

INDICE

INTRODUZIONE	pag. 4
Spondiloartropatie (SpA)	pag. 4
- Generalità	pag. 4
- Epidemiologia	pag. 6
- Patogenesi	pag. 7
Associazione genetica con l'HLA-B27	pag. 11
- Suscettibilità alla malattia nei pazienti HLA-B27 positivi	pag. 12
- Teorie sul ruolo delle molecole HLA-B27 nella patogenesi della SpA	pag. 14
Associazione della patologia intestinale con SpA	pag.16
Terapia dell'SpA	pag. 17
- Terapia Classica	pag. 17
- Terapia biologica	pag. 18
Modelli animali	pag. 20
OBIETTIVO	pag. 24
MATERIALI E METODI	pag. 25

Protocollo sperimentale	pag. 25
1) Fase precoce	pag. 25
2) Fase tardiva	pag. 26
Raccolta dei campioni ed analisi istologica	pag. 27
- Immunoistochimica	pag. 28
- Analisi dell'apoptosi col TUNEL e Fas/Fas-L nelle sezioni di colon	pag. 30
Analisi Semiquantitativa (RT-PCR)	pag. 31
Livelli sierici delle citochine	pag. 32
Analisi statistica	pag. 32
RISULTATI	pag. 33
Fase precoce dell'esperimento	pag. 33
Colon	pag. 33
- Valutazione clinica	pag. 33
- Analisi istologica della parete colica	pag. 33
- Espressione dei recettori del TNF α	pag. 34
- Analisi dell'apoptosi con Fas/Fas-L e con il metodo TUNEL sulle sezioni di colon	pag. 35
- Dosaggio dei livelli sierici delle citochine pro-infiammatorie	pag. 36

Articolazioni Periferiche	pag. 37
- Valutazione clinica	pag. 37
- Analisi istologica	pag. 38
- Analisi immunohistochemica	pag. 39
Fase tardiva dell'esperimento	pag. 40
Colon	pag. 40
- Valutazione clinica	pag. 40
- Analisi istologica	pag. 41
- Espressione dei recettori del TNF α	pag. 41
- Analisi dell'apoptosi con Fas/Fas-L e con il metodo TUNEL sulle sezioni di colon	pag. 42
- Dosaggio dei livelli sierici delle citochine pro-infiammatorie	pag. 43
Articolazioni Periferiche	pag. 44
- Valutazione clinica	pag. 44
- Analisi istologica	pag. 44
- Analisi immunohistochemica	pag. 46
DISCUSSIONE	pag. 49
BIBLIOGRAFIA	pag. 59

INTRODUZIONE

Spondiloartriti (SpA)

Generalità

Le spondiloartriti (SpA) sono un gruppo eterogeneo di malattie infiammatorie croniche ad eziologia sconosciuta, che condividono caratteristiche cliniche, epidemiologiche e genetiche.

Esse interessano principalmente l'apparato locomotore e con particolare frequenza:

1. L'articolazione sacroiliaca e la colonna vertebrale (a partenza dal tratto lombare e successivo interessamento dei tratti dorsale e cervicale);
2. Le articolazioni periferiche generalmente in modo asimmetrico;
3. Le entesi ed i tendini.

Possono essere anche coinvolti l'apparato gastrointestinale e l'occhio.

Tutte queste affezioni presentano come background genetico comune predisponente l'allele umano HLA-B27 (Human Leukocyte Antigen-B27).

Rientrano nel gruppo delle SpA le seguenti affezioni:

- Spondilite anchilosante (SA);
- Artrite psoriasica (APs);
- Artrite reattiva;
- Artrite associata a malattie infiammatorie intestinali (IBD) come la Rettocolite Ulcerosa (RCU) e la Malattia di Crohn (MC) ;

- Artriti indifferenziate (iSpA);
- Alcune forme di artriti croniche giovanili.

Sebbene in passato siano state considerate varianti dell'Artrite Reumatoide (AR), esse si differenziano da quest'ultima per:

1. differenti pattern di coinvolgimento articolare ed extra-articolare;
2. l'assenza del Fattore Reumatoide sierico (sono dette SpA sieronegative);
3. una forte associazione con l'antigene di istocompatibilità di classe I HLA-B27.

Le manifestazioni muscoloscheletriche delle SpA sono la conseguenza dell'infiammazione che si realizza a livello delle entesi [1]. Le entesi sono le sedi di inserzione sulle ossa dei tendini, dei legamenti e delle capsule articolari.

Esistono due forme di entesi, definite fibrosa e fibrocartilaginea a seconda del tipo di struttura e localizzazione. Le prime, dette anche periostio-diafisali, si trovano alle metafisi o alle diafisi delle ossa lunghe e, attraverso fibrille collagene, aderiscono direttamente alla superficie ossea [2,3].

Le entesi fibrocartilaginee, dette anche condro-apofisarie, si trovano sulle apofisi e sulle epifisi delle ossa lunghe, sulle ossa brevi delle mani e dei piedi e su alcuni legamenti della colonna vertebrale. Questo tipo di entesi è caratterizzata da una zona di transizione suddivisibile a sua volta in 4 regioni:

- 1) Tessuto connettivo fibroso denso con caratteristici fibroblasti orientati longitudinalmente detti tenociti;
- 2) Regione fibrocartilaginea non calcificata, dove la morfologia cellulare si modifica verso i condrociti;
- 3) Regione di fibrocartilagine calcificata;
- 4) Osso subcondrale.

Le zone 2 e 3 sono separate da un fronte di calcificazione, evidente come una linea di demarcazione alle colorazioni istologiche classiche, detto “tidemark” [2-4].

Con il termine “entesopatia” si intende una patologia generale cronica delle entesi, mentre con la denominazione “entesite” si indica una patologia infiammatoria acuta che si manifesta con una neo vascolarizzazione dell'entesi [5-7]. L'infiammazione dell'entesi è caratterizzata da una fase precoce con edema, infiltrato infiammatorio e microlesioni fibrocartilaginee, seguita da proliferazione vascolare nell'osso subcondrale, erosione ossea, sclerosi reattiva e ossificazione endocondrale delle entesi (entesofitosi).

L'entesite può coinvolgere: a) articolazioni sinoviali; b) articolazioni fibrocartilaginee, come la sinfisi pubica, le sincondrosi, come le intersomatiche vertebrali e l'articolazione manubrio-sternale; c) sindesmosi, come il legamento sacroiliaco interosseo nello spazio postero-superiore dell'articolazione sacroiliaca; e infine d) entesi extra-articolari, come a livello dell'articolazione del ginocchio e del tarso [1,5].

L'entesite si realizza più frequentemente nelle sedi che sopportano un maggiore stress meccanico, come a livello dell'inserzione sul calcagno della fascia plantare e del tendine di Achille.

Epidemiologia

Le SpA esordiscono generalmente entro la seconda decade d'età, anche se possono presentarsi tanto in età pediatrica (20% di tutte le artriti croniche) che avanzata. Attualmente si ritiene che la prevalenza dello 0,1% precedentemente attribuita alle SpA sia ampiamente sottostimata, avvicinandosi invece a quella della più frequente AR; le differenti percentuali si osservano in funzione dei diversi livelli di espressione

dell'antigene HLA-B27 in differenti popolazioni.

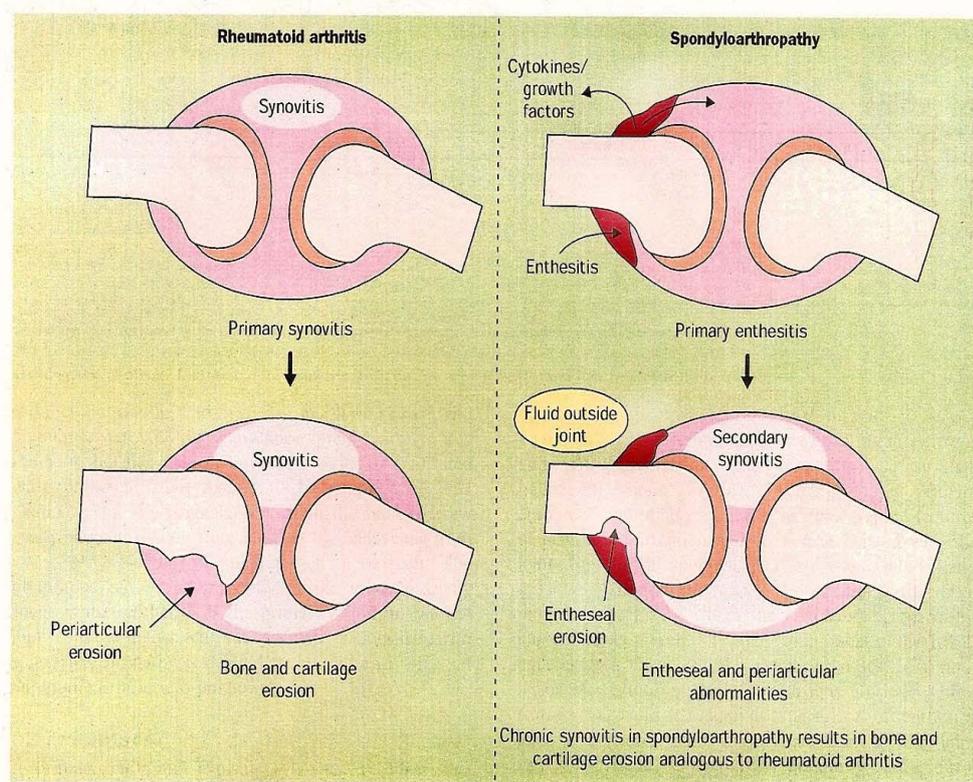
Un concetto particolarmente importante soprattutto in termini di diagnosi precoce e prognosi, è quello delle iSpA, frequentemente sottodiagnosticate, che comprendono forme cliniche isolate come ad esempio le mono-oligoartriti sieronegative associate all'antigene HLA-B27, specie se interessanti gli arti inferiori. Queste artriti non presentano esposizioni anamnestiche ad agenti infettivi batterici, manifestazioni extrarticolari o associazioni con malattie infiammatorie croniche dell'intestino o psoriasi. I pazienti con iSpA possono esordire con una tumefazione globale "a salsicciotto" di una o più dita (le cosiddette dattiliti), o con entesiti del tendine achilleo o della fascia plantare. Altri ancora possono presentarsi con uveiti anteriori acute o con un'insufficienza aortica associata ad un blocco di branca. In uno studio su popolazione scandinava è stato dimostrato che ben l'88% dei pazienti con uSpA presentano un blocco di branca, disturbi severi di conduzione e l'antigene HLA-B27. Il 50% circa dei pazienti con uveite anteriore presenta l'antigene HLA-B27 ed il 50% circa di essi ha una delle forme di SpA. Ciò nonostante la ricerca routinaria dell'HLA-B27 non è assolutamente utile visto che le SpA possono verificarsi anche in assenza di tale antigene. L'HLA-B27 fornisce il più forte contributo genetico allo sviluppo delle SpA, anche se diverse evidenze supportano il coinvolgimento di altri geni. Infatti, HLA-B27 è presente all'incirca nell'8% della popolazione bianca sana, ma il 90% circa di questi individui non svilupperà mai una SpA. Bisogna però sottolineare che il rischio di SpA tra i parenti di primo grado di pazienti spondiliteici è all'incirca del 30% [8-10].

Patogenesi

Le SpA sono malattie multifattoriali che si realizzano in pazienti geneticamente

predisposti. I meccanismi cellulari e molecolari responsabili non sono ancora chiari. Caratteristiche sono comunque l'elevata infiltrazione di linfociti T e macrofagi e l'elevata concentrazione di citochine pro-infiammatorie (IL-1 β , TNF α , IFN- γ) nelle sedi di infiammazione. Il processo infiammatorio, quale che ne sia il primum movens, procede verso l'erosione dell'osso corticale con successivi processi di osteogenesi, anche se possono verificarsi significativi decrementi di massa ossea nelle fasi iniziali della malattia.

Per quanto riguarda l'interessamento della sinovia, diversamente da quanto avviene nella AR dove la sinovite rappresenta la lesione primitiva, nelle SpA è sempre secondaria all'entesite.



Meccanismo primario di sinovite nell'AR e danno articolare nella SpA[1].

Nella patogenesi delle SpA non esiste alcuna evidenza certa di un evento infettivo

scatenante anche se occorre sottolineare che i batteri chiamati in causa nelle artriti reattive post-infettive condividono alcune caratteristiche, come, ad esempio, la capacità di invadere le mucose e di replicarsi a livello intracellulare. L'importanza dei batteri nella patogenesi delle SpA è comunque sottolineata dalla presenza di un'inflammatione della mucosa intestinale in più del 60% dei pazienti spondilitici e dall'osservazione che i batteri intestinali sono fondamentali per l'induzione di artrite in ratti transgenici HLA-B27 positivi, modello sperimentale delle SpA.

L'ipotesi patogenetica classica è quella del "peptide artritogenico" che prevede l'induzione di cellule T citotossiche autoreattive secondaria alla presentazione di autoantigeni (derivati dalla cartilagine articolare o dalle entesi, come ad esempio alcuni proteoglicani) che cross-reagiscono con specifici antigeni batterici. L'espansione oligoclonale di cellule T CD8+ è stata in effetti riscontrata nelle articolazioni di alcuni pazienti spondilitici [11].

Un'ipotesi patogenetica più recente ipotizza invece che le SpA siano una patologia da deposizione di $\beta 2$ microglobulina ($\beta 2m$). Tale ipotesi prevede che le cellule presentanti i sottotipi dell'HLA-B27 più associati alla SpA vadano incontro ad una più alta percentuale di dissociazione della $\beta 2m$ dalle molecole HLA-B27, con conseguente intrappolamento della stessa a livello della sinovia. In questa sede alti livelli di $\beta 2m$ porterebbero ad accumuli di materiale amiloide e induzione dei fibroblasti sinoviali alla sintesi ed al rilascio di proteine coinvolte nella distruzione tissutale. Parte della $\beta 2m$ depositata potrebbe poi andare incontro ad un processo di glicosilazione con la produzione dei cosiddetti AGE- $\beta 2m$ (advanced glycation end-products) che, interagendo con gli specifici recettori di membrana, i RAGE (receptor for advanced glycation end-products), determinerebbero l'attivazione di NF- κ b con conseguente

infiammazione tissutale.

