



-Università del Piemonte Orientale-

“Amedeo Avogadro”

**ESPRESSIONE DI PPAR γ IN
MONOCITI/MACROFAGI DI PAZIENTI AFFETTI
DA ARTRITE REUMATOIDE**

XXIV Ciclo di Dottorato in Medicina Molecolare

Tutor: Prof.ssa Sandra Brunelleschi

Dottorando: Dott.ssa Alessandra Palma

INTRODUZIONE

L'artrite reumatoide (AR) è una malattia infiammatoria cronica immuno-mediata che colpisce lo 0,5-1% della popolazione adulta. L'eziologia dell'AR non è ancora completamente chiara, ma la sua patogenesi è universalmente ritenuta multifattoriale.

Più di 25 anni fa è stata scoperta una predisposizione genetica, mediata dal sistema HLA, per la AR. Stastny et al. (1983) hanno, infatti, dimostrato la presenza del genotipo HLA-DR4 in circa il 70% di pazienti di razza bianca affetti da AR. Inoltre, l'incidenza dell'artrite reumatoide è 3-4 volte più alta nelle donne rispetto agli uomini (Lawrance et al 1998). Alcuni studi hanno dimostrato come le donne affette da AR presentano i genotipi HLA-DR4 o HLA-DR1 o entrambi, mentre gli uomini sono associati al genotipo HLA-DR1 (Brennan et al. 1995; Melanine, 2003).

Oltre ai fattori genetici, anche i livelli degli ormoni sessuali sembrano essere coinvolti nello sviluppo dell'AR, oltre a spiegare la differenza di genere della malattia reumatoide. Infatti, gli uomini AR mostrano una diminuzione dei livelli di testosterone (ormone con attività immuno-soppressiva) (Brenna et al. 1995); nelle donne si osserva anche una diminuzione di deidroepiandrosterone solfato (DHEAS) che risulta essere ancora più basso in fase premenopausale (Brennan et al. 1995; Masi et al 1995). Quindi il deficit di androgeni e la differenza di concentrazione di questi ultimi nei due sessi, non solo indica la loro possibile implicazione nello sviluppo della malattia reumatoide, ma potrebbe anche contribuire a spiegare la differenza di genere dell'incidenza dell'AR.

L'AR è una malattia che colpisce le giunzioni articolari ed è caratterizzata dalla proliferazione sinoviale, infiltrazione di cellule B, T (CD4+) e macrofagi; dal punto di vista isto-patologico è contraddistinta da ipervascolarizzazione, aumento dell'attività degli osteoclasti e la formazione del *pannus* (sinoviociti, cellule infiammatorie e fibroblasti) che causa degradazione delle cartilagini e l'ossificazione (Firestein et al. 2003; Slezen et al. 2007).

L'aumento di citochine pro-infiammatorie come *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α), interleuchina-1 (IL-1), -6, -17 ed interferon- γ (INF- γ), l'elevata produzione ed attivazione di chemochine, di molecole di adesione, quali ICAM-1 (*Inter-Cellular Adhesion Molecule 1*), VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) ed E-selectina, oltre all'incremento di mediatori flogistici come le metalloproteinasi (MMPs), le cicloossigenasi (COX-1 e 2) e iNOS (ossido nitrico sintasi inducibile), rappresentano molecole e meccanismi coinvolti nella patogenesi dell'AR (Muller-Ladner et al., 2005).

L'AR è considerata a tutti gli effetti una patologia sistemica, multi-organo, che coinvolge, tra gli altri, anche il sistema cardiovascolare (Gerli et al., 2007). Attualmente, ben si conosce il ruolo svolto dalle malattie cardiovascolari che rappresentano la prima causa di morte in soggetti artritici (Van Doornum et al., 2002; Solomon et al., 2003). Studi clinici, di laboratorio ed epidemiologici hanno dimostrato come lo stato infiammatorio cronico nei pazienti AR aumenti il rischio di malattia aterosclerotica negli stessi pazienti. (John et al., 2009). Infatti, nei pazienti affetti da AR, il numero di decessi per malattia cardiocircolatoria risulta essere aumentato del 5,25%. (Wolfe et al., 1994). In particolare, la più alta incidenza di mortalità, per cause riferibili alle malattie coronariche (CAD) è stata riscontrata nelle giovani donne affette da AR tra i 15 e i 49 anni (3,64%) (Mylykangasluosujarvi et al., 1995) e nei pazienti di entrambi i sessi al di sopra dei 60 anni. (Gabriel et al., 1998; Kvalvik et al., 2000). Uno studio condotto su 149 pazienti affetti da AR e seguiti dal 1977 al 1992, ha mostrato un aumento di mortalità cardiovascolare, prevalentemente, in soggetti di sesso femminile (Walberg-Jonsson et al. 1997).

Le cause dello sviluppo della malattia aterosclerotica in pazienti AR non sono ancora del tutto chiare. Inoltre, l'aumento del rischio di insorgenza di CAD non può essere completamente spiegato con i tradizionali fattori di rischio (l'età il sesso, il fumo, l'ipertensione e il diabete di tipo 2) (Del Rincon et al., 2001). Per questo, diversi studi indicano l'infiammazione cronica come un fattore di rischio non tradizionale (John et al., 2009).

L'aterosclerosi è un processo infiammatorio dinamico che consiste nella perdita dell'integrità dell'endotelio e la conseguente attivazione di cellule endoteliali e l'aumento della produzione di molecole di adesione come ICAM-1, VCAM-1 ed E-selectina, che consentono l'infiltrazione di lipidi nell'intima del tessuto endoteliale. (Libby et al., 2008; Ozbalkan et al. 2010). L'attivazione endoteliale induce i monociti circolanti a passare la parete dell'arteria, dove differenziano in macrofagi residenti formando strie lipidiche (*fatty streak*). Le cellule muscolari lisce producono tessuto fibroso, collagene, citochine (ad esempio: IL-6; TNF- α) e fattori di crescita (MCP-1 *Monocyte chemotactic protein-1*) partecipando allo sviluppo della placca. (Ross et al., 1999).

Un profilo lipidico sfavorevole, caratterizzato da una diminuzione delle HDL (*high-density lipoprotein*), e da un aumento di trigliceridi e di LDL (*low-density lipoprotein*), è stato riscontrato anche in pazienti affetti da AR (White et al., 2006; Roman et al., 2006; Superko et al., 2008).

La placca aterosclerotica e l'infiammazione della sinovia mostrano una marcata somiglianza nell'accumulo e nell'attivazione di cellule infiammatorie (come monociti, macrofagi e cellule T) e in tutte e due le malattie si ha un'elevata produzione di IL-6, TNF- α , metalloproteinasi e molecole di adesione leucocitaria. Inoltre sia l'AR che l'aterosclerosi sono associate ad un aumento della risposta immunitaria mediata dai Th1 (Pesceri et al., 1999; Libby et al., 2008).

Il focus di infiammazione nell'AR è la sinovia, ma le citochine pro-infiammatorie, prodotte in loco, vengono rilasciate nel torrente circolatorio e possono agire a vari livelli (fegato, tessuto adiposo, muscolo scheletrico, sistema immunitario ed endotelio) determinando un ambiente pro-aterogenico caratterizzato da stress ossidativo, dislipidemia, insulino-resistenza, disfunzione endoteliale e attivazione di cellule T (Sattar et al., 2003). Inoltre il rilascio di mediatori in grado di alterare la struttura del collagene può essere rilevante sia nel determinare una condizione di instabilità della placca ateromasica sia nel favorire erosioni ossee e cartilaginee a livello dell'articolazione infiammata (Ozbalkan et al., 2010). E' ormai ampiamente noto il ruolo svolto dalla risposta immunomediata nella patogenesi dell'AR. E' interessante notare che tra i fattori immunologici condivisi nella patogenesi dell'AR e della aterosclerosi vi è una classe di linfociti T CD4+ privi della molecola di superficie CD28 (Pasceri et al., 1999; Gerli et al., 2007; Ozbalkan et al., 2010). Tali cellule, probabilmente stimulate da autoantigeni endoteliali (Zal et al., 2004), sono state ritrovate nel sangue periferico sia in soggetti affetti da AR che in un gruppo di pazienti con angina instabile (Martens et al., 1997; Liuzzo et al., 1999). Considerata la loro capacità di produrre citochine proinfiammatorie, di indurre danno organico tissutale ed infiltrare le placche aterosclerotiche (Namekawa et al., 1998; Liuzzo et al., 2000), si potrebbe ipotizzare un ruolo di questa popolazione cellulare nel favorire aterosclerosi e nel predisporre ad eventi cardiovascolari soggetti affetti da AR.

