159. Lories RJ, Derese I, Ceuppens JL, Luyten FP. Bone morphogenetic proteins 2 and 6, expressed in arthritic synovium, are regulated by proinflammatory cytokines and differentially modulate fibroblast-like synoviocyte apoptosis. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 2807-18.

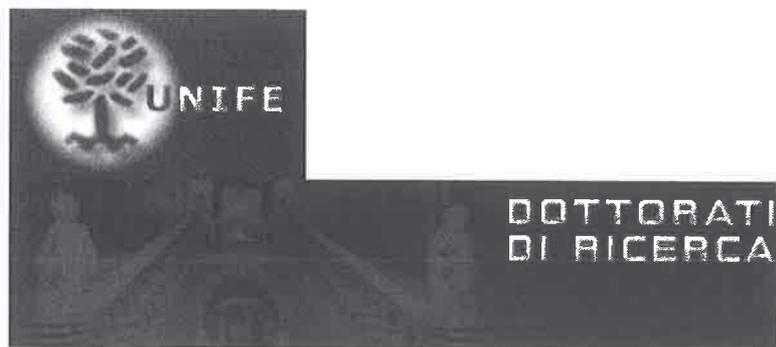
160. Fukui N, Zhu Y, Maloney WJ, Clohisy J, Sandell LJ. Stimulation of BMP-2 expression by pro-inflammatory cytokines IL-1 and TNF-alpha in normal and osteoarthritic chondrocytes. *J Bone Joint Surg Am* 2003; 85 (Suppl 3): 59-66.
161. Schett G, Zwerina J, David JP. The role of Wnt proteins in arthritis: *Nat Clin Pract Rheumatol* 2008; 4: 473-80.
162. Li X, Liu P, Liu W, Maye P, Zhang J, Zhang Y, Hurley M, Guo C, Boskey A, Sun L, Harris SE, Rowe DW, Ke HZ, Wu D. Dkk2 has a role in terminal osteoblast differentiation and mineralized matrix formation. *Nat Genet* 2005; 37: 945-52.
163. Li X, Zhang Y, Kang H, Liu W, Liu P, Zhang J, Harris SE, Wu D. Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *J Biol Chem* 2005; 280: 19883-7.
164. Roux S, Orcel P. Bone loss. Factors that regulate osteoclast differentiation: an update. *Arthritis res* 2000; 2: 451-6.
165. Uderhardt S, Diarra D, Katzenbeisser J, David JP, Zwerina J, Richards W, Kronke G, Schett G. Blockade of Dickkopf (DKK)-1 induces fusion of sacroiliac joints. *Ann Rheum Dis* 2010; 69: 592-7.
166. Daoussis D, Lioussis SN, Solomou EE, Tsanaktsi A, Bounia K, Karampetsou M, Yiannopoulos G, Andonopoulos AP. Evidence that Dkk-1 is dysfunctional in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 2010; 62: 150-8.
167. Appel H, Ruiz-Heiland G, Listing J, Zwerina J, Herrmann M, Mueller R, Haibel H, Baraliakos X, Hempfing A, Rudwaleit M, Sieper J, Schett G. Altered skeletal expression of sclerostin and its

- link to radiographic progression in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 2009; 60: 3257-62.
168. Semënov M, Tamai K, He X. SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor. *J Biol Chem* 2005; 280: 26770-5.
  169. Semënov M, He X. LRP5 mutations linked to high bone mass diseases cause reduced LRP5 binding and inhibition by SOST. *J Biol Chem* 2006; 281: 38276-84.
  170. Lories RJ, Derese I, de Bari C, Luyten FP. Evidence for uncoupling of inflammation and joint remodelling in a mouse model of spondylarthritis. *Arthritis Rheum* 2007; 56: 489-97.
  171. Lambert RGW, Pedersen RJ, Maksymowych WP, Chiowchanwisawakit P, Ostergaard M. Active inflammatory lesions detected by magnetic resonance imaging in the spine of patients with spondyloarthritis – definitions, assessment system, and reference image set. *J Rheumatol* 2009; 36: S3-17.
  172. Chiowchanwisawakit P, Lambert RGW, Conner-Spady B, Maksymowych WP. Focal fat lesions at vertebral corners on magnetic resonance imaging predict the development of new syndesmophytes in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 2011; 63: 2215-25.
  173. Khan MT, Lampronti I, Martello D, Bianchi N, Jabbar S, Chouduri MS, Datta BK, Gambari R. Identification of pyrogallol as an antiproliferative compound present in extracts from the medical plant *Emblica officinalis*: effects on in vitro cell growth of human tumor cell lines. *Int J Oncol* 2002; 21: 187-92.

