



**Università degli Studi di Ferrara**

---

**Dottorato di ricerca in  
Farmacologia e Oncologia molecolare**

**COORDINATORE Prof. Pier Andrea Borea**

**“CARATTERIZZAZIONE FENOTIPICA E FUNZIONALE DEI  
RECETTORI DELL’ADENOSINA NELL’ARTRITE  
REUMATOIDE”**

**Settore Scientifico Disciplinare MED/16**

**Dottorando  
Dott. Alfonso Massara**

**Tutore  
Prof. Francesco Trotta**

---

**CICLO XXI**

**Anni 2006/2008**

## INDICE

<b><i>CAPITOLO I- L'artrite reumatoide</i></b>	<b>pag. 1</b>
<b><i>CAPITOLO II- Gli antagonisti del TNF<math>\alpha</math></i></b>	<b>pag. 23</b>
<b><i>CAPITOLO III- L'adenosina e i suoi recettori</i></b>	<b>pag. 32</b>
<b><i>CAPITOLO IV- Scopo della tesi</i></b>	<b>pag. 49</b>
<b><i>CAPITOLO V- Pazienti e metodi</i></b>	<b>pag. 52</b>
<b><i>CAPITOLO VI- Risultati</i></b>	<b>pag. 57</b>
<b><i>CAPITOLO VII- Discussione</i></b>	<b>pag. 61</b>
<b><i>CAPITOLO VIII- Conclusioni</i></b>	<b>pag. 65</b>
<b><i>FIGURE E TABELLE</i></b>	<b>pag. 66</b>
<b><i>BIBLIOGRAFIA</i></b>	<b>pag. 74</b>

## Capitolo I

### **L'ARTRITE REUMATOIDE**

L'artrite reumatoide è una patologia che può essere classificata tra i reumatismi infiammatori cronici.

Storicamente, la prima descrizione di tale malattia risale al XIX secolo, ad opera di uno studente francese, Augustin-Jacob Landrè-Beauvais; mentre il termine "artrite reumatoide" fu coniato da sir Alfred Bering Garrod nel 1876 e fu adottato definitivamente dall'American Rheumatism Association (ARA) nel 1941 (1).

Si tratta di una malattia infiammatoria cronica, a carattere sistemico con sintomi prevalentemente, ma non esclusivamente, a carico dell'apparato locomotore e con coinvolgimento variabile, ma costante, del sistema immunitario. Potenzialmente può interessare ogni distretto dell'organismo, ma il vero bersaglio della malattia sono le articolazioni diartrodali dove si verifica un processo infiammatorio a carattere erosivo che può portare alla distruzione dei capi ossei iuxta-articolari e all'anchilosi. L'artrite reumatoide presenta, quindi, un'espressività clinica polimorfa, in relazione alla topografia, al grado di evoluzione dell'impegno articolare e alla possibile presenza di manifestazioni extra-articolari.

#### **EPIDEMIOLOGIA**

L'artrite reumatoide è una malattia ubiquitaria, senza predilezione di razza o di clima, la prevalenza è genericamente dello 0,3 - 2%; in Italia uno studio ha dimostrato una prevalenza dello 0,33% nella popolazione generale, dello 0,13% negli uomini e 0,51% nelle donne (2).

L'incidenza negli uomini è di 0,1 - 0,2 nuovi casi / 1000 abitanti / anno, mentre nelle donne è di 0,2 - 0,4 casi / 1000 abitanti / anno. Le femmine sono quindi più colpite che gli uomini, con un rapporto maschi / femmine di 1 : 2 / 1 : 4.

L'esordio della malattia può avvenire a qualunque età, anche se è più frequente in soggetti di età compresa tra i 40 e i 60 anni.

L'artrite reumatoide comporta una riduzione della qualità di vita e perdita della capacità lavorativa entro 10 anni dall'esordio in oltre il 50% dei soggetti affetti (3); anche l'aspettativa di vita appare ridotta in questi soggetti, infatti molti studi

sostengono che essa si accorci di 5-10 anni nei pazienti con artrite reumatoide rispetto alla popolazione generale (4).

## **EZIOPATOGENESI**

L'eziopatogenesi dell'artrite reumatoide non è completamente nota. Il modello patogenetico attualmente più accreditato prevede che un individuo geneticamente predisposto entri in contatto con antigeni scatenanti; si attiva così il sistema immunitario che sviluppa un'inflammazione acuta sostenuta sia dal sistema umorale che da quello cellulare. Subentra poi un processo di auto-mantenimento dell'inflammazione con cronicizzazione della patologia.

Per quanto riguarda la predisposizione genetica, è stato dimostrato tramite studi sierologici e colture linfocitarie, che il 60-70% dei pazienti di razza caucasica affetti da artrite reumatoide presenta gli antigeni di classe II HLA-DR4 e DR1 (5).

Sono state fatte numerose ipotesi su quale possa essere l'antigene scatenante, considerando possibile anche il fatto che più antigeni agiscano contemporaneamente. Gli antigeni proposti comprendono: agenti batterici (streptococchi, E.Coli, alcuni clostridi, difteroidi, micobatteri e micoplasmi), agenti virali (Ebstein Barr Virus, Parvovirus B19, il virus della varicella, della rosolia, della parotite, Herpes Simplex Virus, etc.) e superantigeni (proteine sintetizzate da streptococchi, stafilococchi e micoplasmi); essi possono concorrere allo scatenamento dell'inflammazione articolare sia attraverso un meccanismo di infezione diretta che attraverso un meccanismo indiretto. Quest'ultimo rappresenta l'ipotesi più probabile e prevede lo sviluppo di una risposta immunitaria crociata tra antigeni microbici e auto-antigeni articolari. Inoltre alcuni autoantigeni (epitopi del collagene, proteoglicani, frammenti Fc delle Ig-G) sono coinvolti nell'eziopatogenesi dell'artrite reumatoide; essi, però, intervengono soprattutto nel processo di cronicizzazione della malattia piuttosto che nello scatenamento. Alcuni epitopi del collagene, infatti, vengono liberati durante i processi degenerativi dovuti allo sviluppo del panno sinoviale con conseguente produzione di anticorpi anti-collagene e immunocomplessi. Inoltre, nei soggetti affetti dalla patologia in esame, si ritrovano bassi livelli di enzimi coinvolti nella glicosilazione delle Ig-G con conseguente alterazione della normale struttura di tali immunoglobuline che vengono riconosciute come estranee dal sistema immunitario; si ha, quindi, la

produzione del cosiddetto Fattore Reumatoide (FR), un auto-anticorpo che appartiene, nella maggior parte dei casi, alla classe Ig-M, rivolto contro il frammento Fc delle Ig-G. Il fattore reumatoide assume importanza anche dal punto di vista diagnostico e prognostico.

L'interazione della predisposizione genetica con la presenza di antigeni scatenanti dà il via alla risposta infiammatoria: schematicamente, si può dire che, innanzitutto, si ha l'attivazione dei linfociti CD4+ con produzione di IL-4 che a sua volta autoalimenta l'attivazione di questa classe di linfociti, nonché attiva anche i linfociti B, i monociti-macrofagi e i sinoviociti. Tutti gli elementi cellulari coinvolti concorrono nell'attivare altri gruppi di cellule, così da mantenere l'infiammazione: ad esempio, i monociti-macrofagi producono IL-4 che stimola i linfociti CD4+ e inoltre attivano i linfociti B.

Questi ultimi sono i produttori del fattore reumatoide e degli anticorpi contro l'antigene scatenante (o gli antigeni scatenanti) con conseguente formazione di immunocomplessi che vanno a localizzarsi a livello della cartilagine articolare e del liquido sinoviale con conseguente infiammazione sinoviale acuta, nonché si depositano anche a livello dei vasi extra-articolari, come punto di partenza del danno sistemico.

Le citochine prodotte dai linfociti T e dai macrofagi-monociti-sinoviociti (IL-1, IL-6, IL-8, INF- $\gamma$ , TNF $\alpha$ , CSF-1) stimolano invece la proliferazione sinoviale sia per quanto riguarda i sinoviociti A che B, l'infiammazione così si auto-mantiene e diventa di tipo cronico, caratterizzata dalla produzione del panno sinoviale, cioè un tessuto di granulazione distruttiva che invade la cartilagine ialina articolare, i tendini e l'osso subcondrale.

Quindi, nell'artrite reumatoide si verifica una perdita di equilibrio tra le citochine pro-infiammatorie e quelle anti-infiammatorie.

L'IL-1 e il TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor alpha) sono le due citochine che rivestono un ruolo fondamentale nell'infiammazione dell'artrite reumatoide in quanto sono in grado di alimentare e mantenere attivo il processo flogistico. La conoscenza del loro ruolo è importante da un punto di vista terapeutico soprattutto da quando sono stati introdotti in commercio i farmaci biologici.

La storia naturale dell'artrite reumatoide si articola in tre fasi: la fase dell'induzione, la fase dell'infiammazione e la fase mesenchimale o distruttiva.

L'induzione è caratterizzata da una risposta rapida a molteplici stimoli patogeni, l'infiammazione dagli aspetti tipici della sinovite e la fase distruttiva dalla presenza di erosioni e danno cartilagineo.

Le tre fasi patogenetiche dette sono rispecchiate dalle tappe fisiopatologiche della sinovite reumatoide:

**STADIO 1:** si ha la presentazione dell'antigene artritogeno ai linfociti T CD4+  
La clinica, il laboratorio, gli aspetti istologici e radiologici non sono manifesti.

**STADIO 2 e 3:** *Reclutamento e amplificazione*

Si assiste allo sviluppo della sinovite e alla cronicizzazione del processo: ha inizio la produzione del panno e la formazione dei villi.

Comincia una sensazione di malessere generale e astenia (per produzione di IL-1 e TNF) con rigidità mattutina, si manifesta una tumefazione articolare e una dolorabilità alla digitopressione di alcune piccole articolazioni. Tali sintomi vanno progressivamente accentuandosi e coinvolgendo sempre più articolazioni, la dolorabilità diventa vero dolore e si aggiunge al quadro la limitazione funzionale per accumulo di liquido e proliferazione dei tessuti molli all'interno dell'articolazione.

Il laboratorio indica aumenti degli indici di flogosi e del numero dei polimorfonucleati.

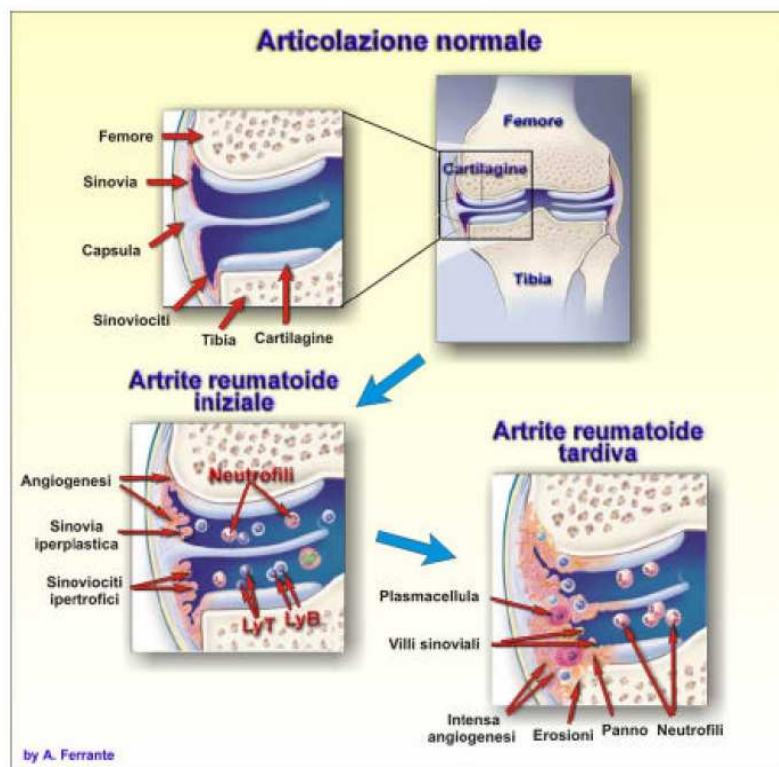
Il quadro radiologico è invece ancora silente.