L'insieme di questi elementi testimonia l'importanza che l'infiammazione cronica ha nel promuovere lo sviluppo precoce di aterosclerosi nei pazienti con AR (Libby et al., 2008).

Recentemente, nel nostro laboratorio, abbiamo dimostrato che l'espressione di PPAR γ (*Peroxisome Proliferator Activated Receptors-gamma*) è più elevata nei monociti/macrofagi di pazienti CAD (circa 10 volte) che nei volontari sani, ed è stata, inoltre, riscontrata una differenza di genere dell'espressione di PPAR γ , dimostrando come tale recettore è maggiormente espresso nel sesso femminile (Amoruso et al., 2009).

PPAR γ è espresso nelle cellule endoteliali, nelle cellule muscolari lisce, nei monocito/macrofagi, nei cardiomiociti e nel tessuto adiposo. Tale recettore, oltre a svolgere un ruolo chiave nel metabolismo glucidico e lipidico, è ampiamente coinvolto nel processo infiammatorio. Numerose osservazioni dimostrano che gli agonisti PPAR γ sono in grado di inibire l'attivazione di NF-kB, AP-1, STAT-1, oltre a diminuire l'espressione di molecole di adesione nelle cellule endoteliali, il rilascio di chemochine e citochine pro-infiammatorie (IL-8, -6, -12 e TNF- α) e inibire l'attività delle metalloproteasi (Ricote et al., 1999; Fuentes et al., 2010).

PPAR γ è espresso nei macrofagi infiltrati e nelle cellule sinoviali dei pazienti affetti da AR; oltre che nei fibroblasti e nelle cellule endoteliali. (Kawahito et al., 2000). Inoltre, elevati livelli di mRNA di PPAR γ sono presenti negli adipociti e nel midollo osseo di pazienti AR (Jiang et al., 2008). Esperimenti in vivo hanno, inoltre, dimostrato come nel topo e che nel ratto, gli agonisti di PPAR γ , quali PGJ₂, rosiglitazone e pioglitazone sono in grado di diminuire la formazione del pannus e l'infiltrazione di cellule mononucleate (Kawahito et al. 2000) oltre a inibire l'attività di iNOS e la produzione di citochine pro-infiammatorie (TNF- α , IL-1 β e bFGF) (Shiojiri et al., 2002; Koufany et al., 2008).

Considerata la relazione tra aterosclerosi e artrite reumatoide, e coerentemente con il programma del mio dottorato di ricerca (*PPARs as expression of gender differences in drug response and cardiovascular disease*), dopo aver contribuito a dimostrare la differenze di genere nell'espressione/attivazione di PPARs in pazienti affetti da CAD (Amoruso et al., 2009), in questo secondo anno di dottorato ho iniziato a valutare una possibile differenza di genere nell'espressione del recettore PPAR γ in pazienti affetti da artrite reumatoide.

Vista l'incidenza della malattia (prevalentemente femminile) lo studio, già in fase abbastanza avanzata, ma non ancora concluso, necessita di una ulteriore valutazione delle differenze di genere andando ad ampliare la numerosità dei pazienti di sesso maschile.

MATERIALI E METODI

Reclutamento pazienti:

In collaborazione con l'Ambulatorio di immuno-reumatologia dell'Azienda Ospedaliera "Maggiore della Carità" di Novara (Prof. Gian Carlo Avanzi, Dott. Pier Paolo Sainaghi) sono stati reclutati 25 pazienti affetti da artrite reumatoide (20 donne e 5 uomini) e 11 (6 donne e 5 uomini) volontari sani.

Tutti i pazienti sono in terapia farmacologica; i loro dati anagrafici e clinici sono riportati in un database dedicato.

Il protocollo di sperimentazione è stato approvato dal Comitato Etico dell'Azienda ospedaliera "Maggiore della Carità" di Novara

Preparazione di monociti umani (M) e Monocyte-Derived Macrophages (MDM)

I monociti umani (M) sono stati isolati da sangue venoso eparinizzato. Il sangue prelevato viene fatto sedimentare con una soluzione di destrano in rapporto 1:1 e centrifugato a 400g per 30' a temperatura ambiente su gradiente di *Hystopaque* (densità = 1.077 g/cm³). L'anello di cellule mononucleate viene trasferito in un altro tubo e lavato con PBS (*phosphate-buffered saline* pH 7.4) per 10' a 250g per tre volte; le cellule così recuperate vengono piastrate in RPMI 1640 medium, con l'aggiunta di FBS al 5% (*fetal bovine serum* scomplementato), 2 mM di glutammina, 50 µg ml⁻¹ di streptomina, 5 U ml⁻¹ di penicillina e 2.5 µg ml⁻¹ di anfotericina B (Brunelleschi *et al.*, 1998). La popolazione purificata di monociti viene ottenuta per adesione (90', 37°C, 5% CO₂) e le cellule in sospensione (principalmente linfociti) vengono rimosse con tre lavaggi di PBS; la vitalità cellulare viene valutata con "*trypan blue dye exclusion*" ed è normalmente > 98% (Brunelleschi *et al.*, 1998). I *Monocyte-Derived Macrophages* (MDM) sono ottenuti da monociti incubati a 37°C per 8-10 giorni con RPMI 1640 completo con l'aggiunta del 20% di FBS, con cambi di terreno ogni 2-3 giorni. Gli MDM vengono considerati cellule "*macrophage-like*", grazie alla diminuzione dei *marker* di superficie CD14 (soltanto il 25-30% degli MDM sono CD14⁺) ed all'assenza dell'espressione del *marker* CD1a che dimostra che nelle preparazioni di MDM non ci sono cellule che si stanno differenziando in cellule dendritiche (Amoruso *et al.*, 2008).

Espressione proteica e semiquantificazione di PPAR γ :

Le cellule, dopo 6 ore in terreno RPMI 1664 "bianco" (senza rosso fenolo, Sigma), sono state lavate due volte con PBS freddo e staccate in tampone di lisi (3% SDS, 0.25 M Trizma base e 1 mM fluoruro di fenilmetansulfonile). Le cellule lisate sono state sottoposte a *shock* termico. La determinazione delle concentrazioni proteiche è stata fatta con metodo BCA. I campioni di proteina (20 μ g) sono stati analizzati con SDS-PAGE (10% acrilammide) e trasferiti su membrane di nitrocellulosa. Gli *immunoblots* sono stati eseguiti con metodiche standard utilizzando i seguenti anticorpi: anticorpo monoclonale anti-PPAR γ (Santa Cruz 1:1000 in TBS-Tween 5% latte) ed anticorpo monoclonale anti- β -actina (Sigma; 1:5000 in TBS-Tween 3% BSA). L'anticorpo secondario utilizzato è associato con la perossidasi (Amersham Biosciences). Le proteine sono state visualizzate attraverso un sistema di intensificazione della chemiluminiscenza (ECL, Perkin Elmer). Il segnale di chemiluminiscenza è stato analizzato con un densitometro in condizioni non saturanti (Versadoc, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). La valutazione semi-quantitativa della proteina PPAR γ è stata valutata calcolando il rapporto tra l'espressione proteica di PPAR γ e quella della β -actina, quest'ultima utilizzata come proteina di controllo.