174. Asmawi MZ, Kankaanranta H, Moilanen E, Vapaatalo H. Anti-inflammatory activities of *Embllica officinalis* leaf extracts. *J Pharm Pharmacol* 1993; 45: 581-4.
175. Scartezzini P, Speroni E. Review on some plants of Indian traditional medicine with antioxidant activity. *J Ethnopharmacol* 2000; 71: 23-43.
176. Penolazzi L, Lampronti I, Borgatti M, Khan MT, Zennaro M, Piva R, Gambari R. Induction of apoptosis of human primary osteoclasts treated with extracts from the medical plant *Embllica officinalis*. *BMMC Complement Altern Med* 2008; 8: 59.
177. Kotake S, Udagawa N, Takahashi N, Matsuzaki K, Itoh K, Ishiyama S, Sato S, Inoue K, Kamatani M; Gillespie MT, Martin TJ, Suda T. IL-17 in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J Clin Invest* 1999; 103: 1345-52.
178. Lam J, Takesita S, Barker JE, Kanagawa O, Ross FP, Teitelbaum SL. TNF- $\alpha$  induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand. *J Clin Invest* 2000; 106: 1481-8.
179. Wei S, Kitaura H, Zhou P, Ross FP, Teitelbaum SL. IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis. *J Clin Invest* 2005; 115: 282-90.
180. Wong PK, Quinn JM, Sims NA, van Nieuwenhuijze A, Campbell IK, Wicks IP. Interleukin-6 modulates production of T lymphocyte-derived cytokines in antigen-induced arthritis and drives

- inflammation-induced osteoclastogenesis. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 158-68.
181. Im CH, Kang EH, Ki JY, Shin DW, Choi HJ, Chang EJ, Lee EJ, Lee YJ, Lee EB, Kim HH, Song YW. Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand-mediated osteoclastogenesis is elevated in ankylosing spondylitis. *Clin Exp Rheumatol* 2009; 27: 620-25.
182. Karsenty G, Wagner EF. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev cell* 2002; 2: 389-406.
183. Komori T. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J Cell Biochem* 2006; 99: 1233-9.
184. Asagiri M, Takayanagi H. The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone* 2007; 40: 251-64.
185. Koga T, Matsui Y, Asagiri M, Kodama T, de Crombrugge B, Nakashima K, Takayanagi H. NFAT and Osterix cooperatively regulate bone formation. *Nat Med* 2005; 11: 880-5.
186. Jessop HL, Suswillo RF, Rawlinson SC, Zaman G, Lee K, Das-Gupta V, Pitsillides AA, Lanyon LE. Osteoblast-like cells from estrogen receptor alpha knockout mice have deficient responses to mechanical strain. *J Bone Miner Res* 2004; 19: 938-46.
187. Stossi F, Barnett DH, Frasor J, Komm B, Lyttle CR, Katzenellenbogen BS. Transcriptional profiling of estrogen-regulated gene expression via estrogen receptor (ER) alpha or ERbeta in human osteosarcoma cells: distinct and common target genes for these receptors. *Endocrinology* 2004; 145: 3473-86.

188. McCarthy TL, Chang WZ, Liu Y, Centrella M. Runx2 integrates estrogen activity in osteoblasts. *J Biol Chem* 2003; 278: 43121-9.
189. Li L, Li Z, Sachs DB. The transcriptional activity of estrogen receptor-alpha is dependant on Ca<sup>2+</sup>/calmodulin. *J Biol Chem* 2005; 280: 13097-104.
190. Lambertini E, Lisignoli G, Torreggiani E, manferdini C, Gabusi E, Franceschetti T, Penolazzi L, Gambari R, Facchini A, Piva R. Slug gene expression supports human osteoblast maturation. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66: 3641-53.
191. Gaur T, Lengner CJ, Hovhannisyan H, Bhat RA, Bodine PV, Komm BS, Javed A, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Lian JB. Canonical Wnt signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *J Biol Chem* 2005; 280: 33132-40.
192. Wu X, McKenna MA, Feng X, Nagy TR, McDonald JM. Osteoclast apoptosis: the role of FAS in vivo and in vitro. *Endocrinology* 2003; 144: 5545-55.
193. Colina M, Torreggiani E, Lambertini E, Penolazzi L, Ciancio G, Vecchiatini R, Trotta F, Govoni M, Piva R. In: Annual European Congress of Rheumatology (EULAR), London, May 25-28, 2011, Supplement 3, p 337.