E' stato dimostrato inoltre che la $\beta 2m$ è in grado di determinare il rilascio da parte dei monociti di citochine pro-infiammatorie quali TNF α , IL-1, IL-6, IL-8 ed IL-10.

In particolare si ritiene che il TNF α giochi un ruolo centrale e polimodale nella risposta anti-self nell'infezione.

Quest'azione è mediata da due recettori funzionalmente distinti, TNF recettore 1 e recettore 2 (TNF-R1 e TNF-R2, rispettivamente), che sono coespressi sulla superficie di molti tipi cellulari, in particolare neutrofili, monociti e linfociti T [12]. Inoltre, il TNF α svolge un ruolo essenziale nella regolazione dell'apoptosi e/o sopravvivenza delle cellule epiteliali intestinali (CEI), durante un'infezione cronica [13, 14]. Fas (anche noto come CD95 o APO-1) fa parte della superfamiglia dei recettori del TNF α . E' un recettore di morte della famiglia dei recettori del TNF α , e partecipa col suo ligando (Fas-L) ad una serie di eventi intracellulari volti all'apoptosi [13, 15-17]. Cellule T, che producono TNF α , possono innescare l'espressione di Fas-L in tessuti come la mucosa epiteliale, non linfoide, e questo a sua volta induce apoptosi delle cellule T che esprimono Fas [13, 15-17]. Questo modello è un esempio di "inducibile immune privilege" che contribuisce alla limitazione dell'estensione dell'infiltrato di cellule T in alcuni tessuti periferici [13]. TNF-R1 espresso dalle CEI, sembra mediare questo meccanismo.

Il TNF α gioca un ruolo chiave nella patogenesi di diverse malattie reumatologiche ed IBD [18]. Diversi dati di studi in vitro dimostrano che citochine pro-infiammatorie come il TNF α e IL-1, coinvolte in numerose malattie infiammatorie articolari, hanno un effetto inibitorio sulla condrogenesi e sull'ossificazione endocondrale. Inoltre il TNF α non stimola l'osteogenesi nelle cellule del periostio ed inibisce l'osteogenesi in colture

cellulari di cellule stromali del midollo osseo [19].

Da studi su modelli animali è stato visto che il TNF α non sembra avere importanza critica per lo sviluppo dello scheletro osseo, sembra invece essere una citochina critica nell'attivazione degli osteoclasti in modelli animali di malattie infiammatorie articolari e di distruzione dell'osso [20]. Nelle articolazioni di pazienti con SA è stato ritrovato un denso infiltrato di cellule T e macrofagi con aumentata espressione di TNF α [21].

Associazione genetica con l'HLA-B27

La forma più comune di SpA, la SA, ha tra le caratteristiche peculiari una forte associazione con l'antigene HLA-B27.

Il complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) è un potente determinante di immunoregolazione mediata geneticamente. HLA è un antigene leucocitario umano di classe I la cui molecola è composta da due dimeri di una variabile trans-membrana detta catena α ed una variante di catena β 2microglobulina. Questo peptide di membrana è presentato ai linfociti T CD8⁺ dalle cellule presentanti l'antigene (CPA).

L'HLA-B27 non è un singolo allele ma una famiglia di almeno 31 alleli differenti (dall'HLA-B*2701 all'HLA-B*2728) [22].

Dei differenti sottotipi quelli maggiormente associati alla SpA nella popolazione bianca sono l'HLA-B*2705 e HLA-B*2702, mentre i meno associati sono HLA-B*2706 e HLA-B*2709, che risultano neutri verso il rischio di SA, e non la promuovono [23].

I sottotipi dell'HLA-B27 sono derivanti dal sottotipo ancestrale comune B*2705, presente in tutte le popolazioni. I sottotipi 2701, 2702, 2710 sono ben rappresentati nei caucasici e nei nord africani, il 2703 nell'Africa occidentale, i 2704, 2706, 2707 nella popolazione asiatica e polinesiana, ed, in particolare, il 2709 nella popolazione sarda

dove costituisce il 25% degli individui B27 positivi [11].

Esiste un gradiente nord-sud di decremento della frequenza del gene B27, nello specifico del sottotipo B*2705. In particolare in Italia si è osservata una bassa prevalenza dell'HLA-B*2705 in Sardegna. Il motivo di questo diverso gradiente sarebbe legato in maniera inversa alla distribuzione epidemiologica del Plasmodium falciparum della malaria. Si ritiene che nel tempo l'esposizione alla malaria possa aver prodotto una selezione genetica negativa per il B*2705, a vantaggio delle varianti non-2705, come ad esempio il B*2706 e il 2709, che risultano avere una scarsa associazione con la SpA. Infatti, nei soggetti portatori del B*2705 non solo si sviluppa più facilmente una risposta infiammatoria autoimmune capace di sostenere il processo spondiloartritico, ma anche l'infezione da Plasmodium si manifesta in forma più severa e spesso letale [24].

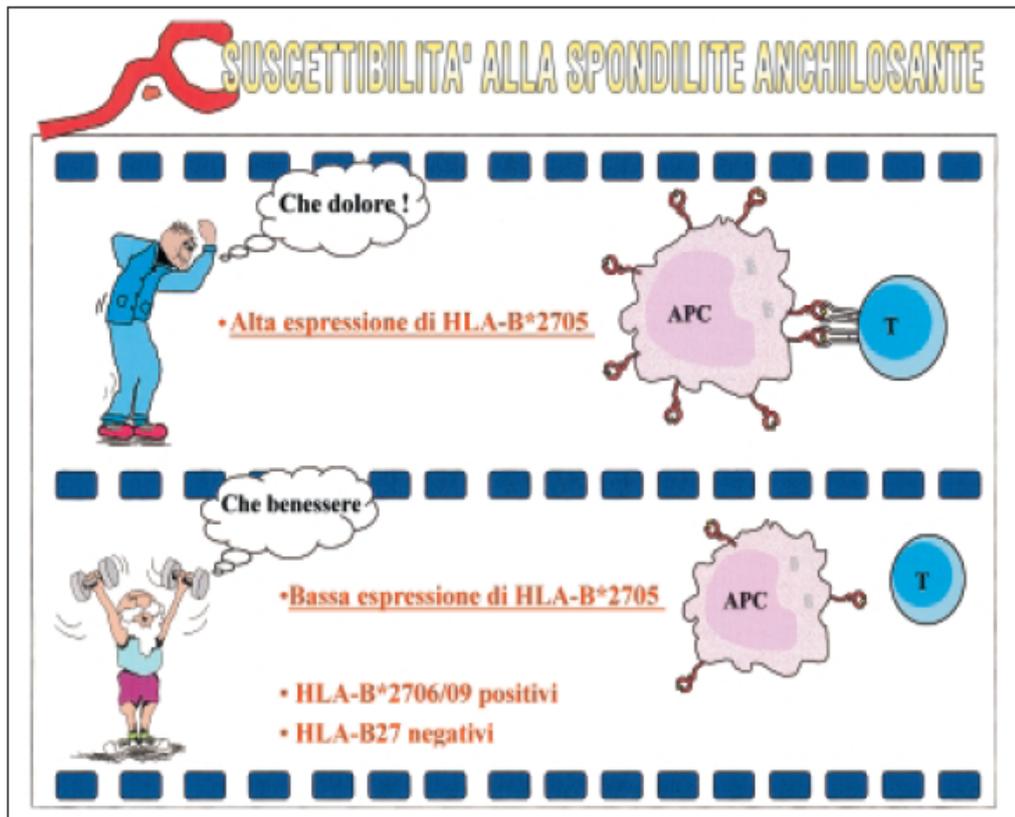
- Suscettibilità alla malattia nei pazienti HLA-B27 positivi

L'HLA-B27 si trova nel 75-95% dei pazienti con SA. Nonostante il 95% dei pazienti affetti da SA possieda nel proprio patrimonio genetico l'allele HLA-B27, e che questa associazione tra malattia e HLA sia la più forte presente in natura, solamente il 20% dei soggetti HLA-B27 positivi svilupperà nel corso della vita la malattia [11].

Pazienti che presentano SpA con IBD hanno un'associazione maggiormente significativa con HLA-B27 rispetto ai pazienti che sviluppano solamente IBD, dove la frequenza di HLA-B27 non risulta aumentata rispetto alla popolazione normale. Dati provenienti da alcuni studi evidenziano che la SA, classica forma di SpA, che si presenta con sintomi clinici e sindesmofiti, è più frequentemente legata con HLA-B27 (72-78% dei positivi) nei pazienti con IBD mentre la sacroileite in pazienti con IBD,

spesso unilaterale e senza sintomi clinici, è solo lievemente associata con HLA-B27 (0-20% dei positivi).

I dati epidemiologici suggeriscono che l'allele HLA-B27 svolge un ruolo fondamentale ma non sufficiente per l'insorgenza della SpA. Appare probabile che altri geni, appartenenti al sistema HLA [25] ma anche esterni a questo, in associazione a fattori ambientali e/o endogeni, concorrano in maniera importante ai meccanismi che portano allo scatenamento e alla cronicizzazione del processo patologico [9]. La diversa suscettibilità a contrarre la SA, da parte di individui HLA-B27 positivi, potrebbe essere legata non soltanto al sottotipo dell'allele, ma anche al grado di espressione di queste molecole sulla superficie delle CPA deputate alla presentazione dell'antigene alla controparte T cellulare [11]. I soggetti HLA-B27 positivi, in particolare con alta espressione del sottotipo predisponente B*2705, presenterebbero un rischio maggiore di sviluppare SA nel corso della vita rispetto a soggetti HLA-B27 negativi, a soggetti con un sottotipo HLA-B27 non predisponente (B*2706/09) e a soggetti con bassa espressione del sottotipo predisponente [11].



Ruolo della molecola HLA-B27 nella patogenesi della SA[11].

- Teorie sul ruolo delle molecole HLA-B27 nella patogenesi della SpA

Differenti ipotesi sono state formulate sul ruolo delle molecole HLA-B27 nella patogenesi della SA:

a) L'associazione della SA con diversi sottotipi dell' HLA-B27 e la condivisione tra i sottotipi associati alla malattia di una sequenza comune di 6 aminoacidi, posta nella nicchia legante l'antigene, suggeriscono che la malattia sia determinata da un peptide artritogenico presentato ai linfociti CD8+ nel contesto della molecola di classe I (B27) espressa dalle CPA. Una risposta immune geneticamente ristretta nei confronti di un fattore ambientale rappresenta quindi l'ipotesi di lavoro più accreditata. Tra le possibili origini del "peptide artritogenico", quella microbica/infettiva è senza dubbio la più

probabile. Diverse analogie con le artriti reattive, nelle quali le infezioni giocano un ruolo preminente, suggeriscono che le infezioni batteriche possano essere importanti anche nella SA [11].

b) Una teoria alternativa è costituita dal “mimetismo molecolare” con induzione di autoreattività nei confronti di un antigene self. Secondo una teoria condivisa da diversi autori, linfociti citotossici specifici per un antigene batterico andrebbero incontro a una reazione crociata con una sequenza aminoacidica autologa [11].

c) E' stato recentemente dimostrato che le catene pesanti del HLA-B27 presentano con notevole frequenza problemi di assemblaggio “misfolding”. Il “misfolding” e l'accumulo di catene pesanti dell'HLA-B27 potrebbero costituire uno “stress” per il reticolo endoplasmico con una risposta che porta all'attivazione di NF- κ B e, di conseguenza, alla sintesi di citochine pro-infiammatorie come il TNF α da parte delle cellule monocito/macrofagiche. La teoria del “misfolding” offre una spiegazione dell'associazione del HLA-B27 con la SA che prescinde dalla funzione di presentazione di antigeni [11, 26].

d) Altra possibile spiegazione di questa associazione, almeno a livello teorico, coinvolge meccanismi indiretti come un ipotetico ruolo nella selezione timica dei cloni linfocitari. L'HLA-B27 potrebbe, infatti, partecipare a livello timico alla selezione di cloni linfocitari CD8+ con recettori capaci di rispondere in senso patologico ad antigeni microbici [11, 27].

e) Un'ultima ipotesi ritiene che le catene pesanti dell'HLA-B27 non complessate con la β 2-microglobulina ed espresse sulla superficie cellulare potrebbero comportarsi funzionalmente come molecole di classe II ed interagire quindi con cloni di linfociti CD4+ [28, 29].

Associazione della patologia intestinale con la SpA

Una relazione tra SpA e patologia intestinale era già stata ipotizzata negli anni '20 [30] e successivamente convalidata da uno studio epidemiologico negli anni '50 e '60 [31]. Il concetto di SpA associata alla IBD è stato formulato definitivamente negli anni '70 [32]. Disturbi gastrointestinali sono spesso accompagnati da artralgie, dette “Spondiloartriti enteropatiche”. Infatti l'interessamento muscolo-scheletrico costituisce la più comune manifestazione extraintestinale osservata nei pazienti affetti da IBD (20%-50% dei pazienti) [32]. Il termine “SpA enteropatica” sta ad indicare un'inflammatione a carico delle vertebre (spondilite) o delle articolazioni in genere (artrite) secondaria ad una malattia intestinale (enteropatica). Il legame tra patologie gastrointestinali e articolari è molto stretto, ed anche le altre forme di SpA, come la SA, possono essere accompagnate in maniera molto frequente da sintomi gastroenterici o avere una silente modificazione della mucosa intestinale. Questa affinità è ancor più evidenziata dal fatto che la terapia con *salazopirina*, farmaco storicamente utilizzato nella terapia delle IBD, tende a far regredire entrambe le manifestazioni intestinali e articolari.