Isolamento dell'RNA e Real-time PCR:

L'RNA totale è stato estratto dai monociti con: *GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit* (Sigma), e la purezza e la quantità di RNA totale è stata valutata tramite metodo spettrofotometrico (260-280 nm). La sintesi del cDNA è stata eseguita con: *High Capacity cDNA Reverse Transcription kit* (Applied Biosystem; Carlsbad, CA). Sono stati successivamente caricati 4 μ l di cDNA in piastre da 96 pozzetti (*Optical Reaction Plates*; Applied Biosystem) con 1 μ l di *TaqMan Expression Assay* (PPAR γ), 5 μ l RNasi free water, 10 μ l *TaqMan Universal PCR Master Mix (2x)* (senza *AmpErase* UNG). I campioni sono stati analizzati con *Applied Biosystem 7000 ABI Prism System*. Il gene di controllo è la glucoronidasi beta.

Produzione di anione superossido (O $_2^-$):

I monociti (1×10^6) sono stati pre-trattati con PGJ2 (10 μ M) per un'ora. Successivamente le cellule sono state stimulate per 30 minuti con PMA 10^{-6} . La produzione di anione superossido è stato misurata valutando, a 550 nm (spettrofotometro Beckam DU 650), la riduzione, superossido dismutasi (SOD)-sensibile del ferricitocromo C presente nel

medium. La produzione di O_2^- è espressa come nmol di citocromo C ridotto/ 1×10^6 /30 min, usando il coefficiente d'estinzione 21.1 mM.

Valutazione della MMP-9 tramite zimografia:

I monociti isolati dai pazienti AR sono stati piastrati (1×10^6) per 24 ore in terreno RPMI "bianco" (Sigma). L'attività della MMP-9 è stata valutata con *gelatin zymography Novex zymogram gelatin gel* (Invitrogen.) Sono stati caricati 20 μ l di surnatante con 10 μ l di *Novex Tris-glycine SDS sample buffer* (Invitrogen) su gel di gelatina 10% SDS-poliacrilamide. Dopo l'elettroforesi il gel è stato rinaturato in *Novex zymogram renaturig buffer* (2,7% Triton X-100) per 30 minuti. Successivamente il gel è stato incubato per 18 ore a 37°C in *Novex zymogram developing buffer* (Invitrogen). Dopo l'incubazione il gel è stato colorato con *Colloidal Blue Staining Kit* (Invitrogen). Il gel è stato analizzato con un densitometro in condizioni non saturanti (Versadoc, Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

RISULTATI

In collaborazione con l'ambulatorio di immuno-reumatologia sono stati reclutati 25 pazienti (20 donne e 5 uomini), affetti da artrite reumatoide a vari stadi della malattia (valutata mediante DAS28: Disease Activity Score) e 11 controlli sani di ambo i sessi.

I dati anagrafici, il valore di DAS28 e il trattamento farmacologico dei pazienti sono riportati nella **Tabella 1**.

Valutazione dell'espressione di PPAR γ in monocito/macrofagi di pazienti AR rispetto a donatori sani.

Risultati precedentemente ottenuti in laboratorio (Amoroso et al., 2009) hanno dimostrato come l'espressione di PPAR γ sia aumentata in pazienti CAD rispetto a donatori sani.

Partendo da questo presupposto, siamo andati a valutare l'espressione costitutiva di PPAR γ in monocito/macrofagi di 25 pazienti AR rispetto a 11 donatori sani.

L'espressione costitutiva della proteina PPAR γ risulta significativamente aumentata (circa 3 volte) nei monocito/macrofagi dei pazienti AR (25) rispetto ai donatori sani (11). **Fig.1A-B**. Infatti, nei monociti isolati dai pazienti AR e dai volontari sani, il rapporto PPAR γ / β -actina è pari a $0,52 \pm 0,06$ e $0,19 \pm 0,02$ rispettivamente ($p < 0,01$); negli MDM (**Fig.1C-D**) il rapporto PPAR γ / β -actina è pari a $1,76 \pm 0,1$ nei pazienti AR e $0,67 \pm 0,08$ nei volontari sani ($p < 0,01$).

Considerato che al momento abbiamo reclutato 20 pazienti donne e solo 5 uomini, non abbiamo ancora potuto valutare una eventuale differenza di genere nell'espressione di PPAR γ tra i pazienti affetti da AR.

Valutazione del *fold increase* dei livelli di mRNA di PPAR γ in monocito/macrofagi di pazienti AR rispetto a donatori sani.

Alcuni studi (Kawahito et al., 2000) hanno evidenziato un aumento dell'espressione del recettore PPAR γ nei macrofagi infiltrati e nella sinovia dei pazienti affetti da AR; inoltre, elevati livelli di mRNA di PPAR γ sono stati misurati negli adipociti e nel midollo osseo di pazienti AR (Jiang et al., 2008).

Siamo andati quindi a valutare nel nostro modello, tramite *real time* PCR, l'aumento del livello di mRNA di PPAR γ nei monocito/macrofagi di pazienti affetti da AR rispetto ai donatori sani.

Come riportato nella **Fig. 2**, i valori di mRNA di PPAR γ è circa 4 volte superiore nei monociti dei pazienti AR rispetto ai donatori sani (posti uguale ad 1; *** $p < 0,05$) (**Fig. 2A**); negli MDM, l'aumento di PPAR γ dei pazienti AR è circa 2 volte superiore rispetto ai donatori sani (* $p < 0,05$). (**Fig. 2B**).

Valutazione dell'espressione di PPAR γ in relazione alla scala di valori DAS28

Il DAS28 è una scala di valutazione dell'attività della malattia reumatoide in un determinato momento, di largo utilizzo e ampiamente validata. I valori di riferimento e la numerosità di pazienti in una determinata fase di malattia sono riportati nella **Tabella 2**. Considerata la bassa numerosità dei pazienti AR in fase di elevata attività della malattia ($n = 2$; DAS > 5.1), abbiamo suddiviso i pazienti in tre gruppi, unificando quei pazienti in fase moderata ed elevata (per un totale, quindi, di 10 pazienti).

Attività della malattia	Valore	N. pazienti AR
Fase di remissione	≤ 2.6	9
Fase di bassa attività	2.6-3.2	6
Fase di moderata attività	3.2-5.1	8
Fase di elevata attività	> 5.1	2

Tab.2 Scala di valutazione dell'attività della malattia reumatoide.

Siamo andati a valutare una possibile correlazione tra l'espressione di PPAR γ con i valori di DAS28. Come si vede in **Fig. 3A** l'espressione della proteina PPAR γ nei monociti dei pazienti in fase di remissione è superiore rispetto alle fasi di moderata e bassa attività della malattia; negli MDM l'espressione proteica di PPAR γ sembra non subire significative variazioni in funzione della fase di attività della malattia (**Fig. 3B**). Analogamente, valutando, in monociti e macrofagi, i livelli di mRNA di PPAR γ in relazione al DAS28, non risulta alcuna differenza statisticamente significativa (**Fig. 3C-D**) all'interno delle tre fasi di attività dell'AR.

Valutazione dell'attività di MMP-9 tramite zimografia in pazienti AR rispetto ai donatori sani

Le metalloproteinasi svolgono un ruolo importante nello sviluppo della AR ed è stato ampiamente documentato che le cellule sinoviali contribuiscono alla degradazione del tessuto connettivo, rilasciando metalloproteinasi (Barry et al., 1996). Pertanto, siamo andati a valutare l'espressione di MMP-9 nei monocito/macrofagi di pazienti affetti da AR ai rispetto ai donatori sani.

Come si evince dalla **Figura 4**, i monociti isolati dai pazienti affetti da AR mostrano un aumento di 36 volte di MMP-9 rispetto ai donatori sani (**p < 0,001). Negli MDM di pazienti AR, l'espressione di MMP-9 è aumentata di circa 10 volte rispetto ai sani (**p < 0,001).