Il tuo indirizzo e-mail

matteo.colina@gmail.com

Oggetto:

Dichiarazione di conformità della tesi di dottorato

Io sottoscritto Dott. (Cognome e Nome)

Colina Matteo

Nato a:

Bologna

Provincia:

Bologna

Il giorno:

22/02/1977

Avendo frequentato il Dottorato di Ricerca in:

Farmacologia ed Oncologia Molecolare

Ciclo di Dottorato

24

Titolo della tesi (in lingua italiana):

Analisi di nuovi marcatori cellulari e molecolari per la spondilite anchilosante

Titolo della tesi (in lingua inglese):

Tutore: Prof. (Cognome e Nome)

Govoni Marcello

Settore Scientifico Disciplinare (S.S.D.)

Parole chiave della tesi (max 10):

Spondilite anchilosante, osteoclasti

Consapevole, dichiara

**CONSAPEVOLE:** (1) del fatto che in caso di dichiarazioni mendaci, oltre alle sanzioni previste dal codice penale e dalle Leggi speciali per l'ipotesi di falsità in atti ed uso di atti falsi, decade fin dall'inizio e senza necessità di alcuna formalità dai benefici conseguenti al provvedimento emanato sulla base di tali dichiarazioni; (2) dell'obbligo per l'Università di provvedere al deposito di legge delle tesi di dottorato al fine di assicurarne la conservazione e la consultabilità da parte di terzi; (3) della procedura adottata dall'Università di Ferrara ove si richiede che la tesi sia consegnata dal dottorando in 4 copie di cui una in formato cartaceo e tre in formato pdf, non modificabile su idonei supporti (CD-ROM, DVD) secondo le istruzioni pubblicate sul sito : <http://www.unife.it/studenti/dottorato> alla voce **ESAME FINALE** – disposizioni e modulistica; (4) del fatto che l'Università sulla base dei dati forniti, archiverà e renderà consultabile in rete il testo completo della tesi di dottorato di cui alla presente dichiarazione attraverso l'Archivio istituzionale ad accesso aperto "EPRINTS.unife.it" oltre che attraverso i Cataloghi delle Biblioteche Nazionali Centrali di Roma e Firenze. **DICHIARO SOTTO LA MIA**

**RESPONSABILITA':** (1) che la copia della tesi depositata presso l'Università di Ferrara in formato cartaceo, è del tutto identica a quelle presentate in formato elettronico (CD-ROM, DVD), a quelle da inviare ai Commissari di esame finale e alla copia che produrrà in seduta d'esame finale. Di conseguenza va esclusa qualsiasi responsabilità dell'Ateneo stesso per quanto riguarda eventuali errori, imprecisioni o omissioni nei contenuti della tesi; (2) di prendere atto che la tesi in formato cartaceo è

l'unica alla quale farà riferimento l'Università per rilasciare, a mia richiesta, la dichiarazione di conformità di eventuali copie. **PER ACCETTAZIONE DI QUANTO SOPRA RIPORTATO**

Dichiarazione per embargo

36 mesi

Richiesta motivata embargo

1. Tesi in corso di pubblicazione

Liberatoria consultazione dati Eprints

Consapevole del fatto che attraverso l'Archivio istituzionale ad accesso aperto "EPRINTS.unife.it" saranno comunque accessibili i metadati relativi alla tesi (titolo, autore, abstract, ecc.)

Firma del dottorando

Ferrara, li 15.01.2012 (data) Firma del Dottorando

Firma del Tutore

Visto: Il Tutore Si approva Firma del Tutore