Tra le IBD, sia la MC che la RCU presentano due distinte sedi di coinvolgimento articolare: articolazioni periferiche e articolazioni assiali. Nel primo caso si tratta di una artrite che colpisce una o più articolazioni (mono- oligo-artrite) in modo asimmetrico con un quadro laboratoristico e strumentale di flogosi aspecifica. Essa è associata con la riacutizzazione della malattia intestinale e può essere accompagnata anche da altre manifestazioni extraintestinali (eritema nodoso, uveite) [34]. L'evoluzione di questa artrite è generalmente benigna, tende a scomparire con la remissione clinica delle IBD ed è difficile che provochi danni irreversibili, come erosioni ossee o deformazioni articolari. Può associarsi all'inflammatione di uno o più tendini, che può anche essere il

primo e unico sintomo di una artrite enteropatica. Le articolazioni più colpite sono quelle del ginocchio, del tarso e le metatarsofalangee. La forma assiale è caratterizzata da un'inflammatione della colonna vertebrale (spondilite) che inizia sempre a livello del bacino con sacroileite e tende successivamente a salire lungo i tratti lombare, dorsale e cervicale. Spesso non è correlata con le manifestazioni cliniche delle IBD, avendo un decorso clinico indipendente [34]. La spondilite, diversamente dalla oligoartrite, non è associata alla riattivazione della malattia intestinale, può precederla di molti anni e presenta un andamento cronico svincolato dall'inflammatione intestinale. La forma di sacroileite asintomatica o paucisintomatica colpisce il 25% dei pazienti con IBD e non tende ad avere un'evoluzione clinica grave. Di contro, il decorso cronico della spondilite può portare con gli anni ad una riduzione della mobilità della colonna fino alla rigidità di alcuni suoi segmenti (anchilosi). Le due forme di spondilartrite enteropatica (la oligoartrite e la spondilite) possono anche presentarsi contemporaneamente o in tempi successivi nello stesso paziente [34].

Terapia dell'SpA

Terapia classica

Attualmente non sono disponibili trattamenti realmente mirati per la cura dell'SpA. La terapia delle SpA si basa sull'impiego dei farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS), dei cortisonici, della sulfalazina, degli immunosoppressori (*Azatioprina, Ciclosporina, Metotrexate*). Recentemente l'avvento dei farmaci biologici immunomodulatori, nello specifico anticorpi monoclonali anti-TNF α , ha fornito una valida alternativa sia in monoterapia che in terapia combinata. I FANS sono efficaci

come terapia sintomatica nel ridurre il dolore e sono i farmaci di primo impiego, ma possono essere utilizzati solo per breve tempo a causa dei possibili effetti collaterali a livello gastrointestinale (ulcerazioni ed emorragie). Nei casi di dolore più intenso e persistente si ricorre ai cortisonici (generalmente con dosaggi medio-bassi), alla sulfalazina e agli immunosoppressori, tutti farmaci utilizzati anche dai pazienti affetti da infiammazione intestinale [8].

Terapia biologica

I primi farmaci biologici sperimentati nelle SpA sono gli agenti bloccanti il TNF α [35]. Gli inibitori del TNF α sono: *infliximab*, *adalimumab*, *etanercept*, ed il loro utilizzo ha dato un sostanziale miglioramento della patologia con riduzione dei segni e sintomi clinici e miglioramento della qualità di vita dei pazienti [36-42].

Infliximab è un anticorpo monoclonale chimerico (topo-uomo) anti-TNF α che si lega in maniera specifica al TNF α . *Etanercept* è una proteina di fusione ottenuta tramite tecniche di DNA ricombinante del recettore p75 umano del fattore TNF α con la frazione Fc dell'immunoglobulina umana IgG1. La molecola funziona da recettore solubile per il TNF α e possiede un'affinità di legame più alta di quella degli altri recettori solubili. *Adalimumab* si lega al TNF α , prevenendo l'attivazione dei suoi recettori e, a differenza degli altri, è costituito completamente da un anticorpo monoclonale umano. L'inattivazione del TNF α da parte di questi farmaci provoca una diminuzione delle reazioni infiammatorie associate con malattie autoimmuni.

L'efficacia di questa nuova classe di farmaci nelle manifestazioni extrarticolari e nelle condizioni di comorbidità sembra variare da farmaco a farmaco [36, 43]. *Etanercept*

sembra avere poco effetto sull'uveite e sull'IBD, mentre l'*Infliximab* è in grado di ridurre l'incidenza della riacutizzazioni di entrambe le complicanze nella SA, e si è rivelato molto efficace contro l'infiammazione alla base delle manifestazioni extra-articolari. Attualmente esistono ancora pochi dati inerenti a *Adalimumab* [36, 43]. La diversa efficacia dei vari agenti anti-TNF α potrebbe essere correlata alla diversa modalità d'azione.

La terapia con *Infliximab* viene suggerita oltre che nelle SpA e nella MC, anche nei pazienti con SA, dove si è osservato un aumento dell'espressione del TNF α nel siero [44] e nell'articolazione sacroiliaca [45]. Nei pazienti con MC, l'efficacia di questa terapia nella guarigione delle fistole della parete intestinale è dovuta alla sua capacità di prendere parte al rimodellamento tissutale [39, 46].

Anche se la terapia con *Infliximab* sembra essere un valido approccio terapeutico nella SA, non sono ancora chiari gli effetti secondari legati ad un uso continuo e prolungato del blocco del TNF α . Infatti l'interferenza a lungo termine sul sistema immunologico è da tener presente soprattutto per la sicurezza, per ciò che riguarda possibili sovra-infezioni, malignità tumorale e patologie immunomediate. L'esperienza clinica dimostra che le difese immunitarie sono compromesse in alcuni pazienti trattati per lunghi periodi con *Infliximab*.

Modelli animali

L'importanza dell'HLA-B27 nella patogenesi delle SpA è confermata dal modello animale di J. Taurog sviluppato negli anni '90 [47]. Nel tentativo di creare un modello sperimentale di malattia associato a B27, Taurog et al. hanno creato un ratto transgenico per il gene umano HLA-B27 e per la beta2-microglobulina (h β 2m) (B27TR). I B27TR sviluppano spontaneamente una malattia multisistemica simile alla SpA umana con manifestazioni infiammatorie a carico delle articolazioni periferiche e assiali, dell'intestino, del tratto genitale maschile e della cute [47].

Nei B27TR, la predisposizione alla malattia e la severità con cui si manifesta è strettamente correlata ai livelli di espressione dell'allele HLA-B27 (ma non di h β 2m) sia a livello di mRNA che di proteina, ed esiste una soglia di copie del gene HLA-B27 oltre la quale presumibilmente si manifesta la malattia [48, 49]. Tra le differenti linee e generazioni di ratti transgenici HLA-B27 ottenuti, due di queste, 21-4H su background del ceppo LEWIS e 33-3 su background del ceppo F344, sviluppano spontaneamente e con maggiore incidenza la malattia infiammatoria multisistemica simile alla SpA [47, 48]. Entrambe queste linee, 21-4H e 33-3, possiedono la più alta espressione del gene HLA-B27 e del gene h β 2m. Il verificarsi della malattia in queste due linee è il risultato dell'alta espressione della proteina HLA-B27 che aumenta con l'età dei ratti e non in seguito all'instaurarsi dello stato infiammatorio[48]. La linea 21-4H possiede il più alto numero di geni HLA-B27 ma mostra l'espressione della proteina in minor concentrazione rispetto ai ratti della linea 33-3 della stessa età che manifestano la patologia. La più alta concentrazione della proteina B27 in quest'ultima linea è correlata con la manifestazione precoce della malattia sia clinica che istologica.

Sia nei ratti 21-4H che nei 33-3, la diarrea è il primo sintomo clinico e compare dopo la decima settimana di vita. Dopo alcune settimane dalla manifestazione intestinale, nella maggior parte dei ratti si manifesta un'artrite periferica [47].

Nella linea 21-4H la comparsa di artrite segue immediatamente la diarrea, mentre nei ratti 33-3 la diarrea si sviluppa prima rispetto all'altra linea, ma le manifestazioni extra-intestinali si sviluppano più tardi. Nei B27TR l'artrite è caratterizzata da gonfiore, eritema, perdita di consistenza dei tendini in una o in entrambe le zampe posteriori [47].

L'artrite persiste per alcuni giorni fino a qualche settimana, ed in alcuni casi si riscontra un andamento ciclico di sviluppo e remissione [47]. Quadri istopatologici simili, a carico delle articolazioni, sono stati osservati sia su questo modello transgenico che nell'artrite periferica umana. Le modificazioni articolari finora descritte in questi ratti sono caratterizzate da iperplasia della sinovia con formazione di: 1) panno sinoviale, 2) infiltrato infiammatorio, e 3) distruzione dell'osso articolare; quando la cartilagine della rima articolare viene completamente sostituita dal panno sinoviale si sviluppa un'anchilosi fibrotica. Solitamente, l'infiammazione cronica coinvolge sia la capsula articolare che i legamenti e i tendini [47]. Nelle vertebre della coda della linea 21-4H sono state osservate delle alterazioni patologiche che sono riconducibili ad un'entesite [47, 48]. In questi ratti sia i sintomi dell'infiammazione intestinale che l'artrite possono essere prevenuti se gli animali sono mantenuti fin dalla nascita in condizione di sterilità. Infatti la presenza di flora batterica intestinale promuove l'insorgenza e lo sviluppo della malattia infiammatoria [50, 51].

Nei B27TR sia le cellule T CD4+ che le CPA esprimono alti livelli di HLA-B27 rivestono una notevole importanza nella patogenesi della malattia [49, 52]. Recenti ipotesi che cercano di spiegare la patogenicità del B27 in questo modello, si basano sul

meccanismo non antigene specifico, in opposizione all'ipotesi classica basata sul "peptide artritogenico". Questa nuova terapia basata su un difetto antigene-indipendente è stata ipotizzata per prima nelle cellule dendritiche (CD) e sembrerebbe avvenire a livello dei contatti tra CPA e cellule T. Infatti, nei B27TR, le CPA hanno poca efficacia nella stimolazione delle cellule T e questo potrebbe portare ad una diminuzione di tolleranza verso gli antigeni self [53]. Come alternativa, o in aggiunta, un'incontrollata stimolazione di cellule T potrebbe portare ad un alterato controllo dei batteri intestinali e in tal modo stimolare una risposta immunitaria da parte di macrofagi [52]. Per questo sia i sintomi intestinali che extraintestinali possono essere prevenuti in condizioni di sterilità, mentre la ricostituzione della flora batterica promuove lo sviluppo della malattia [51, 54]. Questo difetto funzionale delle CD è HLA-B27 specifico e dipende dal numero di copie del gene HLA-B27, il quale determina i livelli di espressione della proteina B27 e la suscettibilità alla malattia.

I B27TR sono considerati come un buon modello animale di IBD e sono comunemente utilizzati per studiare l'attività e il meccanismo di azione di molecole anti-infiammatorie [49, 52, 55]. Nella mucosa dei ratti B27TR sono stati ritrovati molti mediatori dell'infiammazione con predominanza di citochine pro-infiammatorie di tipo Th1 [52, 54-56]. In particolare, nella fase precoce di malattia è stata riscontrata una predominanza della risposta mediata da Th1 con un aumento di IFN γ e di IL-2, mentre nella malattia avanzata sono espressi maggiormente IL-1 α , IL-1 β e TNF α [52-54, 56].

In particolare il TNF α stimola lo sviluppo delle CD chiamate "semi-mature", che sono determinanti nell'induzione della tolleranza verso gli antigeni self e quindi potrebbe essere molto importante nelle fasi iniziali di malattia [57].

Recentemente il modello transgenico è stato modificato dal gruppo di J. Taurog con l'introduzione addizionale di gene hβ2m, in modo da aumentare l'espressione di questa proteina e riducendo la frequenza della proteina HLA-B27 non assemblata [58]. In questo modo è stata indotta una sindrome infiammatoria ancora più severa. Infatti i ratti sviluppano più frequentemente un'artropatia più grave, con segni clinici ed istopatologici più simili alla SpA umana (aumento della prevalenza del danno assiale), rispetto ai modelli creati inizialmente. Tuttavia, l'infiammazione della mucosa intestinale è completamente assente in questo modello animale. Pertanto, si può concludere che il misfolding dell'HLA-B27 può giocare un ruolo chiave nell'infiammazione intestinale anche se quest'ultima non sembra essere un requisito indispensabile per lo sviluppo di una malattia simile alla SpA [58]. Inoltre, alcuni pazienti con SpA, negativi per HLA-B27 sono più suscettibili allo sviluppo di MC, suggerendo il coinvolgimento di altri geni nello sviluppo dell'infiammazione intestinale [59].

OBIETTIVO

La terapia con anti-TNF α è interessante poiché il ruolo di questa citochina è di rilievo nel sostenere l'infiammazione cronica. Svariati trials con agenti anti-TNF α suggeriscono che la terapia con *infliximab*, *etanercept* e *adalimumab* abbia effetti simili per i sintomi correlati alla colonna vertebrale, articolazioni e cute di pazienti con SA. *Infliximab* sembra avere maggiore effetto in trattamenti concomitanti per l'IBD [35, 43]. L'obiettivo del nostro lavoro è stato di studiare gli effetti del blocco del TNF α nell'IBD e nella comparsa di manifestazioni articolari nei B27TR. La disponibilità commerciale del ratto B27TR, che in parte riproduce i segni e i sintomi della SpA umana associata all'infiammazione intestinale, fornisce un ottimo modello sperimentale per meglio valutare gli effetti della terapia anti-TNF α nella patologia mediata da B27.

Il nostro studio è stato suddiviso in due fasi:

- 1) una precoce, dove il trattamento è stato iniziato all'età di 9 settimane, prima della comparsa dei sintomi clinici, e continuato fino al sacrificio dei ratti all'età di 18 settimane;
- 2) una tardiva, dove il trattamento con l'anti-TNF α è stato iniziato all'età di 18 settimane, quando i ratti presentano sintomi di infiammazione intestinale cronica e manifestazioni articolari transitorie, e continuato fino al sacrificio dei ratti all'età di 27 settimane.

E' stato valutato il ruolo del TNF α sulla comparsa e l'evoluzione dei segni dell'infiammazione a livello intestinale e a livello delle articolazioni periferiche.

MATERIALI E METODI

Protocollo sperimentale

Per i nostri esperimenti abbiamo utilizzato ratti maschi transgenici HLA-B27/h β 2m (B27TR, n=24) della linea 33-3 e come controlli ratti maschi non-transgenici (Fisher F344, n=16) che sono stati acquistati dalla Taconic Farms (Taconic Farms, Inc., Germantown, WI, USA). Tutti i ratti sono stati allevati e mantenuti in condizioni standard. Lo studio è stato approvato dalla commissione per l'impiego degli animali da sperimentazione (secondo quanto indicato nel D.L.vo 116 del 27/01/92).