Valutazione della produzione di anione superossido in pazienti AR rispetto ai donatori sani

Come è dimostrato in **Fig.5A-B**, i monociti e gli MDM di pazienti affetti da AR producono spontaneamente maggiori quantità di anione superossido rispetto alle corrispondenti popolazioni cellulari di donatori sani ($1,7 \pm 0,3$ e $4,6 \pm 0,8$ nmoli Citocromo C ridotto/ 10^6 cellule/30 min, rispettivamente; $p < 0,01$). Al contrario, la produzione di anione superossido indotta dal PMA (forbolo-12- miristato-13 acetato) non è significativamente modificata nei due gruppi. L'agonista endogeno di PPAR γ , la PGJ $_2$, utilizzata alla concentrazione di 10 μ M, inibisce significativamente il "burst" respiratorio evocato dal PMA sia nei monociti che negli MDM (**Fig. 5C- D**). Negli MDM, inoltre, la PGJ $_2$ si dimostra più efficace nell'inibire la produzione di anione superossido nei pazienti affetti da AR rispetto ai volontari sani ($p < 0,01$; **Fig. 5D**).

Tabella 1: Caratteristiche dei pazienti AR reclutati nello studio.

N°	SESSO	ETA'	TERAPIA	DAS28
1	F	76	prednisone, salazopirina	3.2
2	F	74	metatrexato, prednisone	2.61
3	F	29	prednisone	3.33
4	F	77	leflunomide, prednisone, salazopirina	4.12
5	F	62	salazopirina, idrossiclorochina solfato	4.2
6	F	55	metatrexato	3.08
7	M	67	ciclosporina, prednisone, metatrexato, salazopirina	2.59
8	F	27	metatrexato, prednisone	2.36
9	F	56	metatrexato, metilprednisolone, plaquenil	2.79
10	F	70	metatrexato, metilprednisolone, idrossiclorochina solfato	1.25
11	F	89	adalimumab, metatrexato, prednisone	3.98
12	M	70	metatrexato	1.75
13	M	32	metilprednisolone I, salazopirina	4.51
14	F	58	metatrexato, prednisone	2.25
15	F	47	FANS	4.45
16	M	55	deltacortene, salazopirina	2.69
17	F	77	metatrexato, prednisone	4.45
18	F	61	ciclosporina, metilprednisolone	0.63
19	F	58	metatrexato, prednisone	4.19
20	F	67	FANS	2.24
21	F	50	FANS	5.14
22	F	70	metatrexato, etanercept	2.2
23	F	71	salazopirina	3.01
24	F	35	FANS	5.97
25	F	68	Prednisone, metatrexato	3.11

Figura 1

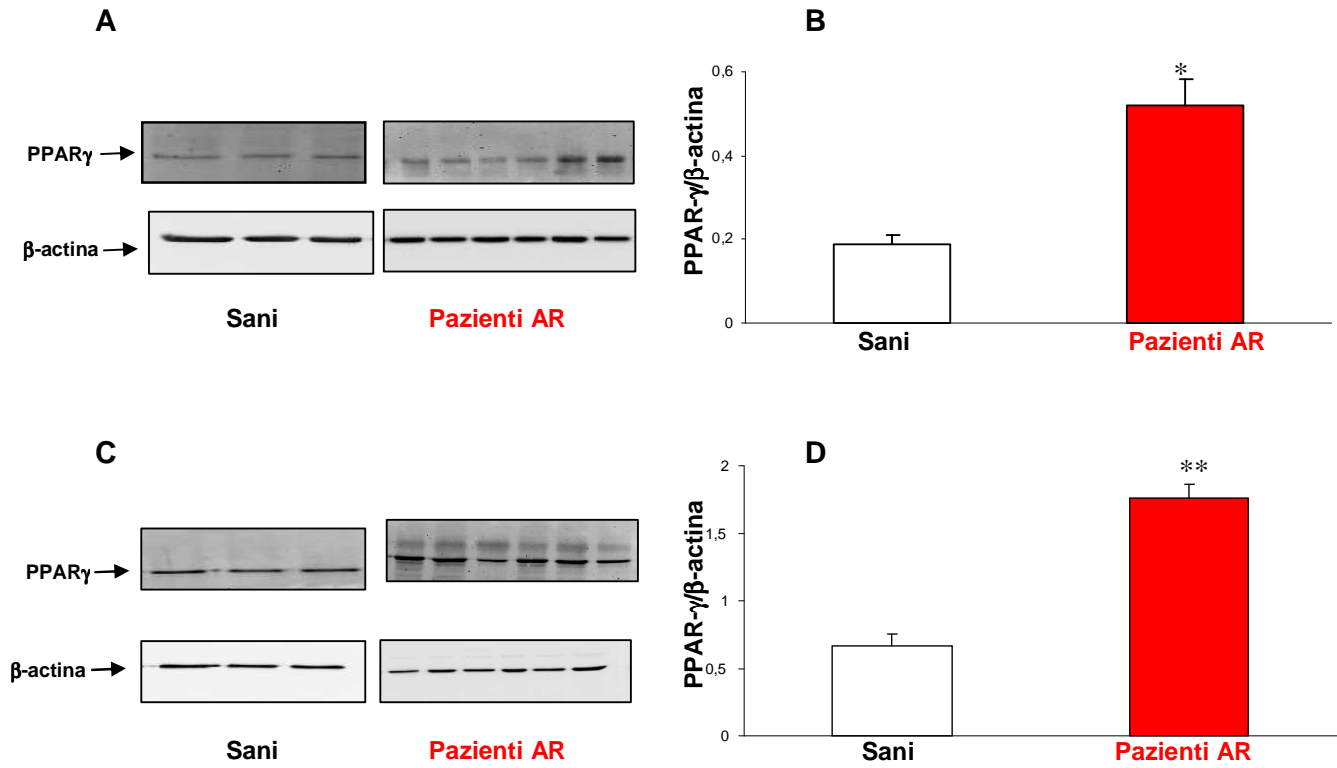


Fig.1: Espressione costitutiva di PPAR γ in monocito/macrofagi isolati da donatori sani e pazienti AR.

In **A**: Western Blot di PPAR γ e β -actina in monociti; in **B**: espressione semiquantitativa di PPAR γ (* p < 0,01 vs sani) nei monociti. In **C**: Western Blot di PPAR γ e β -actina in MDM; **D**: espressione semiquantitativa di PPAR γ (** p < 0,01 vs sani) in MDM. Medie \pm s.e.m.

Figura 2

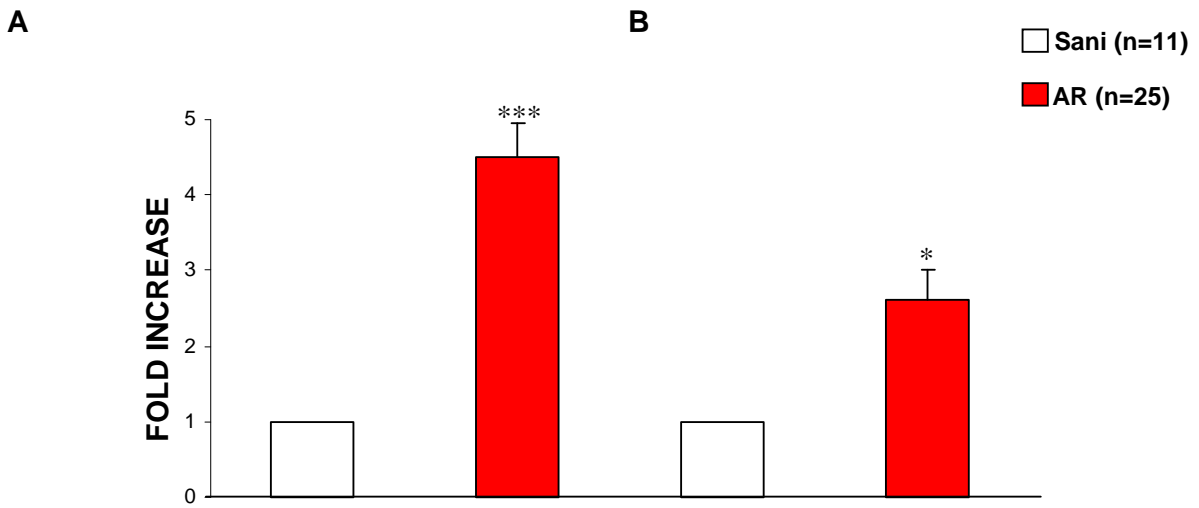


Fig.2. Livelli di PPAR γ mRNA in monocito/macrofagi isolati da donatori sani e pazienti AR.
In **A**: incremento di PPAR γ mRNA nei monociti di pazienti AR vs donatori sani (**p<0,05); in **B**: incremento di PPAR γ mRNA in MDM di pazienti AR vs donatori sani (*p<0,05). I valori del volontario sano sono posti =1. Medie \pm s.e.m.