**STADIO 4:** *Formazione del panno sinoviale*

Il panno sinoviale si sviluppa in modo centripeto: distrugge la cartilagine articolare dal punto in cui si continua con la membrana sinoviale.

Il quadro clinico diventa totalmente conclamato con accentuazione di tutti i segni di flogosi, nonché aumenta la limitazione funzionale articolare, gli indici di laboratorio sono positivi e all'esame radiografico si apprezza un ispessimento della capsula, una diminuzione della rima articolare causata dai processi distruttivi a carico della cartilagine e i segni di osteoporosi peri-articolare.

STADIO 5: il panno articolare invade la cartilagine, l'osso subcondrale, riempie tutta l'articolazione e altera l'integrità delle strutture peri-articolari, come tendini e legamenti. Dopo 20-30 anni dall'inizio del processo, i capi articolari possono risultare uniti. Ovviamente la sintomatologia è presente in grado elevato, inoltre si sviluppano deformità articolari e all'esame radiografico compaiono le erosioni.



**Figura 1.** *Patogenesi dell'artrite reumatoide.*

## ANATOMIA PATOLOGICA

### ARTICOLAZIONI

A livello della membrana sinoviale si riscontra lo sviluppo di edema, neoangiogenesi, rilascio di enzimi che danneggiano le strutture presenti, proliferazione di sinoviociti e fibroblasti, infiltrazione da parte di linfociti, plasmacellule, monociti e macrofagi. Un'importante distinzione è che si ritrovano pochi neutrofilii nel tessuto sinoviale, ma molti nel liquido sinoviale. La proliferazione dei fibroblasti comporta una trasformazione mesenchimale delle

strutture: inizialmente si tratta di una proliferazione disordinata che poi diventa a polarizzazione centripeta con formazione del panno; in questo processo si verifica anche l'iperplasia villosa del tessuto sinoviale. I villi possono andare in necrosi e liberarsi nel cavo articolare, dove sono identificabili come *corpi risiformi*, cioè frammenti di membrana sinoviale circondati da fibrina, fibronectina e collagene. Essi, insieme all'aumento della cellularità e alla presenza di materiale degradato, sia cartilagineo che sinoviale, concorrono all'intorbidimento del liquido sinoviale.

Per quanto riguarda le lesioni ossee, esse iniziano in corrispondenza delle cosiddette *bare areas*, zone di osso intra-articolare non coperte da cartilagine, e sono caratterizzate dalla presenza di un processo osteolitico e da fenomeni di rimodellamento e neoformazione, in particolare è tipico il riscontro di osteoporosi iuxta-articolare, dovuta all'immobilità articolare e alla produzione di PGE2 durante il processo infiammatorio (essa è infatti una linfocina attivante gli osteoclasti).

Ovviamente, la cartilagine articolare è coinvolta nel processo, ma a differenza del danno osseo, la lesione inizia alla periferia della cartilagine, fino alla sua completa distruzione.

Le articolazioni col tempo possono andare incontro ad anchilosi: ciò è dovuto al fatto che a livello del tessuto di granulazione si possono sviluppare aderenze che evolvono in cicatrizzazione e successivamente, per fenomeni di metaplasia, in anchilosi di natura fibrosa, cartilaginea e raramente ossea.

## **QUADRO CLINICO**

Il decorso dell'artrite reumatoide può essere eterogeneo: può manifestarsi sotto forma di malattia pauciarticolare di modesta entità con scarso danno articolare o di poliartrite progressiva a rapida evoluzione ed invalidante.

Per quanto riguarda le modalità di esordio, nel 70% dei casi esso è graduale e insidioso, cominciando con artralgie e rigidità mattutina che dura per settimane o mesi prima di evolvere in un'artrite franca. Nel 20% dei casi l'esordio è subacuto e nel 10% è acuto: in questo caso si hanno fin dall'inizio tutti i segni di flogosi.

L'aspetto tipico di presentazione della patologia è quello di un interessamento poliarticolare e simmetrico, mentre più raramente si manifesta con un coinvolgimento mono- o oligo-articolare. Manifestazioni sistemiche, quali febbre, perdita di peso, mialgia e rash cutaneo, possono accompagnare quelle articolari e



solo molto raramente le precedono. Sempre raramente l'esordio è di tipo palindromico (dolore e tumefazione, localizzati a una o più articolazioni, che poi si risolvono completamente, ma ricorrono; soprattutto a mani e piedi) o simile alla polimialgia reumatica. Quest'ultima modalità è più frequente nell'artrite reumatoide senile.

### ***Manifestazioni articolari***

Le manifestazioni articolari sono chiaramente le più importanti del quadro clinico dell'artrite reumatoide, esse colpiscono le articolazioni diartrodiali e si evidenziano come una poliartrite con distribuzione simmetrica, andamento centripeto e carattere aggiuntivo. Quindi, le prime articolazioni interessate sono le piccole articolazioni delle mani e dei piedi e progressivamente quelle più prossimali; vengono coinvolte sempre nuove articolazioni senza risoluzione del processo morboso in quelle precedentemente interessate.

Le articolazioni più colpite sono:

- interfalangee prossimali delle mani
- metacarpo-falangee
- polsi
- metatarso-falangee

Altre articolazioni frequentemente coinvolte sono le interfalangee prossimali dei piedi, le ginocchia, i gomiti, le caviglie, le spalle, le anche, la colonna cervicale, l'articolazione temporo-mandibolare e le crico-aritenoidi.

Tale interessamento si manifesta con i segni e i sintomi tipici dell'infiammazione:

- dolore spontaneo, continuo che aumenta con il movimento e il carico
- rigidità articolare che dura almeno un'ora e fino a 2-3 ore al mattino o dopo lunga inattività (al contrario di quanto avviene nell'osteoartrite dove la rigidità è di breve durata)
- debolezza e facile affaticabilità
- tumefazione articolare più evidente sulla superficie estensoria, dove la capsula è più distendibile; essa può essere dovuta a versamento, ipertrofia, iperplasia della membrana sinoviale o a edema dei tessuti molli periarticolari
- rossore e calore della cute sovrastante

- limitazione funzionale: inizialmente è dovuta alla sinovite, al versamento ed alla contrattura muscolare antalgica, successivamente alla deformazione articolare ed all'anchilosi.

Col passare degli anni la patologia può evolvere in deformità a livello di diversi distretti articolari. Ad esempio sono tipiche le cosiddette dita della mano “a colpo di vento”, dovute alla tumefazione delle metacarpo-falangee a livello dorsale con sublussazione volare delle falangi prossimali sulle ossa metacarpali e stiramento del tendine estensore che scivola lateralmente. A livello della mano si possono riscontrare altre deformazioni tipiche: il dito “a asola” o *en boutonniere* (iperflessione con rigidità delle interfalangee prossimali, iperestensione delle interfalangee distali), dita “a collo di cigno” (interfalangee prossimali iperestese, interfalangee distali flesse), pollice a Z (iperflessione della metacarpofalangea del primo dito e iperestensione dell'interfalangea), dita a gobba di dromedario (sublussazione volare dei metacarpi).

A livello del polso, invece, si può obiettivare il cosiddetto “segno del tasto del pianoforte”, cioè la riduzione manuale e temporanea della sublussazione dorsale dell'estremità distale dell'ulna (*caput ulnae*) per il rilassamento dell'apparato capsulo-legamentoso di questo distretto.

Un altro distretto spesso coinvolto e deformato dall'artrite reumatoide è il piede: la zona più frequentemente coinvolta è l'avampiede dove si può sviluppare inizialmente una metatarsalgia, in seguito una vera artrite a livello delle metatarsofalangee e infine un crollo dell'arcata plantare e conseguente ipercheratosi a livello della II, III e IV testa metatarsale. L'evoluzione successiva può comportare la sublussazione plantare delle teste metatarsali (“dita a martello”), che rimangono così prive del cuscinetto fibro-adiposo che le protegge dall'usura meccanica, e il valgismo dell'alluce; la presenza di queste due deformazioni è la causa dell'aspetto triangolare del piede reumatoide.

Il ginocchio può andare incontro a una deformazione in varo o in valgo, per lassità dei legamenti collaterali. A livello di questa articolazione è importante anche ricercare eventuali cisti di Baker: si tratta di cisti sinoviali nel cavo popliteo dovute a erniazione della membrana per aumento della pressione sinoviale. Tali cisti possono creare complicazioni aggravando la limitazione funzionale, comprimendo le vene che attraversano questo distretto e quindi dando origine a un edema degli arti inferiori, oppure, rompendosi possono dar luogo a un quadro tipo tromboflebite acuta.

Infine una stazione articolare che può creare serie complicazioni quando viene interessata è quella della colonna cervicale, a livello dell'articolazione atlanto-odontoidea, dove l'erosione del dente dell'epistrofeo può causare sublussazioni posteriori del dente stesso con rischio di compromissione midollare.

Anche le strutture periarticolari possono essere coinvolte nel processo infiammatorio con lo sviluppo di borsiti e le tenosinoviti. Queste ultime possono essere addirittura il primo sintomo della malattia e sono caratterizzate da dolore nel movimento e tumefazione lungo il decorso dei tendini. Inoltre a livello delle guaine tendinee possono localizzarsi i noduli reumatoidi, impedendo così lo scivolamento del tendine nella guaina.

### ***Manifestazioni extra-articolari***

Dal momento che l'artrite reumatoide è una malattia sistemica, diversi distretti dell'organismo, oltre alle articolazioni, sono coinvolti dal processo patologico in un numero significativo di casi. Inoltre l'interessamento extra-articolare ha un peso importante nell'aumentare la mortalità nei pazienti affetti dalla malattia.

Cute: a livello sottocutaneo e intracutaneo possono localizzarsi dei noduli reumatoidi.

La cute può essere interessata da un processo vasculitico caratterizzato da microinfarti periungueali, porpora e ulcere cutanee.

Polmoni: l'interessamento polmonare risulta molto importante dal punto di vista prognostico poiché rappresenta un'importante causa di decesso tra i pazienti con artrite reumatoide. La pleurite è la più comune manifestazione intratoracica della malattia, associata frequentemente a versamento essudativo e più raramente a empiema. Altra estrinsecazione della patologia reumatica a livello polmonare è la malattia interstiziale e la pneumopatia nodulare (6). Come a tutti i livelli possiamo avere un interessamento vascolare che, in questo caso, si manifesta come arterite polmonare.

Una sindrome caratteristica che può colpire pazienti affetti da artrite reumatoide con pneumoconiosi è la sindrome di Caplan che consiste in un processo fibroso nodulare diffuso.