1) Fase precoce.

Dodici B27TR dell'età di 9 settimane, età in cui non si è ancora sviluppata l'infiammazione intestinale, sono stati assegnati in modo random al trattamento con l'anticorpo monoclonale anti-TNF α (mAb) o ad un controllo negativo con un isotipo della immunoglobulina IgG2a,k (n=6 per gruppo). Gli anticorpi sono stati gentilmente forniti dalla ditta Centocor (Centocor, Inc., Malvern, PA, USA). L'anticorpo anti-TNF α utilizzato era specifico per la specie ratto e presentava una struttura molecolare simile all'*infliximab* utilizzato nella terapia dell'uomo. Ciascun ratto ha ricevuto un'iniezione intraperitoneale settimanale di anti-TNF α mAb o dell'isotipo IgG2a,k con dose di 15mg/kg fino all'età di 18 settimane.

2) Fase tardiva.

Ulteriori dodici B27TR sono stati monitorati fino all'età di 18 settimane e successivamente suddivisi in modo random e sottoposti al trattamento con anti-TNF α mAb (n=6) o con IgG2a,k (n=6) fino all'età di 27 settimane, con le stesse modalità della fase precoce.

Ratti maschi non transgenici del ceppo F344 sono stati utilizzati come controllo (n=4 in ciascuna fase del protocollo).

Durante il trattamento ciascun ratto è stato pesato una volta a settimana e monitorato per eventuali manifestazioni cliniche di infiammazione intestinale (comparsa di diarrea) e articolare (comparsa di eritema e gonfiore alle zampe posteriori). Ciascun gruppo è stato esaminato da due osservatori ciechi al trattamento.

Ogni parametro osservato per l'interessamento intestinale è stato valutato e quantizzato assegnando uno score numerico: 1 per feci normali, 2 per feci soffici e 3 per la diarrea.

La presenza di segni clinici di artrite nell'articolazione tarso/metatarsale è stata controllata due volte a settimana con una scala che valutava l'edema (da 0 a 3) e l'eritema (da 0 a 3) delle zampe posteriori, considerando normale=0, medio=1, moderato=2, severo=3. Lo score massimo per l'infiammazione articolare per ogni zampa di ciascun animale era pertanto 6 (score totale per ciascun animale=12 per entrambe le zampe posteriori).

I dati ottenuti per ciascun ratto nei differenti gruppi sperimentali sono stati poi raccolti e su di essi è stata eseguita un'analisi statistica (vedi paragrafo Analisi Statistica).

Raccolta dei campioni e analisi istologica

Al termine del trattamento, a 18 e 27 settimane rispettivamente, gli animali sono stati sacrificati dopo anestesia con etere. Campioni di sangue sono stati raccolti e le aliquote di siero sono state conservate a -80°C fino al momento dell'utilizzo.

Dopo apertura dell'addome, il colon è stato prelevato e suddiviso nei tre tratti principali (ascendente, trasverso e discendente) e ciascun tratto è stato preparato per l'esame istologico e per l'analisi biomolecolare. In particolare, per l'istologia i campioni sono stati fissati in formalina tamponata al 10% e inclusi in paraffina. Ad ogni animale sono state prelevate le zampe posteriori a livello dell'articolazione tarso/metatarsale e i campioni hanno subito un passaggio ulteriore di decalcificazione (con Elettrolitic decalcifying solution, Bio-Optica, Milan, Italy) prima di essere inclusi in paraffina.

Per l'analisi molecolare i campioni sono stati congelati in azoto liquido e poi conservati a -80°.

Dai campioni di colon inclusi in paraffina sono state tagliate sezioni trasversali, rispetto all'asse longitudinale, dell'intestino di 5 µm di spessore. Sezioni di 8 µm di spessore sono state ottenute dai campioni delle zampe posteriori. Tutte le sezioni sono state colorate con ematossilina-eosina (H&E) e inoltre sulle sezioni delle articolazioni sono state eseguite colorazioni con il blu di toluidina e la Tricromica di Masson modificata da Goldner.

Le sezioni dei due tipi di campioni, intestinale e articolare, sono state esaminate da due osservatori ciechi al trattamento che hanno dato una valutazione in accordo con la classificazione dello schema precedentemente proposto da altri autori e da noi adottato [60, 61]. In breve, per il colon la gravità delle lesioni è stata valutata per il danno infiammatorio (assente=0, medio=1, moderato=2, severo=3), presenza di ulcere

(assente=0, piccole=1, grande=2), allungamento e/o distorsione delle cripte ghiandolari (assente=0, media=1, severa=2), riduzione del numero di cellule mucipare (assente=0, moderato=1, severo=2), profondità delle lesioni (assente=0, epiteliale=1, lamina propria=2, sottomucosa=3). Il valore massimo raggiungibile per i dati inerenti al colon andava da 0 a 12.

Per il coinvolgimento delle articolazioni sono stati esaminati la sinovia, la cartilagine, le entesi e l'osso. In particolare, per la sinovia sono stati valutati la presenza di iperplasia, di infiltrato infiammatorio e del panno sinoviale. Per la cartilagine sono stati valutati l'organizzazione (normale=0, superficie irregolare=1, fessurazioni=2, disorganizzazione completa=3), la proliferazione dei condrociti (nessuna=0, ipercellularità=1, gruppi isogeni=2) e l'alterazione dei condrociti (nessuna=0, media=1, severa=2). Uno score fu assegnato rispettivamente per le entesi (normale=0, disorganizzata=1) e per l'osso (normale=0, eroso=1).

E' stata determinata una media basata su 5 sezioni per campione di intestino e di arto inferiore, rispettivamente. I dati ottenuti dall'osservazione delle sezioni sono stati discussi tra i due osservatori ciechi e i risultati dello score di ciascun gruppo di animali nelle diverse fasi dell'esperimento sono stati analizzati statisticamente.

Immunoistochimica

Le sezioni del colon e delle articolazioni tarso/metatarsali sono state sparaffinate e se necessario, per lo smascheramento degli antigeni, le sezioni di colon sono state riscaldate in 10 mM di buffer citrato (pH 6.0). Successivamente si è bloccata l'attività delle perossidasi endogene in tutte le sezioni e per l'analisi immunoistochimica è stato usato il sistema Ultravision Detection System (Lab Vision Corporation, Fremont, CA,

USA), in accordo con il protocollo della ditta.

Per le sezioni di colon abbiamo usato degli anticorpi policlonali di coniglio specifici per ratto: anti-TNF-R1, anti-TNF-R2 (recettori del TNF α), anti-Fas, anti-Fas-L (per l'apoptosi); mentre per le sezioni delle articolazioni sono stati utilizzati anticorpi monoclonali e policlonali anti-CD3/T (per i linfociti T), anti-CD68 (per i macrofagi), anti-TNF α , Smad1/5/8 fosforilate (pSmad1/5/8, per il segnale di attivazione delle bone morphogenic protein, BMP) (Tabella 1).

Tabella 1: Dettaglio degli anticorpi utilizzati per l'immunoistochimica

Anticorpo	Ditta	Diluizione
TNF-R1	Abcam Ltd., Cambridge, UK	1:100
TNF-R2	Abcam Ltd., Cambridge, UK	1:50
Fas	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)	1:100
Fas-L	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)	1:100 No antigen retrieval
CD3/T (monoclinale di topo)	AbD Serotec, Oxford, UK	1:10
CD68 (policlonale di coniglio)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA	1:100
TNF α (policlonale di coniglio)	Abcam, Cambridge, UK	1:100
pSmad1/5/8 (policlonale di coniglio)	Cell Signalling Technology, Danvers, MA, USA	1:100

L'immunopositività è stata messa in evidenza usando il cromogeno 3,3'-diamminobenzidina tetraidroclorato (kit DAB; Vector Laboratories, Burlingame, CA,

USA) o 3-amino-9-etil-carbazolo (AEC kit; Vector Laboratories). Le sezioni sono state contrastate con ematossilina, osservate con un microscopio ottico (Eclipse E400; Nikon, Tokyo, Japan) e fotografate con fotocamera digitale (Coolpix 2500). I controlli negativi sono stati ottenuti omettendo l'anticorpo primario.

Analisi dell'apoptosi col TUNEL e Fas/Fas-L nelle sezioni di colon

Per il rilevamento dell'apoptosi *in situ* abbiamo usato il metodo TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated triphosphate end-labeling) (Klenow FragEL DNA Fragmentation Detection Kit; Calbiochem, Nottingham, UK) sulle sezioni di colon.

Per valutare l'apoptosi è stata eseguita un'analisi quantitativa sulle sezioni di tessuto, considerando come positivi per Fas/Fas-L ogni cellula epiteliale o della lamina propria che presentasse un'evidente reattività rispetto al background, e come apoptotiche le cellule TUNEL positive con morfologia ben mantenuta.

Per ciascun animale sono stati esaminati 10 campi microscopici (400X ingrandimento), scelti a random, su 2 sezioni in cui le ghiandole si presentavano in sezione longitudinale, su 4 vetrini diversi per ogni campione fino ad un totale di 80 campi. Il rapporto tra cellule positive (per Fas e FasL) e totali è stato fatto contando almeno 1000 cellule in toto (cellule positive e non positive alla reazione). L'indice apoptotico (AI) è stato definito come il rapporto tra cellule positive al TUNEL rispetto al numero totale dei nuclei contati e moltiplicato per 100.

RT-PCR semiquantitativa

L'RNA è stato isolato dal colon di ratto utilizzando il Pure Link Micro-to-Midi Total RNA Purification system (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), seguendo il protocollo della ditta.

Un microgrammo di RNA è stato retrotrascritto e amplificato usando la SuperScrip III One-Step RT-PCR System with Platinum *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen). Le sequenze dei primer TNF-R1 e TNF-R2 sono state disegnate in base alle sequenze geniche (vedi Tabella 2) depositate nel GenBank Database.

La quantità di RT-PCR prodotta è stata determinata tramite analisi densitometrica utilizzando il software di analisi delle immagini NIH. In range di amplificazione lineare, almeno tre valori del prodotto di ciascuna amplificazione sono stati normalizzati rispetto al volume iniziale di mRNA e confrontati con il corrispondente valore di GAPDH, utilizzato come “house-keeping” gene ($P < 0.05$, ANOVA e test di Tukey).

Tabella 2: Primers utilizzati

Gene	Sequenza dei Primer	Lunghezza dell'amplificato	Codice di riferimento GenBank
TNF-R1	Senso 5'-ACCAAGTGCCACAAAGGAAC-3' Antisenso 5'-CTGGAAATGCGTCTCACTCA-3'	249 pb	NM_013091
TNF-R2	Senso 5'-AAATGCAAGCACAGATGCAG-3' Antisenso 5'-CAGCAGACCCAGAGTTGTCA-3'	244 pb	NM_130426
GAPDH	Senso 5'-AGACAGCCGCATCTTCTTGT-3' Antisenso 5'-CTTGCCGTGGGTAGAGTCAT-3'	300 pb	NM_017008

Livelli sierici delle citochine

I livelli sierici delle interleuchine IL-1 e IL-2 sono stati misurati mediante saggio ELISA seguendo il protocollo della ditta (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

Analisi statistica

I dati ottenuti dall'osservazione del colon in ciascun ratto nei diversi gruppi sperimentali sono stati sommati per calcolare la media e la deviazione standard (S.D.) o l'errore standard medio (S.E.M.). Le differenze statistiche tra i diversi gruppi sperimentali sono state calcolate tramite ANOVA. I risultati sono stati considerati significativi con valori di $P < 0.05$.

Lo score dei dati clinici a livello delle articolazioni è stato analizzato calcolando la mediana e la deviazione standard (S.D.). I dati ottenuti dall'analisi istologica delle articolazioni sono stati analizzati tramite il test di Mann-Whitney usando il software GraphPad Prism (GraphPad software, San Diego, CA, USA).

RISULTATI

Fase precoce dell'esperimento

Colon

Valutazioni cliniche

Durante l'esperimento non ci sono state differenze significative nel peso tra i ratti B27TR trattati con anti-TNF α mAb e quelli trattati con IgG2a,k. A 11 settimane di età, sia i ratti B27TR trattati con IgG2a,k che i non trattati hanno sviluppato i sintomi clinici dell'infiammazione intestinale con comparsa di diarrea. I B27TR trattati precocemente con anti-TNF α mAb non hanno manifestato sintomi di infiammazione intestinale e la conformazione delle feci è rimasta normale per tutta la durata dell'esperimento (Fig.1A).

Analisi istologica della parete colica

All'apertura dell'addome, la maggior parte dei ratti B27TR trattati con IgG2,k mostrava segni macroscopici di infiammazione: la parete del colon risultava, all'osservazione, edematosa ed iperemica con una rete vascolare ben evidente (Fig. 2). All'osservazione istologica, rispetto al controllo (Fig.3A), le pieghe della mucosa erano per lo più compromesse con ghiandole tubulari slargate e perdita delle cellule mucipare e delle cellule epiteliali. Nella lamina propria, è stato osservato un notevole infiltrato infiammatorio tra le ghiandole e attorno alle cripte ghiandolari, e nella sottomucosa si è

riscontrato edema e infiltrato perivascolare (Fig. 3B,C).

Nei ratti trattati precocemente con anti-TNF α mAb, a differenza di quanto osservato nei ratti trattati con IgG2a,k, non era presente alcun danno alla struttura della parete del colon. Le pieghe della mucosa, le cellule epiteliali e le mucipare erano conservate nella loro struttura così come i corpi ghiandolari. Un lieve infiltrato infiammatorio era visibile nella lamina propria sotto le cripte ghiandolari. Il trattamento precoce preveniva l'espansione dell'infiltrato infiammatorio nella mucosa e sottomucosa (Fig. 3D). Lo score istologico della infiammazione intestinale è riportato nella Figura 4.

Espressione dei recettori del TNF α

Nella mucosa del colon è stato valutato l'effetto del blocco precoce del TNF α sull'espressione dei recettori R1 e R2, mediante analisi immunoistochimica e RT-PCR.