Figura 3

Monociti

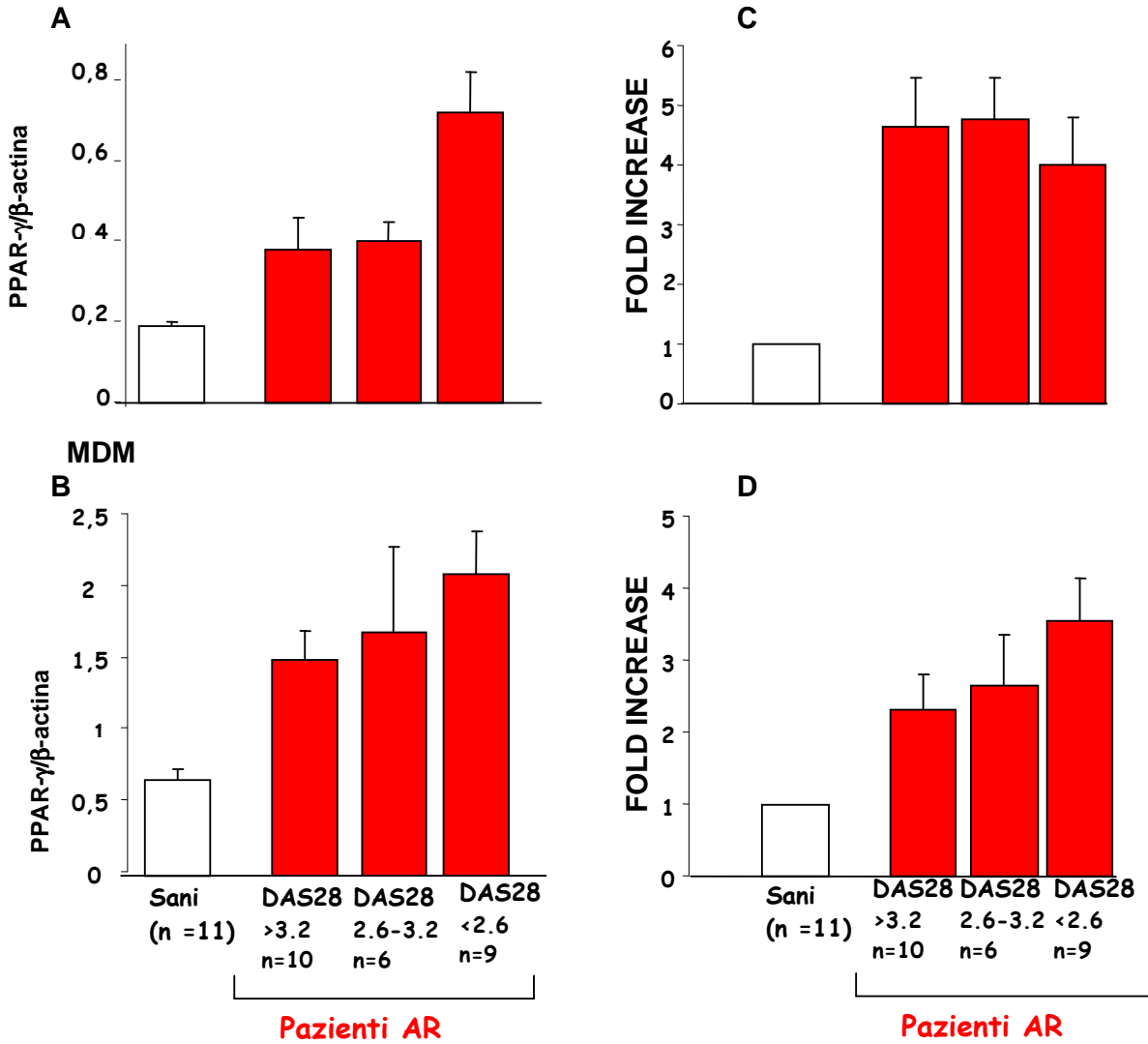


Fig.3 .Valutazione dell'espressione di PPAR γ in relazione al DAS28.

Espressione semiquantitativa di PPAR γ nei monociti (A) e MDM (B) di pazienti AR e donatori sani. Livelli di PPAR γ mRNA nei monociti (C) e MDM (D) di pazienti AR rispetto ai sani (posti =1). Medie \pm s.e.m.

Figura 4

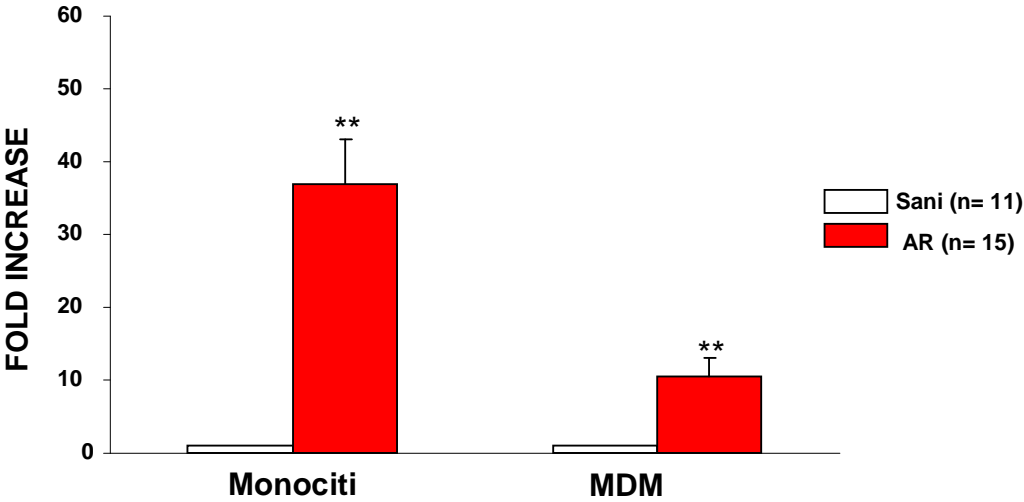


Fig.4. Espressione di MMP-9 in monocito/macrofagi di pazienti AR e donatori sani. I volontari sani sono posti =1. Medie \pm s.e.m ; **p<0,001 vs sani.