Apparato cardio-vascolare: riveste particolare importanza in questo contesto la cardiopatia ischemica, che sembra rappresentare la causa di morte di circa il 40% di pazienti reumatoidi (7). Si ritiene infatti che l'artrite reumatoide

comporti la presenza di fattori di rischio specifici per la cardiopatia ischemica in aggiunta a quelli classici (età, sesso maschile, elevati livelli di colesterolo LDL, fumo, ipertensione, etc.): infatti la flogosi cronica svolge un ruolo fondamentale nel danno endoteliale e nell'aterogenesi precoce osservata nei pazienti con artrite reumatoide (8).

Altri possibili interessamenti dell'apparato cardio-vascolare sono rappresentati da pericardite, che spesso ha un andamento subclinico, da miocardite dovuta a vasculite o amiloidosi, da endocardite per localizzazione di noduli reumatoidi a livello dell'endocardio, da vasculite coronaria e da interessamento del tessuto di conduzione.

Muscoli: due complicanze dell'artrite reumatoide sono l'ipotrofia muscolare da disuso, localizzata o generalizzata, e la miopatia da cortisone: entrambe contribuiscono alla debolezza muscolare tipica della malattia.

Oss: l'osteoporosi secondaria all'artrite reumatoide può essere localizzata o generalizzata: nel primo caso è indotta dalla sinovite, mentre nel secondo dalla diminuzione dell'attività fisica e dalla terapia con corticosteroidi.

Sistema nervoso: il sistema nervoso centrale è interessato in casi rarissimi, ma vanno sempre tenute in considerazione le conseguenze psicologiche di una malattia cronica, invalidante e accompagnata da dolore.

Il sistema nervoso periferico può essere interessato per sindromi da intrappolamento, neuropatia sensitiva distale e mononeurite multipla. Le prime sono causate dall'aumento di pressione che l'infiammazione e l'edema esercitano sui nervi quando transitano in spazi inestensibili: è il caso della sindrome del tunnel carpale e della mielopatia cervicale. La neuropatia sensitiva distale e la mononeurite multipla sono invece dovute a fenomeni vasculitici.

Ren: l'interessamento renale è principalmente dovuto agli effetti che possono avere su quest'organo diversi farmaci usati nel trattamento dell'artrite reumatoide, oppure può essere dovuto ad amiloidosi o, più raramente, a vasculite reumatica.

Apparato gastro-enterico: anche in questo caso l'interessamento può essere dovuto ad amiloidosi o a vasculite. Inoltre, è rilevante l'interessamento iatrogeno, soprattutto per quel che riguarda i FANS.

Occhio: il coinvolgimento oculare si presenta in genere in soggetti con una malattia di lunga durata, caratterizzata dalla formazione di noduli. Le due manifestazioni principali sono rappresentate dalla sclerite e dall'episclerite.

## **INQUADRAMENTO DIAGNOSTICO**

La diagnosi di artrite reumatoide è agevole nelle fasi avanzate della malattia e si avvale dell'esame obiettivo, di esami laboratoristici e strumentali. Nelle fasi precoci, però, può risultare più difficile dal momento che in questi stadi le alterazioni sono molto simili a quelle presenti in altre malattie infiammatorie articolari o sistemiche.

### ***Dati di laboratorio***

Non esistono test di laboratorio specifici per la diagnosi di artrite reumatoide, tuttavia alcuni dati possono aiutare nell'orientamento diagnostico e nella valutazione della fase di attività della malattia.

Gli indici di flogosi, in particolare la velocità di eritrosedimentazione (VES) e i livelli di proteina C reattiva (PCR), ma anche il dosaggio di  $\alpha_2$ -globuline, fibrinogeno, aptoglobina, etc, sono aumentati nella quasi totalità dei pazienti con malattia in fase attiva, mentre tornano a livelli più bassi nelle fasi di remissione.

Altra ricerca importante è quella di alcuni auto-anticorpi: tra questi il fattore reumatoide permette di classificare un'artrite come siero-positiva, fatto che predispone allo sviluppo di una malattia più aggressiva e con interessamento extra-articolare. I test più comunemente usati servono a rilevare la presenza del fattore reumatoide di classe Ig-M. Esso è presente in media nel 70% dei pazienti con artrite reumatoide, ma non è specifico per questa patologia infatti può essere riscontrato anche in soggetti sani, in particolare negli anziani in quanto la sua presenza nella popolazione generale aumenta in funzione dell'età. Inoltre, numerose patologie, oltre all'artrite reumatoide, si associano alla presenza del fattore reumatoide, tra queste ricordiamo il LES, la sindrome di Sjogren, la sclerodermia, la tubercolosi, la sifilide, la malattia di Lyme, la mononucleosi infettiva, l'AIDS, alcune leucemie e linfomi, il mieloma multiplo, le malattie epatiche croniche, la sarcoidosi e altre ancora.

Altri auto-anticorpi utili da ricercare nel sospetto di un'artrite reumatoide sono gli anticorpi anti-citrullina detti anti-CCP (anti cycle citrullinate peptide) che hanno un elevato valore predittivo e una specificità superiore al fattore reumatoide. Questi anticorpi possono comparire molto precocemente, anche 10 anni prima dell'esordio della malattia, anticipando il danno erosivo, oppure pochi mesi prima (9).

È inoltre frequente nel corso di artrite reumatoide il riscontro di un'anemia normocromica e normocitica, tipica delle malattie croniche.

Infine può essere presente ipergammaglobulinemia: di classe Ig-G nella fase precoce, Ig-M in quella avanzata e Ig-A nelle forme a evoluzione particolarmente severa.

### ***Valutazione radiografica***

L'esame radiografico diretto è l'indagine di prima istanza, in parallelo alla valutazione clinica e laboratoristica, per valutare il danno articolare nell'artrite reumatoide. Esso è particolarmente utile per il follow-up della malattia e determinare l'efficacia della terapia farmacologica. Il consiglio che emerge della letteratura attuale è quello di un follow-up radiologico annuale (o addirittura, almeno inizialmente, semestrale) nel monitoraggio dell'artrite reumatoide.

La necessità sia di confrontare concretamente nel tempo l'evoluzione delle erosioni ossee di un determinato paziente, sia di poter confrontare casistiche diverse, trattate con diverse terapie, ha portato alla elaborazione di metodi condivisi e validati di valutazione del danno articolare.

Le due metodiche valutative attualmente più diffuse sono i metodi di Larsen e Sharp.

Metodo di Larsen- È stato sviluppato negli anni '70 appunto da Larsen et al. (10) e poi più volte modificato. Può essere applicato a più articolazioni, ma viene di solito utilizzato per le articolazioni delle mani, dei polsi e dei piedi partendo da un Rx standard di confronto. Per ciascuna articolazione viene applicato un punteggio che va da 0 a 5 in relazione alla severità del danno. Vengono prese in considerazione 32 aree articolari, comprendenti 16 aree in entrambe le mani, 8 aree in entrambi i polsi ed 8 aree in entrambi i piedi: lo score è:

= 0 se non ci sono erosioni visibili;

- = 1 se le erosioni sono <1mm o vi è una lieve riduzione dell'interlinea articolare, osteoporosi iuxta-articolare, edema dei tessuti molli;
- = 2 se l'erosione è >1mm con riduzione dello spazio articolare <50% rispetto a un'articolazione sana;
- = 3 se l'erosione è >1mm con riduzione dello spazio articolare >50% rispetto a un'articolazione sana,
- = 4 se vi è ablazione dello spazio articolare con profilo osseo almeno in parte conservato;
- = 5 se vi è ablazione dello spazio articolare con profilo osseo non conservato.

Le erosioni vengono registrate in relazione alla superficie coinvolta. Il punteggio massimo è 5. Quando il processo erosivo comporta la perdita estesa dell'osso per più della metà dell'intera articolazione in un'articolazione metacarpo-falangea, inter-falangea prossimale o carpale, viene assegnato il valore massimo 5. Il restringimento dello spazio articolare viene registrato con un punteggio di 1 se focale, 2 se < del 50% dell'articolazione originaria, 3 se > del 50% dell'articolazione originaria; l'anchilosi comporta un punteggio di 4, mentre le sublussazioni non vengono registrate (vedi tabella 2).

Van der Heijde ha proposto e validato una versione modificata del metodo di Sharp per lo studio della progressione radiologica a livello di mani e piedi, considerando 16 articolazioni per ciascuna mano e polso e 6 articolazioni per ciascun piede (11). Questi metodi vengono comunemente utilizzati per valutare la capacità dei farmaci di rallentare la progressione radiologica dell'artrite reumatoide.

### ***Altre metodiche strumentali***

La radiologia convenzionale non è in grado di rilevare precocemente le lesioni elementari. Per tale ragione si sono andate affermando altre tecniche come l'ecografia articolare e la risonanza magnetica (RM). L'ecografia con l'impiego di sonde ad alta frequenza consente lo studio dettagliato dei tessuti molli (12). L'integrazione con la tecnica power Doppler e con mezzi di contrasto ecografici, fornisce utili informazioni sulla vascolarizzazione del panno sinoviale e, quindi, sull'entità e l'evoluzione del processo flogistico. La RM, grazie al suo contrasto naturale ed alla multiplanarietà dei piani di studio, fornisce immagini ad elevata risoluzione e sensibilità di tutte le strutture articolari e periarticolari. La tecnica rileva precocemente la presenza di sinovite ed è in grado di fornire indicazioni

sull'attività del panno sinoviale grazie all'utilizzo del mezzo di contrasto paramagnetico e dello studio del "contrast enhancement" (13). La RM non espone alle radiazioni ionizzanti e consente di individuare precocemente la presenza di erosioni, con una sensibilità comparabile a quella dell'ecografia articolare e superiore a quella della radiologia convenzionale. I limiti principali sono rappresentati dai costi, dalla scarsa standardizzazione e dalla limitata accettabilità dell'esame in sistemi chiusi ad alto campo da parte del paziente. Recentemente sono stati introdotti apparecchi a basso campo dedicati allo studio delle estremità che rappresentano una interessante alternativa per la valutazione delle articolazioni periferiche nell'artrite reumatoide.

Un altro esame che può essere effettuato è la scintigrafia ossea, che permette di visualizzare le lesioni osteoarticolari attive e quelle in fase iniziale. Si può utilizzare la scintigrafia tradizionale (o statica) di tipo segmentario, o quella dinamica (sequenziale) che va a studiare la vascolarizzazione di un determinato distretto. Essa presenta elevata sensibilità diagnostica essendo in grado di riconoscere alterazioni del metabolismo osseo distrettuale in fase pre-radiologica (14). Infatti, perché una lesione ossea possa essere evidenziata con un esame radiologico tradizionale, è necessaria una riduzione del contenuto di calcio superiore al 35-40%, mentre perché sia evidenziabile con un esame scintigrafico, è sufficiente una modesta variazione (ca. 2%). La metodica è, però, poco specifica dal momento che qualunque patologia in grado di indurre un aumento dell'attività osteoblastica provoca un'iperconcentrazione del radiofarmaco. Essa riveste, comunque, importanza potendo riconoscere la malattia in fase attiva prima della comparsa dei sintomi.