Analisi immunoistochimica

Le cellule epiteliali del colon (CEI) di ratti di controllo F344 presentavano una forte immunopositività per TNF-R1 (Fig. 5A). Le CEI di ratti B27TR trattati con IgG_{a,k} erano marcate debolmente o negative per TNF-R1 (Fig. 5B), mentre queste cellule nei ratti trattati precocemente con anti-TNF α mAb mostravano una forte positività per TNF-R1, come nei controlli (Fig. 5C).

La positività per TNF-R2 non era presente nelle CEI nel colon dei ratti F344 (Fig. 6A), mentre era fortemente evidente nella mucosa dei ratti B27TR trattati con IgG_{2a,k} (Fig. 6B,C). In questi ultimi le CEI e cellule dell'infiltrato infiammatorio, come macrofagi e mastociti, sia nella mucosa che nella sottomucosa, risultavano fortemente positive (Fig. 6B). Nei campioni di ratti B27TR trattati con anti-TNF α mAb non fu osservato un

aumento di positività per TNF-R2 (Fig. 6D).

RT-PCR semiquantitativa

Nell'analisi RT-PCR è stato evidenziato una significativa down-regulation dei livelli di mRNA di TNF-R1 nel colon di ratti B27TR trattati con IgG₁,k se confrontati con F344 (Fig. 7A).

Il trattamento precoce con anti-TNF α mAb ha mantenuto i livelli di mRNA del TNF-R1 simile a quelli dei ratti di controllo (Fig. 7A).

Per quanto riguarda l'analisi del TNF-R2, l'mRNA era espresso a bassi livelli nel colon dei ratti F344, mentre era up-regolato nei ratti trattati con IgG_{2a},k (Fig. 7B).

Il trattamento precoce con anti-TNF α mAb manteneva i livelli di mRNA di TNF-R2 simili a quelli dei ratti di controllo (Fig. 7B).

Analisi dell'apoptosi con Fas/Fas-L e con il metodo TUNEL sulle sezioni di colon

Sia nei ratti di controllo che nei B27TR, Fas e Fas-L erano espressi dalle CEI e dalle cellule della lamina propria. Nei ratti F344, Fas era principalmente espresso dalle cellule della lamina propria mentre Fas-L era maggiormente espresso dalle CEI (Fig. 8A,D). Nei ratti B27TR trattati con IgG_{2a},k, il numero delle cellule Fas positive della lamina propria era significativamente diminuito, mentre il numero delle cellule Fas-L positive era aumentato (Fig. 8B,E e Tabella 3). In particolare, fu osservato un alto numero di cellule positive attorno alle cripte, vicino alla muscularis mucosae. Nelle CEI era aumentata l'espressione di Fas mentre la positività per Fas-L era diminuita (Fig. 8B,E e Tabella 3).

Il trattamento con anti-TNF α mAb aumentava significativamente il numero di cellule

Fas-positive nella lamina propria mentre la positività al Fas diminuiva nelle CEI (Fig. 8C e Tabella 3). Il trattamento con anti-TNF α mAb non ha mostrato alcun effetto sull'espressione di Fas-L nella lamina propria, rispetto ai ratti trattati con le IgG2a,k. Nelle cellule CEI, invece, il trattamento causava una lieve riduzione della positività al FAS-L (Fig. 8F e Tabella 3).

Nei ratti F344 le cellule apoptotiche (Tunel positive) erano rare e limitate all'epitelio della mucosa. I ratti B27TR mostravano un aumento significativo dell'indice apoptotico sia nell'epitelio che nella lamina propria. Nei ratti trattati precocemente con IgG2a,k furono identificate un alto numero di CEI apoptotiche. Il trattamento con anti-TNF α mAb induceva un aumento dell'apoptosi nelle cellule della lamina propria (Fig. 9 e Tabella 4).

Dosaggio dei livelli sierici delle citochine pro-infiammatorie

I livelli di IL-1 risultavano più alti nel siero dei ratti B27TR trattati con IgG2a,k sacrificati a 18 settimane rispetto ai ratti F344. Il trattamento precoce con anti-TNF α mAb inibiva la produzione di IL-1 (Tabella 5).

I livelli di IL-2 erano significativamente più alti nei ratti B27TR se confrontati con F344, e il trattamento anti-TNF α non aveva effetto sui livelli della citochina (Tabella 5).

Articolazioni Periferiche

Valutazione clinica

Nei B27TR di controllo trattati con IgG2a,k e nei B27TR non trattati, i segni clinici di coinvolgimento delle articolazioni del tarso/metatarso a livello delle zampe posteriori si manifestavano nelle settimane successive allo sviluppo dell'inflammatione intestinale, con episodi transitori di edema (Fig. 10). Alla diciottesima settimana, i ratti trattati con IgG2a,k presentavano eritema ed edema alle articolazioni raggiungendo uno score di 6.9 ± 1 , mentre i ratti B27TR non trattati, che mostravano gli stessi sintomi, raggiungevano uno score di 6.5 ± 2 . E' da notare che nel gruppo dei ratti trattati con IgG2k,a e in quello dei non trattati, 2 su 6 e 3 su 12 ratti rispettivamente, non hanno sviluppavano tali segni clinici. Quando gli animali furono sacrificati, a 18 settimane, non fu osservata nessuna deformazione articolare.

In ciascun animale, i segni patologici delle articolazioni periferiche sono stati valutati da due osservatori ciechi al trattamento ed in maniera autonoma secondo quanto descritto nel capitolo Materiali e Metodi (Fig. 11).

Il trattamento precoce con anti-TNF α mAb iniziato alla 9^o settimana, prima dello sviluppo dei sintomi intestinali, preveniva la comparsa oltre che della diarrea anche dell'edema ed eritema alle articolazioni periferiche.

I 12 B27TR non trattati e monitorati fino all'età di 18 settimane furono suddivisi in maniera casuale in due gruppi e sottoposti al trattamento con anti-TNF α mAb o con IgG2a,k fino all'età di 27 settimane.

Analisi istologica

Nei ratti trattati con IgG2a,k le articolazioni periferiche mostravano un edema diffuso sottocutaneo e nella fascia plantare, e un infiltrato infiammatorio, mentre la cute sovrastante appariva normale, senza segni di ipercheratosi o iperplasia del derma. Nel sottocutaneo, vicino all'inserzione dei tendini, spesso era evidente un diffuso infiltrato infiammatorio che si estendeva nella regione dell'entesi (Fig.12A-D). A livello della sinovia non fu riscontrata la presenza di infiltrato infiammatorio.

A livello dell'articolazione, la rima articolare cartilaginea si presentava con una superficie ondulata con un grado variabile di disorganizzazione delle fibre collagene, riduzione dello spessore dello strato cartilagineo e fenditure (Fig. 12C-F). Occasionalmente, nell'organizzazione strutturale della cartilagine articolare furono osservate delle aree di proliferazione di cellule simili a condrociti (condrociti-like) (Fig. 12F) e aree di ossificazione endocondrale.

Le alterazioni istologiche furono confermate anche dalla colorazione con blu di toluidina che ha messo in evidenza, nella rima cartilaginea, un'area estesa di matrice superficiale pallida, ad indicare necrosi e degenerazione dei condrociti. Queste cellule apparivano infatti con nuclei picnotici o addirittura prive di nuclei assumendo l'aspetto di cellule "fantasma" (Fig. 12F,G).

Nelle entesi esaminate era chiaramente visibile una proliferazione dei condrociti e di cellule condrociti-like. La loro presenza indicava la formazione di noduli condroidi e nuove aree di ossificazione endocondrale. In due ratti la rima ossea tra la fibrocartilagine calcificata e l'osso presentava un bordo irregolare. Nella maggior parte delle articolazioni coinvolte si potevano osservare formazioni di entesofiti periarticolari.

A livello osseo, sotto il periostio, spesso erano visibili erosioni con presenza di osteoclasti attivi (Fig. 12D,E).

Nei ratti trattati con anti-TNF α mAb nessun infiltrato infiammatorio fu riscontrato nelle articolazioni e nel tessuto periarticolare. L'organizzazione della cartilagine articolare e dell'entesi era mantenuta: la rima articolare era ben conservata e si osservava la presenza di condrociti disposti regolarmente in fila verso il tidemark dell'entesi (Fig. 13A-C). Non furono osservate erosioni ossee. I valori dello score istologico sono riportati nella Figura 11.

Analisi immunoistochimica

L'analisi immunoistochimica, nei ratti trattati con IgG2a,k, ha mostrato che la maggior parte delle cellule dell'infiltrato infiammatorio erano rappresentate da linfociti T CD3-positivi (Fig. 12B), mentre solo alcune cellule erano macrofagi CD68-positivi (Fig. 12C).

Su sezioni articolari nei ratti B27TR trattati con IgG2a,k fu condotta un'indagine immunoistochimica per identificare le cellule TNF α positive. Le cellule condrociti-like furono trovate positive per TNF α nelle zone di proliferazione della cartilagine articolare e anche nella zona di passaggio fibrocartilaginea dell'entesi (Fig. 14). Inoltre, alcuni vasi vicino all'entesi mostravano cellule positive al TNF α .

Successivamente furono studiate immunoistochimicamente le Smad1/5/8 fosforilate nucleari (pSmad1/5/8) che sappiamo essere marker specifici per la trasmissione del segnale delle proteine attivate nella formazione del tessuto osseo (BMP). Risultarono positive alla pSmad1/5/8 le cellule di aspetto simil-fibroblastico a livello delle entesi,

cellule infiammatorie e cellule rotondeggianti dall'aspetto condroblastico (Fig. 15A,B). Inoltre anche le cellule condrociti-like in fase proliferativa e pre-ipertrofica mostrarono immunopositività per pSmad1/5/8 nella fibrocartilagine delle entesi (Fig. 15C,D). Al contrario, i condrociti ipertrofici risultarono immunonegativi (Fig. 15D). A livello della cartilagine articolare i condrociti furono trovati positivi per pSmad 1/5/8 (Fig. 15E,F). Nei ratti trattati precocemente con anti-TNF α mAb né l'espressione del TNF α (Fig. 14D) né l'attivazione delle Smad1/5/8 furono riscontrate a livello delle articolazioni (Fig. 15G,H).

Fase tardiva dell'esperimento

Colon

Valutazioni cliniche

Dodici B27TR furono monitorati fino all'età di 18 settimane e successivamente suddivisi in maniera casuale e sottoposti al trattamento con anti-TNF α mAb o con IgG2a,k fino all'età di 27 settimane. Tra questi due gruppi, trattati e non trattati con anti-TNF α mAb, non furono osservate differenze significative di peso né prima né dopo il trattamento. Tutti i dodici B27TR prima dell'inizio del trattamento presentavano i sintomi clinici dell'infiammazione intestinale (diarrea) fin dall'undicesima settimana di vita. Dopo l'inizio del trattamento con l'anti-TNF α mAb i sintomi dell'infiammazione miglioravano fin dalla prima settimana di trattamento e lo score delle feci diminuiva fino alla normalizzazione (Fig. 1B,C). Al contrario, nel gruppo dei ratti trattati con

IgG2a,k il valore dello score della diarrea rimaneva alto.

Analisi istologica della parete colica

All'apertura dell'addome, anche a 27 settimane, i B27TR trattati con IgG2,k mostravano segni macroscopici di infiammazione.

All'osservazione istologica la mucosa di questi ratti mostrava danni più severi rispetto a quella dei ratti sacrificati alla 18° settimana (Fig. 16A). Le pieghe della mucosa erano per la maggior parte compromesse con ghiandole tubulari slargate e perdita delle cellule mucipare e delle cellule epiteliali. Nella lamina propria fu osservato un notevole infiltrato infiammatorio tra le ghiandole e attorno alle cripte ghiandolari e, nella sottomucosa, fu riscontrato edema e infiltrato perivascolare (Fig. 16A).

Il trattamento tardivo con anti-TNF α mAb non induceva una riduzione significativa dei segni di infiammazione, nonostante il miglioramento dei segni clinici (Fig. 16B). Lo score istologico dell'infiammazione intestinale è rappresentato nella Figura 4.

Espressione dei recettori del TNF α

Nella mucosa del colon fu valutato l'effetto del blocco tardivo del TNF α sull'espressione dei recettori R1 e R2, mediante analisi immunistochemica e RT-PCR.

Analisi immunistochemica

A 27 settimane, il colon dei ratti B27TR trattati con IgG2a,k mostrava immunonegatività per il TNF-R1 (Fig. 17A). Nelle CEI, il trattamento tardivo con anti-TNF α mAb aumentava l'espressione del TNF-R1 a livelli paragonabili a quelli dei ratti

di controllo F344 (Fig. 17A,B).

Nei ratti B27TR trattati con IgG2a,k le CEI e le cellule dell'infiltrato infiammatorio, sia nella mucosa che nella sottomucosa, risultavano fortemente positive per TNF-R2, mentre nei campioni di ratti B27TR trattati con anti-TNF α non fu osservata nessuna marcatura per il TNF-R2.

RT-PCR semiquantitativa

I risultati dell'RT-PCR, relativi all'espressione dei recettori del TNF α , osservati nella fase tardiva confermavano i dati ottenuti nella fase precoce. Fu evidenziato, infatti, che i livelli di mRNA di TNF-R1 nel colon di ratti B27TR trattati tardivamente con IgG_{2a,k} restavano invariati rispetto a quelli osservati nei ratti trattati precocemente.

Il trattamento tardivo con anticorpo anti-TNF α riportava i livelli di mRNA per il TNF-R1 ai valori osservati nei B27TR trattati precocemente (Fig. 7A).

Per quanto riguarda l'analisi del TNF-R2, l'mRNA rimaneva aumentato nei ratti trattati con IgG_{2a,k}, e il trattamento tardivo con anti-TNF α riduceva significativamente l'espressione di TNF-R2, riportandola ai livelli di quella osservata nei ratti trattati precocemente con anti-TNF α e nei controlli F344 (Fig. 7B).