Figura 5

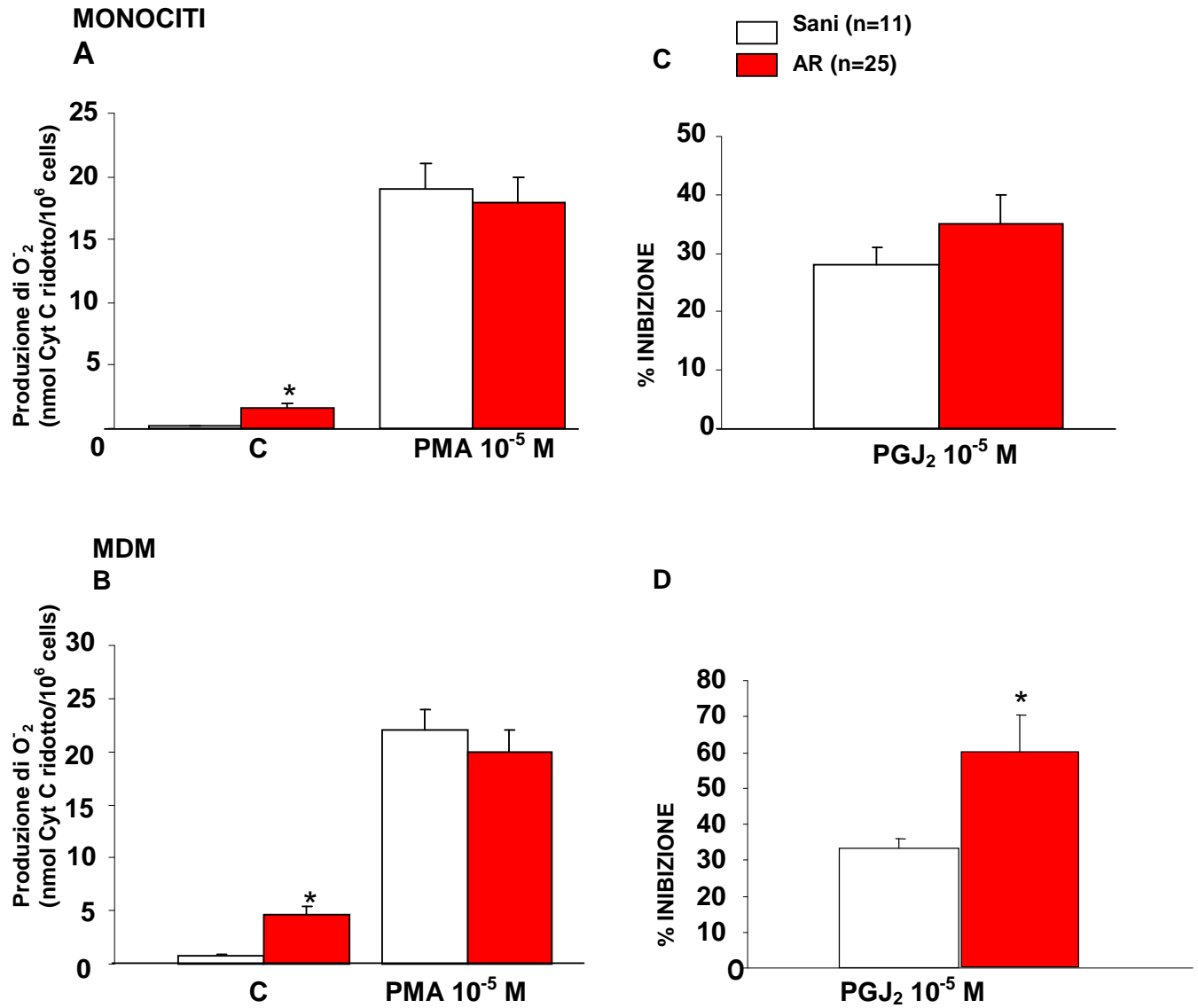


Fig. 5. Produzione di anione superossido in monocito/macrofagi di pazienti AR e donatori sani. Produzione spontanea ed indotta da PMA nei monociti (A) e MDM (B) di pazienti AR e di volontari sani. Effetto di PGJ₂ sulla produzione di anione superossido indotta da PMA nei monociti (C) e MDM (D) di pazienti AR e volontari sani. Medie \pm s.e.m; *p < 0,05 vs sani.

DISCUSSIONE

Differenti studi clinici hanno dimostrato che lo stato infiammatorio cronico della AR aumenta il rischio di malattia aterosclerotica e che la coronaropatia (CAD) rappresenta la prima causa di morte nei pazienti AR (Van Doornum et al., 2002; Johon et al., 2003; Solomon et al., 2003). In particolare, la più alta incidenza di mortalità, per cause riferibili alle malattie coronariche (CAD) è stata riscontrata nelle giovani donne affette da AR (Myllykangas-Luosujarvi et al., 1995). In precedenza, nel nostro laboratorio, abbiamo evidenziato che l'espressione del recettore PPAR γ nei monocito/macrofagi di pazienti CAD è più elevata nelle donne rispetto agli uomini, le quali presentano anche una ridotta liberazione spontanea di citochine pro-infiammatorie rispetto ai pazienti maschi (Amuroso et al., 2009).

Considerata la relazione tra aterosclerosi e artrite reumatoide, durante quest'anno di dottorato ho iniziato a valutare una possibile differenza di genere nell'espressione del recettore PPAR γ in pazienti affetti da AR. E' ormai noto l'importante ruolo svolto da PPAR γ nei processi infiammatori; infatti diversi studi hanno dimostrato come l'espressione di questo recettore sia aumentata nelle malattie associate a un processo infiammatorio. Dati di letteratura mostrano come PPAR γ sia più espresso nello strato di rivestimento sinoviale, nei macrofagi, nei fibroblasti, nelle cellule endoteliali, negli adipociti e nel midollo osseo di pazienti affetti da AR rispetto ad individui sani (Kawahito et al., 2000; Jiang et al., 2008).

Nei 25 pazienti affetti da AR finora da noi reclutati, l'espressione costitutiva della proteina PPAR γ risulta aumentata di circa tre volte nei monociti e di circa due volte negli MDM, rispetto ai 11 volontari sani. Questo risultato è in buon accordo con quanto riportato da Jiang et al (2008), i quali documentano una elevata espressione di PPAR γ nel midollo osseo di pazienti (soprattutto, oltre i 55 anni) affetti da AR, significativamente superiore a quella dei volontari sani e dei pazienti affetti da osteoartrosi (Jiang et al., 2008).

L'aumento dell'espressione di PPAR γ nei pazienti affetti da AR potrebbe essere causato dallo stato infiammatorio tipico della patologia (Muller-Ladner et al., 2005) e quindi PPAR γ potrebbe rappresentare un possibile *marker* del processo infiammatorio in atto.

L'aumento dell'espressione PPAR γ nei pazienti affetti da AR rispetto a donatori sani è supportata dai dati dell'espressione genica: infatti, nei monociti e negli MDM dei pazienti AR, l'espressione di PPAR γ mRNA è superiore a quella dei volontari sani di quattro e due volte, rispettivamente.

Un'altra importante osservazione riguarda la correlazione tra l'espressione di PPAR γ e l'attività della malattia: l'espressione proteica del recettore nei monociti dei pazienti in fase di remissione della malattia risulta più alta rispetto a quelli in fase di bassa e moderata/alta attività della malattia, indicando così un possibile ruolo protettivo del recettore.

Negli MDM dei pazienti AR invece sembra che l'espressione di PPAR γ non subisca particolari variazioni significative nelle varie fasi di attività della malattia.

L'AR è associata a stress ossidativo causato dalla perdita del fisiologico equilibrio fra la produzione e l'eliminazione dei radicali liberi dell'ossigeno il cui aumento causa un danno a livello della matrice extracellulare. Nel liquido sinoviale e nel siero di pazienti è possibile evidenziare aumentati livelli dei prodotti della perossidazione lipidica (Basu et al., 2001).

Nel nostro studio, i monocito/macrofagi dei pazienti AR producono spontaneamente maggiori quantità di anione superossido rispetto ai donatori sani, confermando precedenti osservazioni del laboratorio (Brunelleschi et al., 1998). La produzione di anione superossido indotta da PMA non presenta differenze significative tra i pazienti AR e i donatori sani; tuttavia, è importante sottolineare come, negli MDM, la PGJ₂ (10 μ M), agonista del recettore PPAR γ , è più efficace nell'inibire il "burst" respiratorio nei pazienti AR rispetto ai sani. Questo dato ben si accorda a quanto evidenziato relativamente all'espressione di PPAR γ : infatti, l'aumentata espressione di PPAR γ nei pazienti AR rispetto ai sani potrebbe spiegare il maggior effetto inibitorio dell'agonista PGJ₂ sulla produzione di anione superossido nei pazienti affetti da AR.