### ***Analisi del liquido sinoviale***

L'esame del liquido sinoviale non è normalmente richiesto per far diagnosi di artrite reumatoide, ma può essere utile nel caso di forme mono- o oligo-articolari, anche se nessuno dei parametri rilevabili è specifico per l'artrite reumatoide. Esso appare torbido, poco viscoso, con coagulo mucinico friabile, aumento nella concentrazione delle proteine e del glucosio e dei globuli bianchi che raggiungono una cellularità di 5-50000cell/mm<sup>3</sup>, in prevalenza polimorfonucleati. Al microscopio a contrasto di fase è possibile evidenziare la presenza di fagociti, neutrofili, macrofagi, frammenti di sinovia, fibrina e corpi risiformi.



La diagnosi di certezza dell'artrite reumatoide viene effettuata classicamente sulla base dei criteri dell'*American College of Rheumatology* (ACR) del 1987 (15).

Tali criteri, tuttavia, sono inadeguati ai fini di una diagnosi precoce, dal momento che sono stati creati con finalità classificative allo scopo di identificare, per motivi di studio e sperimentali, soggetti con diagnosi certa. Infatti sono stati elaborati su una casistica di pazienti con artrite reumatoide stabilizzata, con un'età media di malattia abbastanza elevata (7,7 anni): in riferimento a tale casistica essi presentano sensibilità del 83,5-90% e specificità del 86-90%, mentre quando il set di criteri viene utilizzato per differenziare le forme iniziali, sensibilità e specificità risultano alquanto ridotte (57% e 47%, rispettivamente).

### **EARLY RHEUMATOID ARTHRITIS**

I predetti criteri classificativi dell'ACR, ricavati sulla scorta dei dati clinici, laboratoristici e radiologici di pazienti con malattia evoluta, hanno un modesto valore diagnostico nelle prime fasi di malattia e, conseguentemente, non possono essere impiegati per porre diagnosi di artrite reumatoide precoce o all'esordio, meglio nota con la terminologia in lingua inglese di *Early Rheumatoid Arthritis* (ERA). È dimostrato che un intervento terapeutico nelle fasi iniziali della malattia rappresenta un'opportunità da non lasciarsi sfuggire per modificare sensibilmente e concretamente l'evoluzione e il decorso dell'artrite reumatoide: ciò è riassunto nel concetto di *window of opportunity* per individuare la fase precoce di malattia (16). Ad esempio lo studio COBRA ha dimostrato che una potente terapia di induzione è in grado di limitare notevolmente la velocità di progressione radiologica dell'artrite, con un effetto che persiste a diversi anni di distanza, indipendentemente dal tipo di terapia successiva (17). Negli ultimi anni si sta, quindi, concentrando l'attenzione sulle fasi di esordio della flogosi cronica articolare, tanto che sono state istituite strutture dedicate allo studio dei pazienti in cui è stato individuato precocemente l'esordio della patologia: le cosiddette *early arthritis clinics* (E.A.C.).

La diagnosi precoce dell'artrite reumatoide è fondamentale per prevenire l'instaurarsi di lesioni anatomiche irreversibili a carico delle articolazioni mettendo in atto precocemente una strategia terapeutica capace di modificare l'evoluzione naturale della malattia (18). In quest'ottica è fondamentale la collaborazione tra

medico di medicina generale e specialista reumatologo: i pazienti con artrite all'esordio vanno prontamente individuati dal medico di medicina generale e inviati al reumatologo che ha il compito dell'inquadramento diagnostico, della valutazione della potenziale aggressività della malattia e della messa a punto di una strategia terapeutica adeguatamente personalizzata. Il clinico deve quindi disporre di elementi valutabili all'esordio della malattia con una stringente capacità predittiva di evoluzione verso una forma di artrite cronica potenzialmente invalidante.

In questo contesto è emersa la necessità di definire la early arthritis in termini cronologici e diagnostici.

Quanto ai primi, esistono varie proposte e varie definizioni, nessuna delle quali unanimemente accettata. Comunque la classificazione convenzionale dell'artrite reumatoide, sulla base dell'anzianità di malattia, che tenga conto delle forme a insorgenza molto recente e di quelle di più lunga durata (*long-standing*) è la seguente:

Very early RA*	Durata malattia < 3 mesi
Early RA (ERA)	Durata malattia < 1 anno
Late RA	Durata malattia > 1 e < 5 anni
Very late RA	Durata malattia > 5 anni

\*RA: Rheumatoid Arthritis

Quanto ai termini diagnostici, è emersa la necessità di individuare indicatori delle (e nelle) fasi precoci di malattia premonitori di evoluzione sfavorevole dell'artropatia, mediante i quali identificare i soggetti a rischio con segni e sintomi di allarme (*red flags*). Gli elementi essenziali considerati indici di sospetto di artrite reumatoide sono:

1. coinvolgimento flogistico di 3 o più articolazioni
2. interessamento delle articolazioni metatarsofalangee e metacarpofalangee con "segno della gronda" positivo
3. rigidità mattutina uguale o maggiore di 30 minuti.

La "manovra della gronda", facilmente eseguibile, consiste nell'esercitare una pressione latero-laterale delle metacarpofalangee o delle metatarsofalangee: la comparsa di dolore è indicativa di una flogosi articolare. Si tratta quindi di

una manovra semplice e utile per valutare il coinvolgimento delle piccole articolazioni dette, il cui interesse clinico è stato validato con la dimostrazione che esso rappresenta un fattore predittivo di progressione delle erosioni nell'early arthritis (19).

La radiologia convenzionale, che rimane il *gold standard* per la valutazione del danno articolare e della sua evoluzione, può risultare negativa nei primi 6-12 mesi dall'esordio clinico, anche se il 75% dei pazienti sviluppa un'erosione (identificabile come interruzione focale della corticale ossea) entro i primi 2 anni dall'esordio (20). Altre metodiche quali l'ecografia sono in grado di identificare precocemente erosioni non ancora visibili alla radiografia standard. Anche la scintigrafia articolare con uso di difosfonati marcati è molto utile nelle fasi iniziali di malattia in quanto permette lo studio di aree di attivo rimaneggiamento osseo, anche se ancora clinicamente silenti. Infine la RM riconosce precocemente la sinovite ed è in grado di dare indicazioni sull'attività del panno sinoviale: essa appare attualmente come la metodica con miglior accuratezza iconografica e elevata precocità diagnostica.

Negli ultimi anni si è cercato anche di identificare i fattori connessi con l'evoluzione dell'early arthritis e con la gravità di malattia. Alcuni parametri predittivi di persistenza sono: artrite simmetrica alle metacarpofalangee persistente per 12 settimane, positività per il fattore reumatoide, coinvolgimento delle articolazioni del polso, MCF, IFP e grosse articolazioni, aumento della VES, positività per gli anticorpi anti-citrullina, e sesso femminile (21).

Visser et al. (18), in un'analisi condotta valutando 22 possibili determinanti diagnostici, hanno riportato che i fattori che predicano la persistenza e la comparsa di erosioni articolari nell'early rheumatoid arthritis sono: durata di malattia  $\geq 6$  mesi, rigidità mattutina  $> 30$  minuti, artrite che coinvolge un numero  $\geq 3$  articolazioni, test di compressione (test della gronda) delle articolazioni MTF bilateralmente positivo, positività per il FR IgM, presenza degli anti-CCP e di erosioni alle radiografie delle mani e dei piedi (vedi tabella 1).

Durata dei sintomi alla prima visita (cut-off 6 mesi)
Rigidità mattutina di almeno 1 ora
Artrite in 3 o più articolazioni
“Gronda” positiva alla MTF
Fattore reumatoide (IgM) positivo
Anticorpi anti-citrullina positivi
Erosioni alle mani o ai piedi

**Tabella 1.** *Fattori predittivi di artrite persistente erosiva*

## DECORSO E PROGNOSI

Il decorso dell’artrite reumatoide è molto eterogeneo in relazione al polimorfismo della sua espressività clinica e si compone di fasi di acuzie alternate a fasi di bassa attività di malattia o di remissione, tutte di durata estremamente variabile. Il ventaglio di possibilità è quindi estremamente variegato sia per quanto riguarda l’aggressività della malattia, la progressione e la durata delle diverse fasi di cui si compone.

Inoltre, la comunità scientifica non ha ancora raggiunto un chiaro accordo per quanto riguarda la definizione di remissione e di bassa attività di malattia, due concetti molto importanti per stabilire le strategie terapeutiche e la loro efficacia, soprattutto oggi con l’avvento di sempre nuovi farmaci e la possibilità di una diagnosi precoce. Differenti criteri sono stati proposti per valutare l’attività di malattia e la remissione: i più accreditati sono quelli sviluppati dall’ACR, dall’EULAR e della FDA.

In generale, comunque, la prognosi *quod valetudinem* è considerata severa, infatti numerosi studi hanno dimostrato una perdita di capacità lavorativa del 50-60% a 10 anni dall’esordio della malattia (22). Inoltre, i cambiamenti nello stile di vita e le modificazioni in termini di comportamento e abitudini che avvengono nei pazienti affetti da malattie croniche, come l’artrite reumatoide, costituiscono ciò che può essere definito “*illness intrusiveness of a (chronic) disease*”.

La figura 10 mostra la progressione della disabilità funzionale, valutata mediante Health Assessment Questionnaire (strumento che esprime con un punteggio da 0 a 3 il grado di disabilità del paziente allo svolgimento di comuni attività quotidiane, raccolte in 8 items esploranti la funzionalità dell’intero apparato osteo-articolare), in studi prospettici longitudinali (23).

Per quanto riguarda i fattori prognostici negativi, alcuni tra i più importanti identificati sono: sinovite persistente, malattia erosiva precoce, manifestazioni extra-articolari, positività per il fattore reumatoide, presenza dell'allele HLA-DRB1\*4, familiarità per l'artrite reumatoide, sesso femminile e età avanzata (24).

<b>FATTORI LEGATI ALL'ARTRITE</b>	<b>FATTORI INDIPENDENTI DALL'ARTRITE</b>	<b>FATTORI GENETICI</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- elevati indici di flogosi all'esordio</li> <li>- FR positivo, anti-CCP positivi</li> <li>- alto numero di articolazioni interessate</li> <li>- elevato grado di disabilità iniziale</li> <li>- danno erosivo precoce</li> <li>- manifestazioni extra-articolari</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- sesso femminile</li> <li>- età avanzata</li> <li>- disabilità e patologie concomitanti</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- presenza di alleli del gruppo HLA DR4</li> </ul>

**Tabella 2.** *Fattori prognostici negativi.*

Per quanto riguarda la prognosi *quod vitam*, si ritiene che l'aspettativa di vita di un paziente con artrite reumatoide sia inferiore di 5-10 anni rispetto alla popolazione generale. La mortalità risulta correlata all'interessamento extra-articolare e alla severità della patologia. Tra le cause di morte in pazienti con artrite reumatoide ricordiamo le malattie cardiovascolari, le neoplasie, le infezioni, le malattie gastrointestinali, la vasculite reumatoide, l'amiloidosi e la pneumopatia reumatoide.

## **TERAPIA**

Dal momento che non esiste una terapia eziologica, gli scopi del trattamento dell'artrite reumatoide sono i seguenti: abolire o attenuare l'infiammazione e il dolore, rallentare la progressione della malattia, preservare o recuperare la funzionalità articolare, prevenire o limitare lo sviluppo di deformità e correggere quelle già esistenti.

Oltre alla terapia farmacologica, riabilitativa e chirurgica, bisogna offrire al paziente un supporto psicologico, molto utile perché egli possa accettare la condizione di malattia disabilitante e per ottenere una buona compliance terapeutica. Il medico, inoltre, deve offrire alcune misure educazionali informando il paziente sulla patologia e suggerendo il riposo nelle fasi di attività della malattia e un adeguato movimento nei periodi in cui l'infiammazione è spenta per prevenire l'anchilosi e l'ipotrofia muscolare.