Analisi dell'apoptosi con Fas/Fas-L e con il metodo TUNEL nelle sezioni di colon

Il quadro apoptotico era simile a quello osservato nei ratti sacrificati a 18 settimane, ad eccezione di una leggera riduzione della positività sia di Fas che di Fas-L nelle CEI della mucosa nei ratti trattati con IgG_{2a,k}. Il trattamento con anti-TNF α mAb aumentava significativamente il numero di cellule Fas-positive nella lamina propria

anche nei ratti trattati tardivamente (Tabella 3). Il trattamento tardivo non aveva effetto sull'espressione di Fas-L nella lamina propria rispetto ai ratti trattati con le IgG2a,k. Nelle cellule CEI, invece, il trattamento tardivo causava un leggero aumento alla positività per Fas-L (Tabella 3).

I ratti B27TR trattati con IgG2a,k mostrano un aumento significativo dell'indice apoptotico sia nell'epitelio che nella lamina propria. Come osservato nei ratti trattati sacrificati a 18 settimane, anche nel colon dei ratti a 27 settimane di età sono state identificate un alto numero di cellule CEI apoptotiche. Il trattamento con anticorpo anti-TNF α induceva un aumento dell'apoptosi nelle cellule della lamina propria (Tabella 4).

Dosaggio dei livelli sierici delle citochine pro-infiammatorie

I livelli di IL-1 erano diminuiti nel siero dei ratti B27TR trattati con IgG2a,k sacrificati a 27 settimane. Il trattamento tardivo con anti-TNF α non riusciva a ridurre i livelli sierici di IL-1 (Tabella 5).

I livelli di IL-2 rimanevano significativamente più alti nei ratti B27TR come osservato nella prima fase, e il trattamento tardivo con anti-TNF α mAb non aveva effetto sui livelli della citochina (Tabella 5).

Articolazioni Periferiche

Valutazione clinica

Il gruppo dei ratti non trattati fu monitorato e suddiviso in modo random, alla diciottesima settimana di età, per il trattamento tardivo con anti-TNF α mAb o con l'isotipo IgG2a,k.

Prima dell'inizio del trattamento la maggior parte dei ratti mostravano eritema ed edema a livello delle articolazioni con uno score di 6.5 ± 2 . Tre ratti su 12 non avevano sviluppato nessun segno clinico a livello delle articolazioni. Durante il trattamento, dalla diciottesima fino alla ventisettesima settimana, i B27TR trattati con IgG2a,k mostravano ancora diarrea e un aumento dello score a livello articolare da 6.5 ± 2 fino a 8.0 ± 2 , registrato al termine dell'esperimento. Due animali non hanno manifestato alcun segno di infiammazione articolare durante il trattamento. Quando gli animali trattati con IgG2a,k o con anti-TNF α mAb furono sacrificati, a 27 settimane, non fu osservata nessuna deformazione articolare.

Analisi istologica

Nei B27TR trattati con IgG2a,k, sacrificati a 27 settimane, furono riscontrate modificazioni istopatologiche a carico delle articolazioni simili a quelle osservate negli animali sacrificati a 18 settimane di età. Nelle entesi esaminate era chiaramente visibile una proliferazione dei condrociti e di cellule condrociti-like (Fig. 18A,B). La loro presenza indicava la formazione di noduli condroidi e nuove aree di ossificazione endocondrale (Fig. 18C). Pertanto la gravità del danno sembrerebbe non essere

direttamente correlata con il passare delle settimane, come invece fu riscontrato a livello intestinale.

Nei B27TR trattati con anti-TNF α mAb i segni di infiammazione intestinale si sono ridotti dopo la prima settimana di trattamento e successivamente si sono normalizzati. Rispetto ai segni clinici di infiammazione intestinale, in tre su sei animali trattati si potevano ancora osservare, sebbene transitori, episodi di eritema ed edema agli arti posteriori, raggiungendo uno score medio di 6.0 ± 1 .

Due dei 6 ratti avevano una remissione completa, mentre uno non aveva mai manifestato segni di artrite durante gli esperimenti. Il trattamento con anti-TNF α mAb riduceva l'infiltrato infiammatorio nel tessuto sottocutaneo. I tre ratti B27TR con episodi clinici di eritema ed edema durante il trattamento sviluppavano, sulla superficie cartilaginea articolare, aree di degenerazione/necrosi dei condrociti (Fig. 18D). Nelle entesi furono trovate: un tidemark irregolare tra fibrocartilagine ed osso, condrociti non allineati in file, aree di proliferazione dei condrociti ed ossificazione endocondrale (Fig. 18E,F). Proliferazione dei condrociti fu osservata occasionalmente anche nei tendini, lontani dalle entesi. Nei ratti trattati con anti-TNF α mAb raramente furono individuate zone di erosione ossea.

Lo score istologico dei danni a livello articolare è riportato in Figura 11B.

Nei B27TR non fu mai osservato un coinvolgimento patologico della sinovia.

I ratti di controllo F344 non mostravano nessun segno clinico e/o istologico di infiammazione né a livello intestinale né a livello articolare.

Analisi immunoistochimica

Nelle aree dove furono osservati i condrociti in proliferazione, era presente immunopositività per il TNF α (Fig. 14C). La positività per pSmad1/5/8 fu osservata nella cartilagine articolare e a livello dell'entesi. In particolare, i condrociti proliferanti a livello della fibrocartilagine dell'entesi mostravano una forte immunopositività per pSmad1/5/8 (Fig. 15I,J). Immunopositività fu osservata anche nei due ratti trattati con anti-TNF α mAb che mostravano invece una remissione completa delle alterazioni articolari.

Non furono evidenziate differenze nell'espressione della pSmad1/5/8 tra i ratti trattati con IgG2a,k a 18 e 27 settimane.

Tavola 3: Analisi statistica per le cellule Fas e Fas-L positive.

		F344	B27TR +IgG 18 settimane	B27TR+Ab 18 sett.	B27TR +IgG 27 sett.	B27TR+ Ab 27 sett.
Fas	CEI	9,14±5,06	18,01±0,54*	5,30±2,43 [§]	15,69±5,72*	5,64±1,28 [§]
	LP	33,87±7,59	19,85±2,25*	26,07±3,05 [§]	21,33±2,3*	27,57±6,9
	CEI	12,21±3,49	5,59±3,46*	3,77±3,64*	3,94±2,74*	7,31±4,93*
Fas-L	LP	5,23±1,36	13,48±1,86**	14,2±2,8	11,39±2,14**	11,87±2,23

I dati sono mostrati come media ± SD. CEI= cellule dell'epitelio intestinale, LP= lamina propria. *=p<0.05, **=p<0.01 versus F344; §=p<0.05 versus HLA-B27 ratti transgenici trattati con IgG

Tavola 4: Analisi statistica per le cellule TUNEL-positive.

	F344	B27TR + IgG 18 settimane	B27TR + Ab 18 settimane	B27TR + IgG 27 settimane	B27TR + Ab 27 settimane
CEI	0,36±0,26	68±10,9**	35,4±7,2** ^{§§}	56,8±13,2**	47±7,9**
LP	0,14±0,2	6,3±1,5**	42,2±4,1** ^{§§}	4,7±2,7*	38,3±7,3** ^{§§}

I dati sono mostrati come media ± SD. *=p<0.05, **=p<0.01 versus F344; §§=p<0.01 versus ratti transgenici HLA-B27 trattati con IgG. CEI= Cellule epiteliali intestinali, LP= lamina propria

Tavola 5: livelli sierici di IL-1 e IL-2 con il test ELISA.

	F344	B27TR + IgG 18 settimane	B27TR + Ab 18settimane	B27TR + IgG 27 settimane	B27TR +Ab 27settimane
IL-1	26,8±4,29	48,46±13,78	21,77±6,95	39,25±15,51	38,83±7,8
IL-2	141,48±10,1	159,89±1,46	162,9±2,83	163,23±2,87	158,8±2,39

I dati sono mostrati come media (pg/ml) ± SEM. IL-1= Interleuchina 1, IL-2= Interleuchina 2

DISCUSSIONE

I nostri studi si sono focalizzati sugli effetti del blocco del TNF α sull'infiammazione intestinale e articolare sia come trattamento preventivo che come cura in un modello sperimentale di ratti transgenici per l'allele umano HLA-B27 (B27TR), che sviluppano spontaneamente una patologia simile alla spondiloartropatia (SpA) umana con coinvolgimento intestinale e articolare. I nostri dati mostrano che nei B27TR i danni a livello intestinale precedono sempre quelli a livello articolare [47, 48, 50, 51, 54, 62], e mostrano chiaramente che il blocco del TNF α può prevenire lo sviluppo dell'infiammazione intestinale e successivamente di quella articolare. Il blocco precoce e preventivo del TNF α , iniziato prima che si sviluppi alcun sintomo clinico di infiammazione intestinale, inibisce notevolmente l'insorgenza di infiammazione nel colon dei B27TR. Al contrario, il trattamento è significativamente meno efficace se iniziato quando i sintomi si sono già sviluppati, migliorando soltanto i segni clinici ma non riducendo i caratteri istopatologici. A livello articolare il blocco precoce del TNF α previene lo sviluppo delle entesiti, che sono le manifestazioni infiammatorie articolari più frequentemente osservate in questi ratti. Al contrario il trattamento tardivo induce una riduzione dei segni macroscopici, osservati prima dell'inizio del trattamento, se pure rimangono rare manifestazioni di infiammazione acuta che comunque non evolvono in danni articolari irreversibili.

I B27TR sono un buon modello sperimentale di infiammazione intestinale, utilizzato in molti studi per valutare l'attività e i meccanismi di azione di molecole anti-infiammatorie [60, 61, 63, 64], da cui il nostro interesse sull'effetto del blocco di una

delle citochine maggiormente coinvolte nell'infiammazione. Quando usato come trattamento precoce, il blocco del TNF α previene l'insorgenza delle manifestazioni patologiche dell'infiammazione intestinale (diarrea) mentre, in fase avanzata, è capace di migliorare tali sintomi senza risolverli completamente, rimanendo in parte i danni istopatologici a carico della mucosa. L'epitelio intestinale gioca un ruolo attivo nel mantenimento dell'omeostasi della mucosa [65]. La secrezione di citochine e chemochine pro-infiammatorie, come il TNF α , IL-1 e IL-6 da parte delle cellule epiteliali, è parte integrante della risposta immunitaria che inizia e/o mantiene l'infiammazione intestinale [65]. Diversi modelli sperimentali suggeriscono che l'eziologia dell'IBD non è solo correlata ad anomalie immunologiche ma anche a difetti nell'epitelio interstiziale [66], che forma una barriera fisiologica contro gli antigeni e microrganismi patogeni del lume intestinale [67, 68]. L'importante osservazione degli effetti protettivi nei campioni di B27TR trattati precocemente indica l'effetto positivo dell'anti-TNF α sul decorso dell'infiammazione della mucosa, in una condizione di suscettibilità legata alla sovra-espressione del gene HLA-B27. La notevole efficacia del trattamento precoce può anche essere dovuta ad una scarsa o assente infiammazione della mucosa negli animali all'inizio dell'esperimento, considerando l'assenza di segni clinici. A 18 settimane, le modificazioni patologiche osservate sono invece tipiche di uno stato d'infiammazione cronica, e l'utilizzo del blocco del TNF α , in fase avanzata sembra non avere effetto sui danni della mucosa del colon. Questo è in contrasto con un recente studio fatto su un modello murino di colite cronica [69] dove un trattamento tardivo con anti-TNF α migliorava significativamente i segni clinici e i caratteri istopatologici.

L'efficacia della terapia con *infliximab* nelle IBD, concomitanti con SA, nella

prevenzione di ricadute [43] potrebbe pertanto essere dovuta, almeno in parte, al mantenimento dell'integrità della mucosa intestinale.

Nei B27TR, oltre al TNF α , sono coinvolte altre citochine ed è probabile l'esistenza di un meccanismo immunitario più complesso di disregolazione cellulare che favorisce e sostiene lo stato infiammatorio. Gli alti livelli di IL-1 e IL-2 trovati nei ratti trattati o non trattati con anti-TNF α mAb, a 27 settimane di età, potrebbero parzialmente spiegare l'inefficacia del trattamento tardivo.

Gli effetti ottenuti con il trattamento precoce potrebbero essere utili in quei pazienti con SpA che mostrano microlesioni intestinali con segni subclinici di infiammazione intestinale.

L'infiammazione cronica nei ratti B27TR è considerata un risultato delle alterazioni indotte dal transgene HLA-B27 nei processi antigenici e nelle conseguenti risposte immunologiche all'ambiente microbico nel lume gastrointestinale [70, 71]. Diverse sperimentazioni su modelli animali di colite sostengono il concetto che l'IBD sia causata dalla risposta immunitaria aggressiva sui batteri commensali non patogeni in ospiti geneticamente suscettibili [66]. In questo contesto, il ruolo del TNF α e dei suoi recettori è piuttosto controverso, sembra infatti agire secondo diverse modalità, dipendendo dal tipo di tessuto e dal target cellulare [13, 72-75].

Nelle CEI il TNF-R1 sembra essere coinvolto nel "inducibile immune privilege", un meccanismo in grado di limitare la diffusione attraverso i tessuti dell'infiltrato linfocitario tollerato, come può avvenire, per esempio, nel colon [13, 15, 72, 73]. Nei ratti B27TR trattati con IgG2a,k, la riduzione significativa dell'espressione del TNF-R1 osservata nelle CEI potrebbe essere coinvolta nella perdita di questi meccanismi, visto il ruolo di questo recettore, favorendo un'incontrollata proliferazione delle cellule

dell'infiltrato infiammatorio. Questa ipotesi è supportata dalla riduzione dell'espressione di Fas-L nelle CEI oltre che dalla riduzione del numero di cellule Fas-positivo nella lamina propria. Infatti le cellule dell'infiltrato suscettibili all'apoptosi con un meccanismo Fas-mediato sono diminuite nei ratti trattati con IgG2a,k, mentre aumenta in queste cellule l'espressione del Fas-L. Le CEI invece esprimono un numero maggiore di cellule Fas positive rispetto al controllo. Tutto questo suggerisce un'alta sensibilità delle CEI ad uno stimolo pro-apoptotico, che potrebbe spiegare l'aumento della perdita delle cellule epiteliali osservato nei ratti trattati con IgG2a,k. Il Fas-L è espresso sulla superficie dei linfociti attivati, inducendo apoptosi nelle cellule esprimenti Fas, quali le cellule epiteliali del colon [76].