Nella malattia reumatoide le cellule sinoviali contribuiscono alla degradazione del tessuto connettivo rilasciando in circolo metalloproteinasi, che causano la degradazione del tessuto connettivo (Barry et al., 1996). Studi in vitro hanno dimostrato l'aumentata attività delle metalloproteinasi nel liquido sinoviale di pazienti con AR e la loro capacità di denaturare tutti i componenti delle cartilagini (proteoglicano, laminina, fibronectina e collagene IV) (Clutterbuck et al., 2009).

Valutando l'attività della MMP-9 nei monocito/macrofagi dei pazienti AR rispetto ai volontari sani, abbiamo documentato che i monociti di pazienti mostrano un aumento dell'attività di 36 volte di MMP-9 rispetto ai donatori sani, mentre negli MDM l'aumento è di circa 10 volte rispetto ai sani. Anche in questo caso, il dato ottenuto rispecchia lo stato di infiammazione generale tipico questa patologia.

In conclusione il recettore PPAR γ , sia a livello genomico che proteico, è maggiormente espresso nei monocito/macrofagi dei pazienti AR rispetto ai sani; inoltre, i monociti isolati

da pazienti in fase di remissione della malattia presentano il più elevato aumento di espressione proteica di questo recettore. Pertanto, si potrebbe avanzare l'ipotesi che PPAR γ possa rappresentare un marker del processo infiammatorio in atto nella AR e, visti i dati che correlano l'aumento dell'espressione del recettore alla fase di remissione della malattia, si potrebbe suggerirne il ruolo protettivo nell'AR.

Per concludere lo studio e valutare una possibile differenza di genere, sarà necessario ampliare la numerosità dei pazienti di sesso maschile. Inoltre, stiamo attualmente valutando la capacità di agonisti di PPAR γ , come la PGJ₂, di interferire con la liberazione di citochine pro-infiammatorie e l'attivazione delle MMP-9, sia nel volontario sano che nel paziente AR.

In questo secondo anno di dottorato, ho anche partecipato allo studio degli effetti anti-infiammatori di NCX 6550, una pravastatina donatrice di nitrossido (NO), nei monocito/macrofagi di volontari sani, valutandone gli effetti sul "release" di citochine, rispetto al farmaco d'origine pravastatina e ad altre molecole NO donatrici come l'isosorbide-5-mononitrato (ISMN) e il sodio nitroprussiato (SNP).

Abbiamo dimostrato che NCX 6550 inibisce, in modo dose-dipendente (1nM-50 μ M), il rilascio, indotto da PMA, di TNF- α ed IL-6 in monocito/macrofagi, dimostrandosi più efficace delle altre molecole valutate. Si potrebbe, pertanto, ipotizzare che NCX 6550 eserciti maggiori attività anti-infiammatorie in monocito/macrofagi umani che potrebbero derivare, almeno in parte, alle sue proprietà NO donatrici. Il lavoro è stato di recente pubblicato (Amoroso et al., 2010) su *Pharmacological Research*.

BIBLIOGRAFIA

- Amoruso A, Bardelli C, Fresu LG, Palma A, Vidali M, Ferrero V, Ribichini F, Vassanelli C, Brunelleschi S. Enhanced peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression in monocyte/macrophages from coronary artery disease patients and possible gender differences. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009, Nov;331(2):531-538.
- Barry L. Gruber, Darius Sorbi, Deborah L. French, Mary J. Marchese, Gerard J. Nuovo, Richard R. Kew, Leonard A. Arbeit, Markedly Elevated Serum MMP-9 (Gelatinase B) Levels in Rheumatoid Arthritis: A Potentially Useful Laboratory Marker, *Clinical Immunology and Immunopathology* 1996, 78(2):161-171.
- Basu S, Whiteman M, Matthey DL, Halliwell B. Raised levels of F(2)-isoprostanes and prostaglandin F(2alpha) in different rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis.* 2001, 60(6):627-631.
- Brennan P, Silman A. Why the gender difference in susceptibility to rheumatoid arthritis? *Ann Rheum Dis.* 1995, 54(9):694-695.
- Brunelleschi S, Bordin G, Colangelo D, Viano I. Tachykinin receptors on human monocytes: their involvement in rheumatoid arthritis. *Neuropeptides.* 1998, 32(3):215-223..
- Del Rincón ID, Williams K, Stern MP, Freeman GL, Escalante A. High incidence of cardiovascular events in a rheumatoid arthritis cohort not explained by traditional cardiac risk factors. *Arthritis Rheum.* 2001, 44(12):2737-2745.
- Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 2003, 423(6937):356-361
- Fuentes L, Roszer T, Ricote M. Inflammatory mediators and insulin resistance in obesity: role of nuclear receptor signaling in macrophages. *Mediators Inflamm.* 2010, 2010:1-10.
- Gabriel S, Crowsn C, O'Fallon WM. HEART Disease in Rheumatoid arthritis (RA). *Arthritis Rheum* 1998; 9 (suppl) S 132.
- Gerli R, Sherer Y, Bocci EB, Vaudo G, Moscatelli S, Shoenfeld Y. Precocious atherosclerosis in rheumatoid arthritis: role of traditional and disease-related cardiovascular risk factors. *Ann N Y Acad Sci.* 2007, 1108:372-381

- Harrison M. J. Young women with chronic disease: A female perspective on the impact and management of rheumatoid arthritis. *Arthritis Care & Research* 2003, 49: 846–852.
- Hounoki H, Sugiyama E, Mohamed SG, Shinoda K, Taki H, Abdel-Aziz HO, Maruyama M, Kobayashi M, Miyahara T. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits TNF-alpha-mediated osteoclast differentiation in human peripheral monocytes in part via suppression of monocyte chemoattractant protein-1 expression. *Bone*. 2008, 42(4):765-774.
- Jiang Y, Mishima H, Sakai S, Liu YK, Ohyabu Y, Uemura T. Gene expression analysis of major lineage-defining factors in human bone marrow cells: effect of aging, gender, and age-related disorders. *J Orthop Res*. 2008, 26(7):910-917.
- John H, Kitas G, Toms T, Goodson N. Cardiovascular co-morbidity in early rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2009, 23(1):71-82.
- Kawahito Y, Kondo M, Tsubouchi Y, Hashiramoto A, Bishop-Bailey D, Inoue K, Kohno M, Yamada R, Hla T, Sano H. 15-deoxy-delta(12,14)-PGJ(2) induces synoviocyte apoptosis and suppresses adjuvant-induced arthritis in rats. *J Clin Invest*. 2000, 106(2):189-197.
- Koufany M, Moulin D, Bianchi A, Muresan M, Sebillaud S, Netter P, Weryha G, Jouzeau JY. Anti-inflammatory effect of antidiabetic thiazolidinediones prevents bone resorption rather than cartilage changes in experimental polyarthritis. *Arthritis Res Ther*. 2008, 10(1):R6.
- Kvalvik AG, Jones MA, Symmons DP. Mortality in a cohort of Norwegian patients with rheumatoid arthritis followed from 1977 to 1992. *Scand J Rheumatol*. 2000, 29(1):29-37.
- Lawrence RC, Felson DT, Helmick CG, Arnold LM, Choi H, Deyo RA, Gabriel S, Hirsch R, Hochberg MC, Hunder GG, Jordan JM, Katz JN, Kremers HM, Wolfe F; National Arthritis Data Workgroup. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part II. *Arthritis Rheum*. 2008, 58(1):26-35.
- Libby P. Role of inflammation in atherosclerosis associated with rheumatoid arthritis. *Am J Med*. 2008, 121(10 Suppl 1):S21-31.
- Liuzzo G, Goronzy JJ, Yang H, Kopecky SL, Holmes DR, Frye RL, Weyand CM. Monoclonal T-cell proliferation and plaque instability in acute coronary syndromes. *Circulation*. 2000, 101(25):2883-2888.