### ***Terapia farmacologica***

La terapia farmacologica dell'artrite reumatoide può essere divisa fra farmaci sintomatici e farmaci di fondo, detti DMARDs, cioè *Disease Modifying Antirheumatic Drugs*.

Come detto, un intervento terapeutico nelle fasi iniziali della malattia, nella cosiddetta *window of opportunity*, rappresenta un'occasione da non lasciarsi sfuggire per modificare sensibilmente e concretamente l'evoluzione e il decorso dell'artrite reumatoide, tanto che l'EULAR ha pubblicato alcune raccomandazioni per la gestione dell'ERA (25) tra cui spicca la necessità di intraprendere al più presto un trattamento energico con DMARDs.

### **FANS**

I FANS non alterano in alcun modo il decorso della patologia, né prevengono la comparsa di erosioni articolari; per questo non possono costituire il solo trattamento farmacologico (26). Essi risultano però utili nel ridurre il dolore, l'infiammazione e la rigidità mattutina.

L'indometacina, il diclofenac, l'ibuprofene, il ketoprofene, il naprossene e gli inibitori selettivi della COX-2 sono, tra i FANS, i più efficaci e maggiormente

utilizzati. I nuovi FANS COX-2 selettivi offrono il vantaggio di una minor gastrolesività.

Una strategia terapeutica utile nell'uso dei FANS è quella di somministrare un preparato a lunga durata d'azione o a dosaggi più elevati alla sera, per evitare la rigidità mattutina e il dolore.

### CORTICOSTEROIDI

I corticosteroidi sono utili nel controllo a breve termine dell'attività di malattia, grazie alla loro azione antiflogistica inibente la produzione e l'azione di citochine pro-infiammatorie. Vanno però usati sempre alla luce dei loro effetti collaterali, tra cui ricordiamo l'osteoporosi, la soppressione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene e l'alterazione dell'equilibrio glucidico.

### ANALGESICI

Farmaci quali paracetamolo, tramadolo e altri oppiacei possono essere usati nel controllo del dolore.

### DMARDs

Una volta posta diagnosi di artrite reumatoide è indicato iniziare tempestivamente una terapia con farmaci di fondo, data la loro capacità di modificare il decorso della malattia e di migliorare i sintomi. Molti DMARDs si sono dimostrati anche in grado di ritardare la progressione radiologica della malattia.

Essi sono rappresentati da: methotrexate, azatioprina, ciclosporina, leflunomide, antimalarici di sintesi, sulfasalazina e sali d'oro. La loro attività comincia a manifestarsi dopo un periodo variabile di latenza (4-16 settimane).

I farmaci di fondo tradizionali in associazione mostrano una maggiore efficacia nel controllo dell'evoluzione della malattia senza un incremento cumulativo della loro tossicità, è stato, quindi, proposto un trattamento con due o più DMARD in associazione fin dall'inizio per tentare di arrestare la rapida progressione della malattia. Il trattamento viene successivamente ridotto con l'obiettivo di mantenere la malattia in remissione (approccio scalare in diminuzione).

### FARMACI BIOLOGICI

Un notevole contributo alla terapia dell'artrite reumatoide è stato dato dalla disponibilità di molecole biotecnologiche in grado di bloccare l'azione di alcune citochine pro-infiammatorie che svolgono un ruolo patogenetico centrale nell'automantenimento dell'infiammazione reumatoide.

Tra questi farmaci ricordiamo: etanercept (proteina di fusione costituita dal recettore p75 del TNF $\alpha$  coniugato a un frammento di Fc di immunoglobulina umana di classe IgG1), adalimumab (anticorpo monoclonale anti-TNF $\alpha$  ricombinante umano al 100%), infliximab (anticorpo chimerico umano/murino anti-TNF $\alpha$ ), anakinra (forma ricombinante dell'antagonista del recettore per l'interleuchina-1) (27).

Essi sono gravati da diversi effetti collaterali, tra cui: infezioni (soprattutto da patogeni opportunisti e da TB), patologie neoplastiche, cardiopatia congestizia, patologie a carattere demielinizzante, reazioni locali da infusione, formazioni di autoanticorpi e di anticorpi diretti verso il farmaco biologico.

### ***Terapia fisica e riabilitativa***

Le terapie fisiche, quali la crioterapia e la stimolazione nervosa elettrica transcutanea (TENS), hanno lo scopo di ridurre il dolore e le sue conseguenze sulla funzionalità e capacità fisiche.

La terapia riabilitativa ha invece il ruolo di prevenire le deformità articolari, di mantenere la funzionalità articolare e il trofismo muscolare. Si avvale di tecniche di correzione posturale, di esercizi articolari attivi e passivi.

È, inoltre, molto importante applicare i principi dell'economia articolare, quindi insegnare al paziente la gestualità corretta per "risparmiare" le articolazioni, nonché consigliare l'uso di splint o ortesi quando necessario.

### ***Terapia chirurgica***

La terapia chirurgica può essere eseguita allo scopo di prevenire le lesioni e le deformità, in questo caso si eseguono interventi di sinoviectomia o di osteotomia.

Nelle fasi avanzate di malattia può essere indicato l'intervento di artroprotesi nel caso in cui la struttura articolare sia completamente sovvertita, la sua funzione pressoché abolita e il dolore insopportabile.



## Capitolo II

### **GLI ANTAGONISTI DEL TNF $\alpha$**

#### **IL TNF $\alpha$**

Il tumor necrosis factor (TNF), chiamato anche TNF $\alpha$  per distinguerlo da un'altra citochina ad esso strettamente correlata, il TNF $\alpha$  o linfotossina, è un polipeptide che appartiene alla super famiglia dei TNF, composta da circa trenta molecole correlate, codificate nella regione MHC di classe III. Il TNF $\alpha$  è prodotto principalmente dai fagociti mononucleati attivati, ma anche da linfociti T attivati, cellule NK e mastociti. Nei fagociti mononucleati, il TNF $\alpha$  viene sintetizzato come proteina non glicosilata ed espresso come trimero sulla membrana cellulare, qui viene clivato da una metalloproteasi presente sulla superficie dei macrofagi e trasformato nella sua forma solubile di 51Kd (TNFs) (28). Esistono due diversi tipi di recettori per il TNF $\alpha$ , uno di 55kd detto recettore p55 e uno di 75kd detto recettore p75, espressi praticamente su tutte le cellule. Il p75 ha fondamentalmente la funzione di "ligand passing", cioè di presentare la molecola del TNF $\alpha$  al p55. Entrambi i TNFR esistono anche nelle forme solubili (sTNFR) prodotte dal clivaggio enzimatico. I TNFR mediano numerose funzioni biologiche e la loro espressione e liberazione in circolo sono modulate da numerosi ormoni e citochine. I TNFRs possono agire in diversi modi: come antagonisti del TNF $\alpha$ , quando sono presenti in quantità eccessiva, come proteina carrier del TNF $\alpha$  e come riserva per il rilascio del TNF $\alpha$ , prolungandone l'emivita.

Il TNF $\alpha$  è una citochina che media l'immunità innata svolgendo diverse attività: stimola i macrofagi a produrre citochine pro-infiammatorie (quali IL-1 e IL-2) e chemochine (es: IL-8); aumenta l'espressione di molecole di adesione a livello endoteliale; stimola gli epatociti a produrre IL-6 che a sua volta attiva la risposta di fase acuta con incremento dei valori di PCR nel siero. Per quanto riguarda il ruolo proflogistico nell'artrite reumatoide, i sinoviociti e i condrociti rispondono all'azione del TNF $\alpha$  con l'aumento della sintesi di metalloproteasi, diminuzione della sintesi di collagene e aumento della funzionalità degli osteoclasti, portando ad un rimodellamento della cartilagine articolare e a una degradazione dell'osso iuxta-articolare.

## **ANTAGONISTI DEL TNF $\alpha$ : ETANERCEPT, ADALIMUMAB, INFLIXIMAB**

La ragione dell'utilizzazione di farmaci inibitori del TNF $\alpha$  nell'artrite reumatoide risiede nella loro capacità di innescare diversi fenomeni biologici, che vanno dalla soppressione dei livelli circolanti di interleuchina-6, con conseguente riduzione dei valori di proteina C reattiva, alla riduzione della cellularità e dell'infiammazione a livello della membrana sinoviale reumatoide. Il blocco del TNF $\alpha$ , inoltre, comporta una riduzione dell'afflusso di linfociti sinoviali, una soppressione della neoangiogenesi a livello della membrana sinoviale e una riduzione dose-dipendente dei livelli circolanti di metallo-proteinasi.

Gli inibitori del TNF $\alpha$  oggetto di studio sono costituiti da due classi di molecole: i recettori solubili (etanercept) e gli anticorpi monoclonali (adalimumab e infliximab). Essi agiscono sequestrando, mediante la formazione di complessi, il TNF $\alpha$  in forma attiva e bloccandone di conseguenza l'interazione con i TNFRs della superficie cellulare.

Queste molecole presentano un diverso impatto clinico nelle varie situazioni patologiche, cosicché è giustificato un eventuale switch terapeutico da una molecola all'altra in caso di fallimento terapeutico iniziale (29).

### ***Etanercept: struttura molecolare e meccanismo d'azione***

L'etanercept è una proteina di fusione ricombinante costituita dalle sequenze aminoacidiche umane di 2 domini extracellulari del TNFR p75, legate alla porzione Fc dell'immunoglobulina umana di tipo 1 (IgG1) (TNFR:Fc). Esso inibisce l'attività del TNF $\alpha$  legandosi con elevata affinità sia alla forma solubile che a quella transmembrana del TNF $\alpha$  (tmTNF); con esse forma dei complessi relativamente instabili conducendo al rilascio di una forma di TNF dissociata biologicamente attiva. L'etanercept è caratterizzato da un'elevata costante di associazione e dissociazione, con conseguente neutralizzazione solo transitoria del TNF $\alpha$ . In vitro si lega al TNF transmembrana con un'efficacia inferiore di circa quattro volte a quella con cui si lega l'infliximab ed è significativamente meno potente nel bloccare gli effetti indotti dal TNF transmembrana. A causa della velocità di dissociazione relativamente rapida in confronto all'infliximab, l'etanercept libera circa il 50% del TNF $\alpha$  solubile e il 90% del TNF

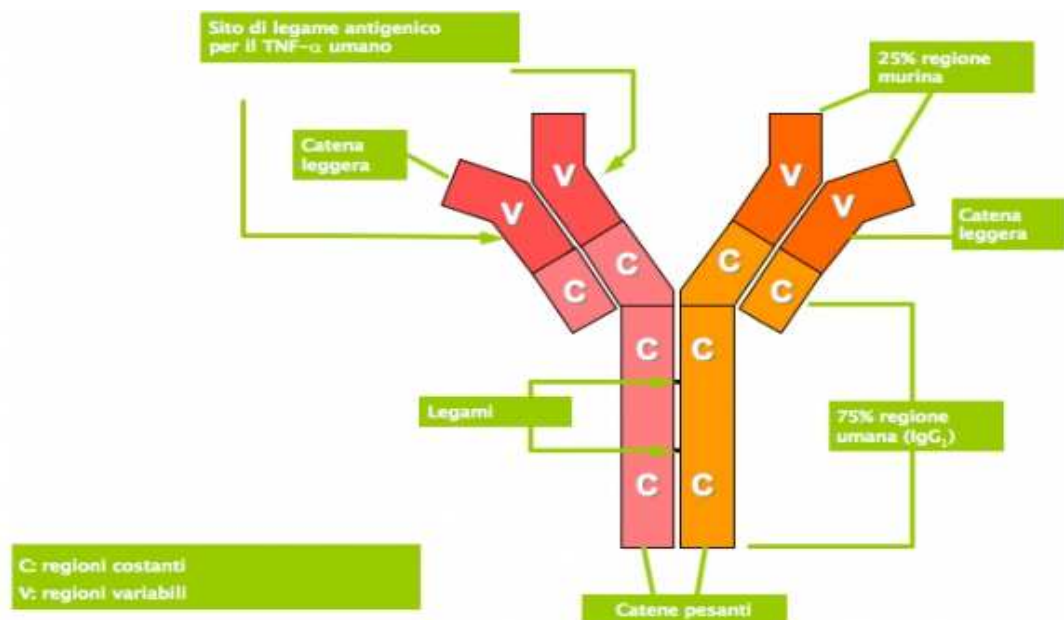
transmembrana dopo soli 10 minuti dal legame (30). L'etanercept, come gli altri inibitori del TNF $\alpha$ , può modulare l'espressione di molecole di adesione, i livelli sierici di altre citochine proflogistiche e le concentrazioni sieriche di metalloproteasi della matrice.