Il trattamento con anti-TNF α aumenta l'espressione di Fas nelle cellule dell'infiltrato nella lamina propria e riduce significativamente le CEI Fas-positivo, ma non ha effetti sull'espressione cellulare di Fas-L, eccetto che per un lieve incremento delle cellule CEI Fas-L-positivo alla 27^o settimana di età. Tale meccanismo è stato osservato nella RCU, dove il danno alla mucosa è stato associato ad un massivo infiltrato di linfociti esprimenti Fas-L [76]. Oltre al TNF α , altre citochine potrebbero essere responsabili dell'aumento dell'espressione di Fas-L di queste cellule. IL-2 induce, infatti, l'attivazione delle cellule T e la loro proliferazione, aumentando l'espressione di Fas-L sulle cellule T stesse [77]. Infatti, abbiamo osservato alti livelli di IL-2 nei ratti B27TR, e questo potrebbe in parte spiegare l'aumento dell'espressione di Fas-L. I nostri risultati confermano dati di altri autori sulla neutralizzazione del TNF α nel topo SAMP/Yitc, un modello di ileite, dove è stata osservata una protezione dall'apoptosi delle CEI e l'induzione della morte cellulare programmata nelle cellule mononucleate della lamina propria. In contrasto con i nostri dati, in questo studio non è stato trovato un

meccanismo mediato da Fas [74].

Nella mucosa del colon dei B27TR il saggio del TUNEL ha mostrato un aumento delle cellule apoptotiche rispetto ai ratti di controllo F344. Il maggior numero di cellule apoptotiche è stato osservato nelle aree corrispondenti a quelle in cui vi è un alto numero di cellule Fas positive. In particolare, nei ratti trattati con IgG2a,k, l'apoptosi aumentava a livello epiteliale suggerendo un meccanismo Fas-mediato di deplezione delle CEI. Inoltre, sono state trovate poche cellule apoptotiche nella lamina propria, quindi una diminuita apoptosi tra le cellule dell'infiltrato infiammatorio che ne favorirebbe l'aumento nel colon di questi ratti. Il trattamento con anti-TNF α porta, invece, ad un aumento significativo delle cellule TUNEL positive nella lamina propria, indicando l'attivazione e/o il mantenimento dei meccanismi di difesa contro la formazione di un infiltrato massivo.

Perciò, il blocco del TNF α nei ratti B27TR contribuisce, attraverso l'asse Fas-FasL e il controllo apoptotico, al mantenimento dell'integrità e al funzionamento della mucosa. Questi risultati confermano e supportano il meccanismo ipotizzato per l'effetto dell'*infliximab* nel MC, che elimina le cellule T in eccesso tramite l'induzione dell'apoptosi [78]. Il ruolo del recettore TNF-R2 in questo scenario non può essere facilmente chiarito. Il TNF-R2, infatti, non è espresso costitutivamente e non ha effetti in condizioni normali, ma gioca un ruolo importante in condizioni patologiche come il MC, RCU e nei modelli animali di colite [79]. I nostri esperimenti sembrano confermare dati precedenti in letteratura che mostrano un aumento di espressione del TNF-R2 in diverse forme di infiammazione intestinale [79]. Pertanto, una up-regolazione del TNF-R2 potrebbe essere coinvolta nella perpetuazione di infiammazione nella colite e nell'alterazione delle funzioni protettive delle cellule

dell'epitelio.

In conclusione, questi dati indicano che il blocco precoce del TNF α gioca un ruolo cruciale nella prevenzione della diffusione dell'inflammatione nella mucosa intestinale, mantenendo l'omeostasi del processo apoptotico.

Il trattamento precoce con anti-TNF α mAb si è dimostrato efficace anche nel prevenire l'insorgenza di inflammatione articolare. A differenza dei dati riportati precedentemente in letteratura su questi ratti, i nostri risultati indicano che le entesi sono le prime strutture ad essere coinvolte nel processo infiammatorio. E' infatti importante rimarcare che i nostri animali non hanno sviluppato sinovite ma principalmente entesite. In entrambe i gruppi di B27TR, quelli trattati con IgG2a,k nella fase precoce e quelli non trattati ma monitorati fino alle 18 settimane di età, abbiamo osservato la comparsa di edema ed eritema degli arti posteriori, ma l'analisi istologica dell'articolazione tarso/metatarsale ha mostrato che questa fase della malattia non era dovuta all'inflammatione della sinovia, ma piuttosto dell'entesi. Queste conclusioni sono in conflitto con i risultati precedentemente descritti su questi ratti [47, 48, 50, 60]. La gravità dei danni alle entesi e all'osso non era collegata all'età, ossia non si è osservato un peggioramento legato al passare del tempo come invece è stato riscontrato per i danni del tratto gastrointestinale. Bisogna tuttavia considerare che il tempo di durata dei nostri esperimenti è stato relativamente breve rispetto ad altri studi su questo modello animale [47, 48, 51]. Inoltre, il nostro studio è stato progettato con un tempo di trattamento anti-TNF α di uguale durata, sia come preventivo che come curativo, per poter meglio confrontare i risultati tra i due gruppi. In accordo con la letteratura, 18 settimane di età rappresentano, per questo modello, un tempo sufficiente per lo sviluppo dei primi sintomi e dei primi danni istologici e può permettere di valutare l'effetto preventivo del

blocco del TNF α , sia a livello intestinale che articolare. Se il protocollo avesse previsto un tempo di trattamento più lungo, probabilmente si sarebbero potute osservare anchilosi o anche coinvolgimento sinoviale.

Questa ipotesi è avvalorata dalle caratteristiche istopatologiche iniziali della malattia da noi osservate, quali, l'edema sottocutaneo e l'infiltrato infiammatorio vicino ai tendini e alle entesi, in cui predominano le cellule T, insieme a foci di rimodellamento cartilagineo ed osseo. Inoltre questa ipotesi può essere avvalorata dalla nostra osservazione dell'attivazione del segnale mediato da Smad1/5/8, un sistema di trasduzione condiviso da differenti BMP, nelle entesi affette e nelle cartilagini articolari dei ratti trattati con IgG2a,k [80, 81]. E' noto che il coinvolgimento delle entesi è l'evento cardine nello sviluppo di SpA nell'uomo [7, 82], nonostante la relazione funzionale/ patologica tra entesi e sinovia adiacente non è ancora stata del tutto chiarita. Precedenti studi sui ratti della linea 33-3 su background Fisher 344 hanno mostrato un coinvolgimento sinoviale con artrite, ma nessun coinvolgimento delle entesi [43, 50]. Nella linea 33-3 su background LEWIS, è stato visto che una sovra-espressione di h α 2m promuove l'instaurarsi di artrite e spondilite in assenza di infiammazione intestinale [58]. Segni clinici di artrite sono stati riscontrati negli arti posteriori di questi ratti, mentre l'entesite fu osservata nelle articolazioni vertebrali della coda dalla 31^o settimana di vita. Così gli autori hanno suggerito che il background genetico può avere una grande influenza sull'incidenza, aspetto e gravità della malattia [58]. I B27TR su background LEWIS sarebbero più predisposti al coinvolgimento articolare rispetto ai B27TR su background F344. Malgrado ciò, nei nostri esperimenti sono stati osservati segni patologici a carico delle entesi nelle zampe posteriori dei B27TR su background F344 già alle 18 settimane di vita.

Nei ratti trattati precocemente, il blocco del TNF α previene chiaramente le manifestazioni gastrointestinali e lo sviluppo delle entesiti, mentre nel trattamento tardivo induce una riduzione dei segni macroscopici sia gastrointestinali che articolari, osservati prima dell'inizio del trattamento, mantenendo tuttavia, a livello articolare, rare manifestazioni di infiammazione acuta. Questo suggerisce che il blocco del TNF α può prevenire l'alterazione delle articolazioni prima di evolvere in un danno irreversibile, anche nei ratti che hanno già sviluppato infiammazione intestinale. Inoltre, l'effetto del trattamento tardivo del blocco del TNF α nelle articolazioni periferiche, a livello istopatologico, sembra essere comunque più efficace rispetto all'effetto sulla parete colica. Questo potrebbe essere dovuto al fatto che, alla diciottesima settimana di età, la mucosa gastroenterica mostrava un'infiammazione cronica sviluppatasi a partire dalla tredicesima settimana con un andamento progressivo e ingravescente. A livello articolare, invece, gli episodi transitori di eritema ed edema non hanno portato a severe modificazioni dell'architettura articolare. Nel gruppo trattato tardivamente, il coinvolgimento articolare nei ratti trattati con IgG α ,k è stato più severo che nei tre animali trattati con anti-TNF α che ancora manifestavano segni di eritema ed edema. Il persistere dell'infiammazione nelle articolazioni periferiche nei ratti trattati con IgG α ,k andava in parallelo con la malattia a livello gastrointestinale. Il più importante effetto ottenuto con il blocco del TNF α è stato la prevenzione o riduzione dell'infiltrato infiammatorio, rispettivamente nel trattamento precoce e tardivo. Un'alta espressione del TNF α è stata osservata nelle aree di proliferazione dei condrociti nei B27TR trattati con IgG α ,k. Ciò indica che questa citochina può essere coinvolta nella formazione di nuova cartilagine e nel processo di rimodellamento osseo, come è stato suggerito anche in altri studi [83].

Le pSmad1/5/8 sono state osservate nei B27TR trattati con IgG2a,k sia a 18 che a 27 settimane di età. In particolare l'attivazione delle Smad 1/5/8 è stata osservata nella fibrocartilagine e nelle cellule in differenziazione condrogenica, in prossimità dell'entesi. Nei ratti trattati precocemente con anti-TNF α mAb non è stata osservata espressione né di TNF α né di pSmad1/5/8, sebbene una debole immunopositività per il TNF α fu osservata nelle aree di proliferazione cartilaginea negli animali trattati tardivamente con anti-TNF α mAb che ancora mostravano danni istopatologici.

Per questo motivo il blocco precoce dell'anti-TNF α sembra avere più efficacia nel ridurre l'infiammazione articolare piuttosto che nell'inibire la formazione di nuova cartilagine e osso rispetto al trattamento tardivo. Infatti il trattamento precoce potrebbe migliorare l'infiammazione senza però influenzare l'attivazione delle vie del segnale coinvolte nel rimodellamento osseo. Questi risultati sono in accordo con dati recenti su modelli animali di SpA e con osservazioni cliniche nella SA umana, che indicano come il controllo dell'infiammazione può non essere sufficiente ad impedire la progressione della malattia verso l'anchilosi in questi pazienti [83, 84].

Il ruolo del TNF α e le strategie terapeutiche anti-TNF α nell'evoluzione delle patologie correlate a disordini istopatologici a livello entesale è un argomento importante e ancora dibattuto. Nella SpA umana, i bloccanti del TNF α inibiscono efficacemente l'infiammazione, come mostrato dalla attenuazione di segni e sintomi clinici, e probabilmente prevengono i danni di erosione ossea [84]. Tuttavia l'ossificazione dopo che il danno è già iniziato potrebbe non essere influenzata dagli agenti bloccanti il TNF α , poiché questi farmaci non inibiscono la condrogenesi [84]. E' stato anche ipotizzato che l'infiammazione e il rimodellamento osseo possano essere in qualche modo correlate ma al tempo stesso siano processi ampiamente indipendenti e

probabilmente controllati da diversi fattori genetici [83,84]. Il nostro lavoro può risolvere questa controversia, che sembra in parte correlata agli specifici modelli animali utilizzati nei vari studi [83], ma supportano la teoria del disaccoppiamento tra infiammazione e rimodellamento osseo nelle malattie correlate alle entesiti. In particolare, i nostri risultati indicano chiaramente che nei B27TR sono attivate le vie del segnale che inducono rimodellamento osseo, e che queste sembrano verosimilmente coinvolte nella progressione della malattia. Tuttavia, gli episodi di infiammazione acuta, che si osservavano prima dell'inizio del trattamento nel gruppo assegnato alla fase tardiva, potrebbero aver innescato dei meccanismi complessi di rimodellamento osseo che non potevano successivamente essere modulati dal blocco del TNF α .

In conclusione, i nostri dati indicano che il blocco del TNF α , iniziato nelle prime fasi della malattia, previene significativamente lo sviluppo dell'infiammazione, inizialmente a livello dell'intestino e successivamente a livello delle articolazioni periferiche. Inoltre, i nostri dati mostrano che nei B27TR il danno a carico delle articolazioni periferiche inizia a livello delle entesi, in accordo con quanto è stato già ipotizzato nella patologia umana [82]. Questo suggerisce che il trattamento con gli agenti anti-TNF α dovrebbe essere iniziato il prima possibile per prevenire l'evoluzione della malattia e lo sviluppo dell'entesite, nonché l'evoluzione stessa dell'entesite in sinovite secondaria.

BIBLIOGRAFIA

1. **McGonagle D**, Gibbon W, Emery P. Classification of inflammatory arthritis by entheses. *Lancet*.1998; 352: 1137-40.
2. **Benjamin M** and Ralphs JR. The attachment of tendons and ligaments to bone. In Archer CW, Caterson B, Benjamin M, Ralphs JR (eds) *Biology of the Synovial Joint*. Gordon & Breach Amsterdam. 1999; pp. 361–371.
3. **Benjamin M** and McGonagle D. The entheses organ concept and its relevance to the spondyloarthropathies. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2009; 649:57-70
4. **Benjamin M**, Kumai T, Milz S *et al.* The skeletal attachment of tendons-tendon “entheses”. *Comp Bio and Physiol.* 2002; 133:931-945
5. **Benjamin M** and McGonagle D. The anatomical basis for disease localisation in seronegative spondyloarthropathy at entheses and related sites. *Journ of Anat.* 2001; 199:505-526.
6. **McGonagle D**, Benjamin M, Marzo-Ortega H *et al.* Advances in the understanding of enthesal inflammation. *Curr Rheumatol Rep.* 2002; 4;500-506.
7. **McGonagle D**, Lories RJ, Tan AL *et al.* The concept of a "synovio-enthesal complex" and its implications for understanding joint inflammation and damage in psoriatic arthritis and beyond. *Arthritis Rheum.* 2007; 56: 2482-91.
8. **Ehrenfeld M**. Spondyloarthropathies from Shoenfeld *et al.* (eds): *Diagnostic Criteria in Autoimmune disease.* (ed Humana Press). 2008; 38:195-200
9. **Van der Linden S** and von der Heijde D. Ankylosing Spondylitis. In Harris ED jr, Ruddy S, Sledge CB, editors. *Kelley’s Textbook of Rheumatology*, (4th ed.