- Liuzzo G, Kopecky SL, Frye RL, O'Fallon WM, Maseri A, Goronzy JJ, Weyand CM. Perturbation of the T-cell repertoire in patients with unstable angina. *Circulation*. 1999, 100(21):2135-2139.
- Martens PB, Goronzy JJ, Schaid D, Weyand CM. Expansion of unusual CD4+ T cells in severe rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1997, 40(6):1106-1114
- Masi AT. Incidence of rheumatoid arthritis: do the observed age-sex interaction patterns support a role of androgenic-anabolic steroid deficiency in its pathogenesis? *Br J Rheumatol*. 1994, 33(8):697-699.
- Müller-Ladner U, Pap T, Gay RE, Neidhart M, Gay S. Mechanisms of disease: the molecular and cellular basis of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2005, 1(2):102-110.
- Myllykangas-Luosujärvi R, Aho K, Kautiainen H, Isomäki H. Cardiovascular mortality in women with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 1995, 22(6):1065-1067.
- Namekawa T, Wagner UG, Goronzy JJ, Weyand CM. Functional subsets of CD4 T cells in rheumatoid synovitis. *Arthritis Rheum*. 1998, 41(12):2108-2116.
- Ozbalkan Z, Efe C, Cesur M, Ertek S, Nasiroglu N, Berneis K, Rizzo M. An update on the relationships between rheumatoid arthritis and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2010. [Epub ahead of print]
- Pasceri V, Yeh ET. A tale of two diseases: atherosclerosis and rheumatoid arthritis. *Circulation*. 1999, 23;100(21):2124-2126.
- Ricote M, Huang JT, Welch JS, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor(PPAR γ) as a regulator of monocyte/macrophage function. *J Leukoc Biol*. 1999, 66(5):733-739.
- Roman MJ, Moeller E, Davis A, Paget SA, Crow MK, Lockshin MD, Sammaritano L, Devereux RB, Schwartz JE, Levine DM, Salmon JE. Preclinical carotid atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med*. 2006, 21;144(4):249-56.
- Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J*. 1999, 138(5 Pt 2):S419-20.
- Sattar N, McCarey DW, Capell H, McInnes IB. Explaining how "high-grade" systemic inflammation accelerates vascular risk in rheumatoid arthritis. *Circulation*. 2003, 16;108(24):2957-2963.

- Shiojiri T, Wada K, Nakajima A, Katayama K, Shibuya A, Kudo C, Kadowaki T, Mayumi T, Yura Y, Kamisaki Y. PPAR gamma ligands inhibit nitrotyrosine formation and inflammatory mediator expressions in adjuvant-induced rheumatoid arthritis mice. *Eur J Pharmacol.* 2002, 19;448(2-3):231-238.
- Solomon DH, Karlson EW, Rimm EB, Cannuscio CC, Mandl LA, Manson JE, Stampfer MJ, Curhan GC. Cardiovascular morbidity and mortality in women diagnosed with rheumatoid arthritis. *Circulation.* 2003, 11;107(9):1303-1307
- Stastny P. Rheumatoid arthritis: relationship with HLA-D. *Am J Med.* 1983, 30;75(6A):9-15.
- Superko HR, Gadesam RR. Is it LDL particle size or number that correlates with risk for cardiovascular disease? *Curr Atheroscler Rep.*2008, 10(5):377-385.
- Széles L, Töröcsik D, Nagy L. PPARgamma in immunity and inflammation: cell types and diseases. *Biochim Biophys Acta.* 2007, 1771(8):1014-1030.
- Van Doornum S, McColl G, Wicks IP. Accelerated atherosclerosis: an extra articular feature of rheumatoid arthritis? *Arthritis Rheum.* 2002, 46(4):862-873
- Wallberg-Jonsson S, Ohman ML, Dahlqvist SR. Cardiovascular morbidity and mortality in patients with seropositive rheumatoid arthritis in Northern Sweden. *J Rheumatol.* 1997, 24(3):445-451.
- White D, Fayed S, Doube A. Atherogenic lipid profiles in rheumatoid arthritis. *N Z Med J.* 2006, 18;119(1240):U2125
- Wolfe R, Hitchell DM, Sibley JT, Friese JF, Bloch DD, Williams CA, et al. The mortality of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1994, 37: 481-494.
- Zal B, Kaski JC, Arno G, Akiyu JP, Xu Q, Cole D, Whelan M, Russell N, MadrigalJA, Dodi IA, Baboonian C. Heat-shock protein 60-reactive CD4+CD28null T cells in patients with acute coronary syndromes.*Circulation.* 2004, 16;109(10):1230-1235

Seminari interni al Dipartimento di Scienze Mediche AA 2009-2010

1. **Regolazione del metabolismo del ferro: nuove acquisizioni**
Prof.ssa C. Camaschella 10/10/2009
2. **Naproxcinod, un nuovo anti-infiammatorio con elevata tollerabilità cardiovascolare**
Dr.E. Ongini 4/11/09
3. **ALK e tumorigenesi**
Prof. G. Inghirami 17/11/09
4. **Use of MAR epigenetic regulators for therapeutic expression**
Prof. N. Mermoud 30/11/09
5. **Controllo funzionale dei linfociti T da parte di adenosina trifosfato (ATP) extracellulare**
Prof. F. Grassi 14/12/09
6. **LSD1, Lysine Specific Demethylase1: insight into a new epigenetic regulator involved in neuronal gene regulation**
Dr. E. Battaglioli 20/01/10
7. **Dal difetto genetico all'infiammazione**
Prof. L. Maturi 28/01/10
8. **R & D of magnetic-nanoparticles and carriers for drugs**
Dr. G. Baldi 9/02/10
9. **Prediction of RNA-RNA interaction**
Prof. H.Tafer 26/05/10
10. **Combating Bioterrorism: New Antidotes for an Old Poison**
Dr. S.R. Ellis 10/06/10
11. **Fenotipo e cellule staminali tumorali nei glomi**
Prof. D. Schiffer 14/06/10
12. **MicroRna nella terapia tumorale**
Prof.ssa C. Ponzetto 15/06/10
13. **Identificazione di antigeni per la diagnosi e la terapia del carcinoma pancreatico mediante l'analisi sierologica del proteoma**
Prof. F. Novelli 30/06/10
14. **Role of membrane lipids in neuronal synapses organization**
Prof.ssa P. Camoletto 5/07/10

15. Ruolo delle microvescicole nella comunicazione tra cellule

Prof. G. Camusi 6/09/10

16. Prevention and cure of autochthonous mammary carcinomas in her2 transgenic mice?

Prof.ssa F. Cavallo 17/09/10

17. Le cellule staminali tumorali: dalla biologia alla clinica

Prof. R. De Maria 22/09/10

18. Preventing Persisters: Targeting Epigenetic Changes in Cancer Chemotherapy

Dr. S.R. Ellis 23/09/10

ATTIVITA' FORMATIVA SVOLTA

- Lezioni frontali di oncologia (Prof. Albano) interni al dipartimento
- Journal Club interni al dipartimento

PARTECIPAZIONE CONGRESSI

- 34° Congresso S.I.F. "Il valore del farmaco per la tutela della salute"
Rimini, 14-17 Ottobre 2010
- 3rd European Workshop on Lipid Mediators"
Parigi, 3-4 Giugno 2010

RISULTATI DEL PROGETTO PUBBLICATI SU RIVISTE INTERNAZIONALI

Amoruso A, Bardelli C, Fresu LG, Palma A, Vidali M, Ferrero V, Ribichini F, Vassanelli C, Brunelleschi S. Enhanced peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression in monocyte/macrophages from coronary artery disease patients and possible gender differences. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009, 331(2):531-8.

Amoruso A, Bardelli C, Fresu LG, Poletti E, Palma A, Canova DF, Zeng HW, Ongini E, Brunelleschi S. The nitric oxide-donating pravastatin, NCX 6550, inhibits cytokine release and NF- κ B activation while enhancing PPAR γ expression in human monocyte/macrophages. *Pharmacol Res.* 2010, 62(5):391-9.