### ***Adalimumab: struttura molecolare e meccanismo d'azione***

L'adalimumab è un anticorpo monoclonale ricombinante umano. Esso blocca l'interazione del TNF $\alpha$  con i recettori di superficie p55 e p75. Il rapporto di binding è di 1:1. È stato dimostrato che il complesso che si forma più comunemente è quello costituito da 3 molecole di adalimumab e 3 di TNF $\alpha$ . L'adalimumab lisa in vitro le cellule che esprimono in superficie il TNF $\alpha$  in presenza del complemento (31).

### ***Infliximab: struttura molecolare e meccanismo d'azione***

L'infliximab è un anticorpo monoclonale chimerico umano-murino, in grado di neutralizzare l'attività biologica del TNF $\alpha$  legandosi con elevata affinità alle forme sTNF $\alpha$  sia monomeriche che trimeriche e con il tmTNF $\alpha$  e inibendo il legame del TNF $\alpha$  con i suoi recettori.



**Figura 2.** *Struttura di infliximab.*

Ogni molecola di infliximab è in grado di legarsi a 1 o 2 molecole del tmTNF trimerico/monomero e di collegare a ponte due molecole di tmTNF. Si ritiene che fino a tre molecole di infliximab possano legare un trimero tmTNF, in modo 4 volte maggiore rispetto all'etanercept, lasciando liberi pochissimi siti recettoriali. Legando sia la struttura trimerica che quella monomero (a differenza dell'etanercept che, a causa della sua struttura, non è in grado di legare le strutture monomero di TNF $\alpha$ ) potrebbe rallentare la formazione dei complessi trimolecolari biologicamente attivi. Inoltre, a differenza dell'etanercept, l'infliximab può anche fissare il complemento portando a lisi le cellule che esprimono il tmTNF.

### **ASPETTI IMPORTANTI NEL RAPPORTO EFFICACIA/TOSSICITÀ**

Uno degli argomenti più importanti nel capitolo dei farmaci inibitori del TNF $\alpha$  è il profilo di efficacia e di sicurezza, quindi l'analisi dei loro effetti avversi.

Per comprendere le diversità esistenti in questo campo tra gli anticorpi monoclonali (infliximab e adalimumab) rispetto al recettore solubile (etanercept) bisogna valutare alcune caratteristiche farmacocinetiche, in particolare la curva concentrazione-tempo delle diverse molecole neutralizzanti il TNF $\alpha$ , la concentrazione minima, media e massima allo steady-state ed il volume di distribuzione.

Alla dose di infliximab di 3mg/kg la concentrazione minima allo steady state può risultare subterapeutica, rispetto alle concentrazioni di 1,5 mg/l di etanercept (al dosaggio di 25mg x 2/settimana) e 3,8 mg/l di adalimumab (40mg/2settimane). Il dosaggio inefficace può causare la riaccensione dei sintomi e la necessità di incremento del dosaggio o la riduzione della durata degli intervalli di somministrazione del farmaco.

La concentrazione massima di infliximab, al dosaggio detto, risulta superiore di circa 40 volte alla concentrazione massima di etanercept e 13 volte a quella di adalimumab. Tale sovraesposizione acuta all'anticorpo monoclonale infliximab può comportare il legame della maggior parte del TNF dell'organismo alla molecola inibitrice, con modificazioni sensibili nelle reazioni biologiche di difesa dipendenti da tale citochina.

Altre caratteristiche di infliximab di cui tener conto sono la maggior stabilità dei complessi con il TNF, la neutralizzazione più completa e prolungata del TNF, la concentrazione più elevata a livello cellulare e le proprietà citolitiche, nonché l'ampia variazione individuale dei livelli sierici e della percentuale di clearance che possono riflettersi in una risposta clinica meno prevedibile.

Per quanto riguarda etanercept, esso possiede la capacità peculiare di inibire la LTF; etanercept lega rapidamente il TNF $\alpha$  e la LTF nei compartimenti in cui questi mediatori sono presenti in abbondanza e li rilascia altrettanto rapidamente se sono invece presenti in bassa concentrazione, esplicando in tale modo un'azione transitoria più fisiologica nella neutralizzazione del TNF.

Partendo dal presupposto che le malattie infiammatorie croniche rappresentano uno stato patologico di equilibrio dinamico, caratterizzato da elevata produzione di TNF, gli antagonisti biologici in grado di riportare e mantenere la concentrazione di tale citochina ai livelli più prossimi a quelli dell'omeostasi fisiologica, sembrano garantire il massimo vantaggio in termini di rapporto efficacia/tossicità, dato il ruolo protettivo cruciale del TNF nella specie umana.

## **INDICAZIONI E MODALITÀ DI IMPIEGO**

I tradizionali DMARDs costituiscono tuttora il pilastro della terapia dell'artrite reumatoide, in particolare methotrexate e leflunomide; nonostante ciò il loro impiego può essere limitato dalla tossicità o da una inadeguata risposta. Per questo, la SIR (Società Italiana di Reumatologia) prevede che vengano indirizzati alle terapie con farmaci biologici pazienti con malattia in fase attiva (DAS44 >3,7 o DAS28 >5,1), non responsiva alla terapia con almeno 2 DMARDs convenzionali, incluso il methotrexate a dosaggio pieno, per almeno 6 mesi di trattamento.

<b>Anti-TNF</b>	<b>Via di somministrazione e dose</b>	<b>Emivita</b>	<b>Inizio d'azione</b>
ADALIMUMAB	40 mg a settimane alterne in iniezione sottocutanea (può essere portato a 40 mg a settimana)	10-18 giorni	1-14 giorni
ETANERCEPT	50 mg a settimana in una o due iniezioni sottocutanee	4-8 giorni	1-28 giorni
INFLIXIMAB	3 mg/kg in infusione endovenosa a 0, 2, 6 settimane, seguiti da una dose di mantenimento ogni 8 settimane	9-8 giorni	7-14 giorni

**Tabella 3.** *Schemi terapeutici e le vie di somministrazione degli inibitori del  $TNF\alpha$*

## **EVENTI AVVERSI**

I più comuni effetti collaterali insorti in pazienti in terapia con antagonisti del  $TNF\alpha$  sono i seguenti:

- Malattie infettive, incluse TBC e sepsi
- Sindromi demielinizzanti/neuropatie
- Comparsa di autoanticorpi e malattie autoimmuni
- Linfomi e altre anomalie ematologiche (anemia, pancitopenia)
- Aggravamento dello scompenso cardiaco congestizio
- Reazioni da infusione e reazioni nel sito di iniezione.

### Infezioni

Il rischio di infezioni è di per sé aumentato nei pazienti con artrite reumatoide, anzi, essi hanno una mortalità più alta rispetto alla popolazione generale: almeno parte di questo incremento è dovuto a patologie infettive, in particolare urinarie e broncopulmonari. La maggior frequenza di infezioni nei pazienti con artrite reumatoide può essere imputata alla malattia stessa, sia a causa di un'alterata

funzione immunologica che per altri fattori, come la ridotta mobilitazione o la presenza di lesioni cutanee.

Gli indici di severità della malattia (positività per il fattore reumatoide, presenza di noduli reumatoidi, manifestazioni extra-articolari, aumento di VES e PCR, ridotta capacità funzionale), la comorbilità, l'età avanzata e la terapia con corticosteroidi rappresentano fattori predittivi di rischio infettivo (32).

Per quanto riguarda i pazienti trattati con antagonisti del TNF $\alpha$ , particolare importanza riveste la maggior suscettibilità alla tubercolosi primaria, così come la possibilità di riattivazione di una tubercolosi pregressa.

Negli studi osservazionali e nella pratica clinica sono stati segnalati casi di TBC in pazienti trattati con ognuno dei 3 agenti (33), anche se l'incidenza del fenomeno è sensibilmente diversa per i diversi composti, risultando molto maggiore per l'infliximab (34). Probabilmente la minor frequenza di casi di TBC in pazienti trattati con etanercept rispetto agli altri due farmaci biologici risiede nel fatto che i 2 anticorpi monoclonali sono capaci di attivare il complemento quando reagiscono con il TNF $\alpha$  espresso sulla superficie cellulare, e, quindi, possono lisare le cellule che esprimono la citochina in superficie, comprese quelle implicate nella formazione dei granulomi (monociti/macrofagi).

La comparsa della complicanza si concentra nelle prime 12 settimane nei pazienti trattati con infliximab, nelle prime 30 settimane in quelli con adalimumab, entro i primi 11 mesi in quelli con etanercept (35); ciò potrebbe essere dovuto alla diversa durata e modalità dell'effetto del blocco citochinico da parte dei diversi agenti.

Appare, quindi, di primaria importanza la ricerca di TBC latente in tutti i pazienti che intendono iniziare una terapia con farmaci inibitori del TNF $\alpha$ .

Altre infezioni severe possono svilupparsi in corso di terapia con biologici, in particolare quelle da germi opportunisti il cui contenimento è fortemente condizionato dalla formazione di un granuloma (*Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*), nonché si possono sviluppare malattie infettive minori. Inoltre, vi è il rischio che un'infezione, una volta instaurata, diventi rapidamente sistemica con possibile esito infausto (36). Bisogna, quindi, porre molta attenzione nel monitoraggio del paziente per cogliere i primi segni di allarme, compresi i processi infettivi minori quali le infezioni delle vie respiratorie superiori.

Per quanto riguarda le infezioni virali, herpes zoster e herpes simplex sono quelle segnalate più frequentemente.

### Sindromi demielinizzanti / neuropatie

Lo sviluppo e la riaccensione di *malattie demielinizzanti*, è stato registrato sia in corso di terapia con infliximab che con etanercept, ma anche con adalimumab sono stati segnalati alcuni casi di probabile sindrome demielinizzante (37). Tuttavia non è ancora noto il meccanismo di induzione di tali condizioni. Infine, in corso di terapia con anti-TNF $\alpha$  sono state descritte altre malattie neurologiche (ad esempio: mielite trasversa, meningite asettica, neuropatia ottica e malattia di Parkinson), ma la dimensione del problema non pare definita.