Philadelphia: Saunders). 2001: 1039-53.

10. **Van der Linden S**, Valkenburg HA, Cats A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 1984; 27:361-8.

11. **Cauli A**, Dessoie G, Nurchis PP, *et al.* The role of HLA-B27 molecules in the pathogenesis of ankylosing spondylitis; *Reumatismo*, 2002; 54(3):266-271

12. **Hanai H**, Watanabe F, Yamada M, *et al.* Correlation of serum soluble TNF-alpha receptors I and II levels with disease activity in patients with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2004; 99:1532-8.

13. **Pinkoski MJ** and Green DR. Apoptosis in the Regulation of Immune Responses. *J Rheumatol* 2005; 32(Suppl. 74):19-25.

14. **Boatright KM**, Renatus M, Scott FL, *et al.* A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell* 2003; 1:529-41.

15. **Bonfoco E**, Stuart PM, Brunner T, *et al.* Inducible nonlymphoid expression of Fas ligand is responsible for superantigen-induced peripheral deletion of T cells. *Immunity* 1998; 9:711-20.

16. **Pinkoski MJ**, Droin NM, Green DR. Tumor necrosis factor alpha up-regulates non-lymphoid Fas-ligand following superantigen-induced peripheral lymphocyte activation. *J Biol Chem* 2002; 277:42380-5.

17. **Pinkoski MJ**, Droin NM, Lin T, *et al.* Nonlymphoid Fas ligand in peptide-induced peripheral lymphocyte deletion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:16174-9.

18. **De Vos M**. Joint involvement associated with inflammatory bowel disease. *Dig Dis*. 2009; 27:511-5.

19. **Gilbert LC**, Rubin J, Nanes MS. The p55 TNF receptor mediates TNF inhibition of

osteoblast differentiation independently of apoptosis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 288:1011-8.

20. **Redlich K**, Hayer S, Ricci R *et al.* Osteoclast are essential for TNF α mediated joint destruction. *J Clin Invest* 2002; 110: 1419-1427

21. **Braun J.**, Bollow M., Neure L. *et al.* 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.

22. **Khan MA**, Mathieu A., Sorrentino R, *et al.* The pathogenic role of HLA-B27 and its subtype. *Autoimmun Rev.* 2007; 6: 183-9.

23. **Khan MA.** HLA-B27 polymorphism and association with disease. *J Rheumatol* 2000; 27:1110-4.

24. **Mathieu A**, Paladini F, Vacca A, *et al.* The interplay between the geographic distribution of HLA-B27 alleles and their role in infectious and autoimmune diseases: a unifying hypothesis. *Autoimmun Rev.* 2009; 8:420-5.

25. **La Nasa G**, Mathieu A, Mulargia M, *et al.* Association of the HLA-A2, CW2, B27, S31, DR2 haplotype with ankylosing spondylitis. A possible role of non-B27 factors in the disease. *Disease Markers* 1993; 11: 191-203.

26. **Mear JP**, Schreiber KL, Munz C, *et al.* 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.

27. **Lipsky PE.** Spondyloarthropathies. In: Klippel JH, Dieppe PA, editors. *Rheumatology* 2nd ed. London: Mosby, 1999; 6.12.1-12.

28. **Khare SD**, Hansen J, Luthra HS, *et al.* HLA-B27 heavy chains contribute to spontaneous inflammatory disease in B27/ human beta2-microglobulin double transgenic mice with disrupted mouse beta2-microglobulin. *The American Society for Clinical Investigation* 1996; 98: 2746-55.
29. **Allen RL**, O'Callaghan CA, Mc Michael AJ. *et al.* Cutting edge: HLA-B27 can form a novel b2- microglobulin-free heavy chain homodimer structure. *J Immunol* 1999; 162: 5045-8.
30. **Smith R**. Treatment of rheumatoid arthritis by colectomy. *Ann Surg.* 1922; 76:515-78.
31. **Wright V** and Watkinson G. The arthritis of ulcerative colitis. *Br Med J.* 1965; 2:670-5.
32. **Wright V** and Moll JMH. Seronegative polyarthritides. Amsterdam: North Holland Publishing Company; 1976.
33. **Salvarani C** and Fries W. Clinical features and epidemiology of spondyloarthritides associated with inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 2449-2455.
34. **De Keyser F**, Elewaut D, De Vos M, *et al.* Bowel inflammation and the spondyloarthropathies. *Rheum Dis Clin North Am* 1998; 24:785-813.
35. **De Keyser F**, Van den Bosch F, Mielants H. Anti-TNF α therapy in ankylosing spondylitis *Cytokine* 2006; 33:294-298.
37. **Elewaut D** and Matucci-Cerinic M, Treatment of ankylosing spondylitis and extra-articular manifestations in everyday rheumatology practice; *Reumatology* 2009; 48:1029-1035.

38. **Van den Bosch F**, Kruithof E, Baeten D, *et al.* Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor α (infliximab) versus placebo in active spondyloarthritis. *Arthritis Rheum* 2002; 46:755e65.
39. **Van der Heijde D**, Dijkmans B, Geusens P, *et al.* Ankylosing spondylitis study for the evaluation of recombinant infliximab therapy study group. Efficacy and safety of infliximab in patients with ankylosing spondylitis: results of a randomized, placebo-controlled trial (ASSERT). *Arthritis Rheum* 2005; 52:582e91.
40. **Davis JC Jr**, van der Heijde DM, Braun J *et al.* Efficacy and safety of up to 192 weeks of etanercept therapy in patients with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis*, 2008; 67:346-52.
41. **Brandt J**, Khariouzov A, Listing J *et al.* Six-month results of a double-blind, placebo controlled trial of etanercept treatment in patients with active ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 2003; 48:1667–75.
42. **Van der Heijde D**, Kivitz A, Schiff MH *et al.* ATLAS Study Group: efficacy and safety of adalimumab in patients with ankylosing spondylitis. Results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 2006;54: 2136–46.
43. **Braun J**, Baraliakos X, Listing J, *et al.* Differences in the incidence of flares or new onset of inflammatory bowel disease in patients with ankylosing spondylitis exposed to therapy with anti-tumor necrosis factor α agents *Arthritis Rheum* 2007; 57:639-647.
44. **Gratacos J**, Collado A, Filella X, *et al.* Serum cytokines (IL-6, TNF- α , IL-1 beta and IFN- γ) in ankylosing spondylitis: a close correlation between serum IL-6 and disease activity and severity. *Br J Rheumatol* 1994; 33:927e31.
45. **De Keyser F** and Mielants H. The gut in ankylosing spondylitis and other spondylarthropathies: inflammation beneath the surface. *J Rheumatol* 2003; 30:2306e7.

46. **Present D.** The efficacy of infliximab in Crohn's disease. Healing of fistulae. *Aliment Pharmacol Ther* 1999; 13:23e8.
47. **Hammer RE,** Maika SD, Richardson JA, *et al.* Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human β 2m: an animal model of HLA-B27-associated human disorders. *Cell* 1990; 63:1099-112.
48. **Taurog JD,** Maika SD, Simmons WA, *et al.* Susceptibility to inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rat lines correlates with the level of B27 expression. *J Immunol* 1993;150:4168-78.
49. **Breban M,** Hacquard-Bouder C, Falgarone G. Animal model of HLA-B27 associated disease. *Curr Mol Med* 2004;4:31-40.
50. **Rath HC,** Herfarth HH, Ikeda JS, *et al.* Normal luminal bacteria, especially *Bacteroides* species, mediate chronic colitis, gastritis, and arthritis in HLA-B27/human beta2 microglobulin transgenic rats. *J Clin Invest.* 1996; 98: 945-53.
51. **Taurog JD,** Richardson JA, Croft JT, *et al.* The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. *J Exp Med.* 1994; 180: 2359-64.
52. **Hacquard-Bouder C,** Falgarone G, Bosquet A, *et al.* Defective costimulatory function is a striking feature of antigen-presenting cells in an HLA-B27-transgenic rat model of spondyloarthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50:1624-35.
53. **Banchereau J,** Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392:245-52.
54. **Hacquard-Bouder C,** Ittah M, Breban M. Animal models of HLA-B27-associated diseases: new outcomes. *Joint Bone Spine* 2006;73:132-38.

55. **Faure M.** The chronic colitis developed by HLA-B27 transgenic rats is associated with altered in vivo mucin synthesis. *Dig Dis Sci* 2004; 49:339-46.
56. **Taurog JD,** Maika SD, Satumtira N, *et al.* Inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. *Immunol Rev* 1999; 169:209-23.
57. **Van Lieshout Barrera P,** Smeets RL, Pesman GJ, *et al.* Inhibition of TNF alpha during maturation of dendritic cells results in the development of semi-mature cells: a potential mechanism for the beneficial effects of TNF alpha blockade in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005; 64:408-14.
58. **Tran TM,** Dorris ML, Satumtira N, *et al.* Additional human beta2-microglobulin curbs HLA-B27 misfolding and promotes arthritis and spondylitis without colitis in male HLA-B27-transgenic rats. *Arthritis Rheum.*2006; 54:1317-27.
59. **Jacques P,** Mielants H, De Vos M, *et al.* Spondyloarthropathies: progress and challenges *Best Pract Res Clin Rheumatol.*2008; 22:325-37.
60. **Keith JC Jr,** Sainz IM, Isordia-Salas I, *et al.* A monoclonal antibody against kininogen reduces inflammation in the HLA-B27 transgenic rat. *Arthritis Res Ther* 2005; 7:R769-76.
61. **Peterson RL,** Wang L, Albert L, *et al.* Molecular effects of recombinant human interleukin-11 in the HLA-B27 rat model of inflammatory bowel disease. *Lab. Invest* 1998;78: 1503-12.
62. **Breban M.** Animal models and in vitro models for the study of aetiopathogenesis of spondyloarthropathies. *Clin Rheumatol* 1998; 12:611-26.
63. **Makino J,** Andoh A, Hata K, *et al.* Inhibitory effects of the new anti-inflammatory agent, IS-741, on spontaneous colitis in HLA-B27/ β 2-microglobulin transgenic rats. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17:854-60.

64. **Harnish DC**, Albert LM, Leathurby Y, *et al.* Beneficial effects of estrogen treatment in the HLA-B27 transgenic rat model of inflammatory bowel disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286:G118-25.
65. **Bamias G**, Nyce MR, De La Rue SA, *et al.* New concepts in the pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Ann Intern Med* 2005; 143:895-904.
66. **Fiocchi C**. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998; 115:182-205.
67. **Tidball CS**. The nature of the intestinal epithelial barrier. *Am J Dig Dis* 1971;16:745-67.
68. **Podolsky DK**. Regulation of intestinal epithelial proliferation: a few answers, many questions. *Am J Physiol* 1993; 264:G179-86.
69. **Liu Z**, Jiu J, Liu S, *et al.* Blockage of tumor necrosis factor prevents intestinal mucosal inflammation through down-regulation of interleukin-23 secretion. *J Autoimmun.* 2007; 29:187–194.
70. **Dieleman LA**, Hoentjen F, Qian BF, *et al.* Reduced ratio of protective versus proinflammatory cytokine responses to commensal bacteria in HLA-B27 transgenic rats. *Clin Exp Immunol* 2004; 136:30-9.
71. **Dieleman LA**, Goerres MS, Arends A, *et al.* Lactobacillus GG prevents recurrence of colitis in HLA-B27 transgenic rats after antibiotic treatment. *Gut.* 2003; 52: 370–6.
72. **Green DR**, Ferguson TA. The role of Fas ligand in immune privilege. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001; 2: 917–24.
73. **Ferguson TA**, Green DR, Griffith TS. Cell death and immune privilege. *Int Rev Immunol* 2002; 21:153-72.

74. **Marini, M**, Bamias G, Rivera-Nieves J, *et al.* TNF α neutralization ameliorates the severity of murine Crohn's-like ileitis by abrogation of intestinal epithelial cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:8367–8371.
75. **Corredor J**, Yan F, Shen CC, *et al.* Tumor necrosis factor regulates intestinal epithelial cell migration by receptor-dependent mechanisms *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; 284: C953–C961.
76. **Ueyama H**, Kiyohara T, Sawada N, *et al.* High Fas ligand expression on lymphocytes in lesions of ulcerative colitis. *Gut* 1998; 43:48-55.
77. **Boone DL**, Dassolopoulos T, Chai S, *et al.* Fas is not essential for lamina propria T lymphocytes homeostasis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 285:G382-8.
78. **Van den Brande JMH**, Koehler T, Zelinkova Z, *et al.* Prediction of anti-tumour necrosis factor clinical efficacy by real-time visualisation of apoptosis in patients with Crohn's disease. *Gut* 2007; 56:509-17.
79. **Mizoguchi E**, Mizoguchi A, Takedatsu H, *et al.* Role of Tumor Necrosis Factor receptor 2 (TNFR2) in colonic epithelial hyperplasia and chronic intestinal inflammation in mice. *Gastroenterology* 2002; 122:134-44.
80. **Lories RJ** and Luyten FP. Bone morphogenic protein signalling in joint homeostasis and disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005; 16:287-98.
81. **Lories RJ**, Derese I, Luyten FP. Modulation of bone morphogenic protein signalling inhibits the onset and progression of ankylosing enthesitis. *J Clin Invest.* 2005; 115: 1571-9.
82. **McGonagle D**, Khan MA, Marzo-Ortega H, *et al.* Enthesitis in spondyloarthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 1999; 11:244-250

83. **Lories RJ**, Derese I, De Bari C, *et al.* Evidence for uncoupling of inflammation and joint remodelling in a mouse model of spondylarthritis. *Arthritis Rheum.* 2007; 56:489-97.

84. **Sieper J**, Appel H, Braun J, *et al.* Clinical appraisal of assessment of structural damage in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 2008; 58:649-56.