### Comparsa di autoanticorpi e malattie autoimmuni

È stato dimostrato l'aumento del titolo e/o la comparsa di autoanticorpi (ad esempio: antinucleo, anti-DNA) nei pazienti in trattamento con farmaci biologici, specialmente nei pazienti trattati con infliximab e sembra che tale incremento correli con la comparsa degli effetti collaterali (38). In particolare l'incremento di una risposta antifosfolipidi potrebbe svolgere un ruolo predisponente al realizzarsi di eventi cardiovascolari per l'azione protrombotica.

È stato, inoltre, registrato lo sviluppo di *malattie autoimmuni* maggiori quali lupus sistemico, lupus discoide e polimiosite (39), di eritema multiforme e di altre dermatiti (40), di quadri simil-malattia da siero e, soprattutto, di vasculiti sia cutanee che sistemiche.

### Linfomi e altre anomalie ematologiche (anemia, pancitopenia)

È stato riportato lo sviluppo di *linfomi* per lo più non-Hodgkin oltre che rari casi di aplasia midollare e di *citopenia* in seguito all'uso di farmaci biologici. Bisogna tenere conto, però, che il rischio di sviluppare neoplasie, in particolare linfomi, è notoriamente aumentato nei pazienti con artrite reumatoide ed appare correlato sia con l'attività della malattia che con l'uso di farmaci immunosoppressivi. Non è quindi agevole stabilire il ruolo degli anti-TNF $\alpha$  nell'incrementare tale rischio.

### Aggravamento dello scompenso cardiaco congestizio

L'utilizzo di infliximab, adalimumab ed etanercept è gravato dal rischio di peggiorare un quadro di scompenso cardiaco e di morte del paziente, anche in casi in cui non sia presente un aumentato rischio cardiovascolare, tanto che lo scompenso cardiaco congestizio di classe NYHA III o IV costituisce una



controindicazione assoluta all'impiego di infliximab ed adalimumab ed una precauzione all'impiego di etanercept (41).

Reazioni da infusione e reazioni nel sito di iniezione

Le reazioni nel sito di iniezione (adalimumab, etanercept) e le reazioni all'infusione (infliximab) costituiscono eventi avversi riportati di frequente.

Le reazioni nel sito d'iniezione sono spesso rappresentate da eritema, orticaria, prurito, rash e dolore, ma di rado raggiungono un'intensità tale da interrompere il trattamento.

Le reazioni infusionali sembrano più gravi rispetto alle suddette. Tra queste vi sono reazioni aspecifiche, quali cefalea, vertigini, nausea, prurito e febbre, anche se possono verificarsi eventi acuti quali anafilassi, ipotensione e convulsioni.

### Capitolo III

#### **L'ADENOSINA E I SUOI RECETTORI**

L'adenosina è un nucleoside endogeno costituito da un anello purinico sostituito in N<sup>6</sup> da un gruppo amminico primario ed in N<sup>9</sup> da un anello D-ribosidico unito per mezzo di un legame  $\beta$ -glicosidico. È presente nel citoplasma principalmente nelle sue forme fosforilate AMP, ADP, ATP e in normali condizioni fisiologiche essa viene continuamente prodotta sia a livello intracellulare che extracellulare. A livello intracellulare attraversa la membrana per diffusione facilitata tramite l'utilizzo di un carrier, che svolge la sua attività secondo gradiente di concentrazione.

La sintesi intracellulare dell'adenosina avviene:

- a) per defosforilazione del 5'-AMP, ottenuto attraverso due defosforilazioni successive dall'ATP, la reazione è catalizzata da una 5'- nucleotidasi;
- b) per condensazione dell'adenosina con ribosio-1-fosfato, tipica reazione catalizzata da una fosforilasi;
- c) a partire da S-adenosilmetionina (SAM), attraverso la formazione di S-adenosilomocisteina (SAH), che diventa adenosina attraverso l'azione di una idrolasi.

A livello extracellulare, invece, viene sintetizzata a partire dall'ATP che è rilasciato insieme ai principali neurotrasmettitori, questo può essere successivamente convertito in ADP, 5'-AMP ed infine in adenosina tramite l'azione di una serie di ectoenzimi. Il passaggio limitante in questo processo, che termina in poche centinaia di millisecondi, sembra essere la defosforilazione dell'AMP ad adenosina da parte della ecto-5'-nucleotidasi (42).

Il catabolismo dell'adenosina avviene a livello citoplasmatico in seguito a ricaptazione, attraverso tre meccanismi:

- a.** deaminazione ad inosina attraverso una eso ed endo adenosina-deaminasi che consente alla reazione di avere luogo sia all'interno che all'esterno della cellula,

l'inosina prodotta subisce una fosforolisi che porta alla formazione di ipoxantina e ribosio-1-fosfato;

**b.** fosforilazione catalizzata da una adenosina chinasi;

**c.** idrolisi con liberazione di L-omocisteina che porta alla formazione di S-adenosilomocisteina.

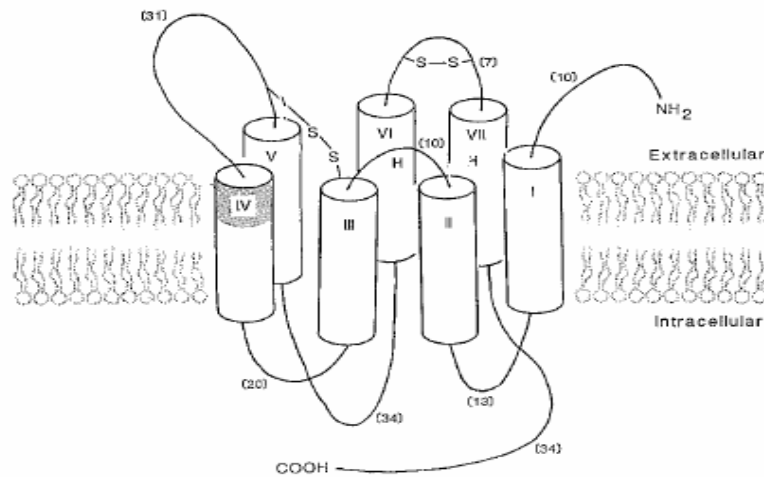
L'adenosina ricaptata viene fosforilata ad AMP ad opera di una adenosina-chinasi intracellulare che ne consente il riciclo, il processo di ricaptazione è importante come dimostrato dall'utilizzo di diversi inibitori del trasporto nucleotidico, quali nitrobenziltioinosina, dipiridamolo e papaverina. L'aumentata concentrazione di adenosina da essi determinata potenzia effetti sull'attività motoria, nocicettivi, ipnotica, convulsionante e neuronale. L'adenosina agisce come un ormone locale nel sistema cardiovascolare, gastrointestinale, riproduttivo e nervoso ed esercita i suoi effetti interagendo con specifici recettori di membrana. Inoltre le proprietà funzionali dell'adenosina rivelano un'intensa somiglianza con la tipica funzione di neurotrasmettitore, esercitando i suoi effetti attraverso un'interazione con recettori specifici e agendo vicino al luogo di sintesi senza entrare nel torrente circolatorio, il suo metabolismo è garantito a livello delle sinapsi per la presenza di enzimi specifici, infine la sua azione può essere bloccata o mediante l'interazione di selettivi antagonisti o con il tipico meccanismo di *re-uptake* e catabolismo a livello citoplasmatico. Nonostante queste caratteristiche tipiche di un neurotrasmettitore essa viene definita "neuromodulatore" in quanto non esistono evidenze che l'adenosina stessa sia immagazzinata o rilasciata da specifici nervi purinergici.

I normali livelli di adenosina determinati con la microdialisi si aggirano intorno a 30-300 nM (43). I livelli di adenosina sono significativamente più alti durante lo stato di veglia che nel sonno ed è ben documentato che aumentano fino a centinaia di volte come risultato di uno stress ossidativo. Infatti, in queste condizioni, a causa dell'incrementata utilizzazione dell'ATP intracellulare, si ha anche un massiccio aumento della produzione di adenosina che attraversa lo spazio extracellulare tramite il trasportatore o per semplice diffusione. In situazioni patologiche, cioè di alterato apporto energetico, il livello di adenosina può

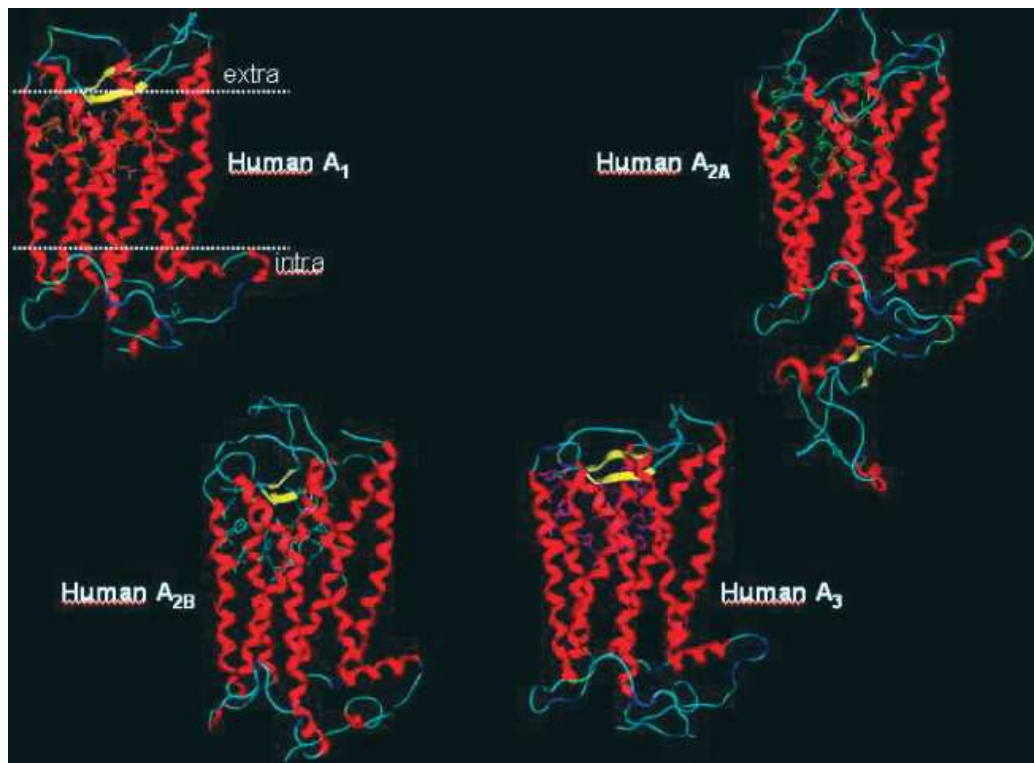
aumentare fino a 100-1000 volte e questo dipende da una aumentata richiesta di ATP intracellulare e quindi da un suo aumentato utilizzo (44).

### **Recettori adenosinici**

L'adenosina extracellulare interagisce con la cellula esercitando i suoi effetti in seguito al legame con recettori di membrana a concentrazioni nanomolari e micromolari, ma a concentrazioni millimolari produce effetti tossici probabilmente interferendo con l'omeostasi del *pool* di nucleotidi intracellulari. A tutt'oggi sono stati identificati e caratterizzati quattro diversi recettori dell'adenosina presenti a livello della membrana e accoppiati a proteine G, appartenenti alla famiglia dei recettori purinergici, che sono divisi in P<sub>1</sub> e in P<sub>2</sub>). I recettori P<sub>1</sub> sono distinti in quattro sottotipi A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub> che risultano più sensibili all'adenosina, i P<sub>2</sub> invece sono più sensibili all'ATP e ai nucleotidi correlati e vengono suddivisi prevalentemente in P2X (recettori canale; P2X<sub>1-7</sub>) e in P2Y (recettori accoppiati a proteine G; P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub>, P2Y<sub>14</sub>). I recettori dell'adenosina sono associati alle proteine G, elementi essenziali nel trasferimento d'informazioni dai recettori alle molecole effettrici, che utilizzano un sistema di attivazione-deattivazione governato dal legame e dall'idrolisi del GTP per amplificare il segnale. Tutti i recettori accoppiati alle proteine G hanno una struttura molto simile, costituita da una singola catena polipeptidica ad  $\alpha$ -elica che attraversa la membrana sette volte con l'estremità N-terminale extracellulare con i siti di glicosilazione e la C-terminale intracellulare che presenta i siti di fosforilazione coinvolti nell'interazione del recettore con la proteina G (figura 4). Le sole differenze apprezzabili sono nella lunghezza del terzo *loop* citoplasmatico e della parte C-terminale (figura 5).



**Figura 3:** *Struttura generale dei recettori adenosinici.*



**Figura 4:** *Conformazione dei quattro sottotipi recettoriali adenosinici*

Le strategie utilizzate per legare il ligando e trasdurre il segnale sono diverse a seconda del tipo di recettore: nel caso dei recettori delle catecolamine, serotonine e acetilcolina, alcune, o tutte e sette le regioni idrofobiche transmembrana partecipano a formare una tasca situata nello spessore della membrana plasmatica e

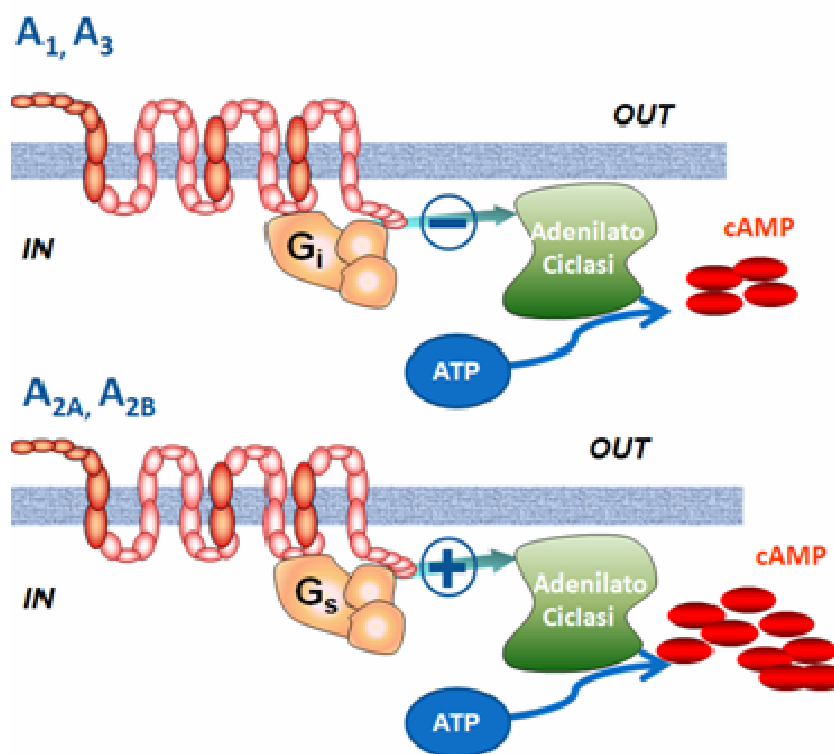
capace di legare l'agonista; nel caso di neuropeptidi l'interazione agonista-recettore sembra invece coinvolgere principalmente alcune porzioni del recettore esposte alla superficie extracellulare; mentre nel caso dei recettori adenosinici l'interazione del ligando con il recettore avviene tramite i siti di glicosilazione nella porzione N-terminale (45).

Le proteine G sono associate alla superficie citoplasmatica della membrana e sono eterotrimeri composti da tre subunità distinte in  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . Le subunità  $\alpha$  delle proteine G possiedono la capacità di legare i nucleotidi guanilici, in particolare il GTP, e successivamente di idrolizzarlo grazie ad un'attività GTPasica intrinseca.

L'uso del ciclo di attivazione/deattivazione delle proteina G, garantisce una notevole amplificazione del segnale che raggiunge l'interno della cellula: una singola molecola recettoriale può attivare più di una proteina G e il tempo di permanenza della subunità  $\alpha$  in forma attiva rappresenta un'ulteriore strumento di amplificazione.

Possiamo suddividere le subunità  $\alpha$  delle proteine G: la prima classe è rappresentata da  $\alpha_s$ , che accoppia alla stimolazione dell'adenilato ciclasi un sottogruppo di recettori come i  $\beta$ -adrenergici, la seconda classe include  $\alpha_{i1}$ ,  $\alpha_{i2}$ ,  $\alpha_{i3}$ ,  $\alpha_0$  che inibiscono l'adenilato ciclasi e un terzo gruppo che media la stimolazione della fosfolipasi C da parte di recettori di tipo muscarinici M. Dal punto di vista funzionale, l'interazione dell'adenosina con i recettori  $A_1$  e  $A_3$  determina il legame con le proteine  $G_i$  che mediano l'inibizione dell'attività dell'adenilato ciclasi e conseguente calo dei livelli intracellulari di cAMP.

Al contrario, i recettori  $A_{2A}$  e  $A_{2B}$  sono accoppiati alle proteine  $G_s$  che attivano l'adenilato ciclasi e stimolano la produzione di cAMP (figura 6).



**Figura 5:** Recettori adenosinici e trasduzione del segnale attraverso la modulazione dell'attività dell'adenilato ciclasi.

### Recettori A<sub>1</sub>

I recettori A<sub>1</sub> sono caratterizzati da una massa molecolare di 36 KDa e costituiti da 326 aminoacidi, sono stati clonati ed espressi in molte specie, tra cui ratto, uomo, bovino e coniglio; sono accoppiati alle proteine G<sub>i</sub> e G<sub>o</sub> e mediano l'inibizione dell'adenilato ciclasi con relativo calo dell'AMP ciclico, l'aumento della conduttanza al potassio e la riduzione della conduttanza al calcio. La distribuzione del recettore A<sub>1</sub> a livello del sistema nervoso centrale sia in posizione pre- che post-sinaptica è stata dimostrata attraverso tecniche autoradiografiche utilizzando sostanze specifiche ad azione agonista ed antagonista. A livello pre-sinaptico si verifica un'inibizione del rilascio di neurotrasmettitori (acetilcolina, glutammato, serotonina, dopamina e noradrenalina) attraverso l'inibizione dell'influsso di Ca<sup>2+</sup>

che risulta essere essenziale per l'esocitosi delle vescicole di neurotrasmettitore. A livello post-sinaptico l'adenosina riduce l'eccitabilità di membrana attraverso due meccanismi: iperpolarizzazione del potenziale di membrana post-sinaptico e aumento della durata della fase di ripolarizzazione e del periodo refrattario.

Questo sottotipo è presente nella corteccia, nel cervelletto, nel talamo, nell'ippocampo, nel genicolato mediale, sulle cellule della glia, nel midollo spinale. Quantità inferiori sono distribuite a livello dello strato granulare e cerebellare, nel nucleo septale laterale nei corpi mammillari, nel nucleo accumbens, nel caudato putamen, nella sostanza nigra ed in quella gelatinosa del cordone spinale e in alcuni nuclei talamici. I recettori  $A_1$  oltre a mediare l'azione dell'adenosina come neurotrasmettitore a livello centrale, sembrano responsabili dell'inibizione della lipolisi e dell'*uptake* di glucosio a livello degli adipociti. I recettori  $A_1$  sono espressi anche a livello periferico, in corrispondenza del rene, fegato, stomaco, milza, polmoni, testicoli, vescica, aorta, tessuto adiposo e polimorfonucleati.

Recentemente è stato dimostrato che tali recettori sono largamente presenti nel tessuto cardiaco e più precisamente nel miocardio e nel nodo atrio-ventricolare, dove provocano una diminuzione della domanda di ossigeno ed in questo modo portano ad una riduzione della frequenza e della forza di contrazione del cuore attraverso l'apertura dei canali del potassio localizzati nel sarcolemma. Inoltre agiscono indirettamente antagonizzando i recettori  $\beta$ -adrenergici mediante l'inibizione della formazione di AMP ciclico via adenilato ciclasi.

A livello del tessuto adiposo invece questo recettore media un'azione di lipolisi, per tale motivo sembra importante la potenziale capacità di agonisti  $A_1$  di ridurre i livelli di lipidi nel sangue. Tutto ciò potrebbe essere vantaggioso per la cura del diabete mellito non insulino-dipendente (diabete di tipo II).

Mediante i recettori  $A_1$  attivati, l'adenosina agisce come un anticonvulsivante endogeno, infatti, un aumento del suo livello si è osservato dopo convulsioni indotte da farmaci o da elettroshock. Dopo trattamento cronico con un antagonista (teofillina), si è visto un aumento dei recettori  $A_1$ . Studi sperimentali hanno



dimostrato che i recettori  $A_1$  sono coinvolti nelle fasi iniziali della convulsione, mentre nelle fasi successive vengono attivati i recettori  $A_2$ .

Si è visto inoltre il coinvolgimento dell'adenosina nell'ictus cerebrale, questa patologia si verifica in seguito all'occlusione di vasi sanguigni, in quanto, i neuroni, non più irrorati dal sangue, rimangono privi di ossigeno e glucosio, e iniziano così a secernere glutammato. Le pompe ioniche, consumando energia, inducono gli ioni ad entrare e uscire dalle cellule, ma quando l'energia non è più disponibile cessano di funzionare e le cellule ischemiche non sono più in grado di rimuovere il glutammato in eccesso. La liberazione massiccia di glutammato fa sì che esso si leghi ai recettori sui neuroni vicini, in risposta al glutammato alcuni recettori aprono nella membrana cellulare canali che permettono il passaggio di ioni sodio e calcio. L'eccesso di sodio provoca l'attivazione di un trasportatore che scambia sodio con il calcio, il quale media la liberazione di glutammato. Il calcio attiva enzimi che degradano DNA, proteine e fosfolipidi, la loro decomposizione porta alla formazione di radicali liberi che danneggiano la membrana cellulare e perciò causano l'ostruzione dei vasi sani e il diffondersi dell'ischemia. L'adenosina è il maggiore inibitore del rilascio di aspartato e glutammato. Non è ancora stato stabilito chiaramente se la diminuzione del rilascio di glutammato è generata dall'azione diretta dell'adenosina sulla terminazione nervosa glutamatergica o indirettamente attraverso altri meccanismi cellulari. L'eccessivo rilascio di questi neurotrasmettitori, dovuto a stress ossidativo cerebrale o a disfunzioni metaboliche portate dall'interruzione del flusso cerebrale, determinano un notevole aumento della liberazione di adenosina, la quale agisce come neuroprotettore endogeno. Si può ipotizzare dunque che gli agonisti del recettore  $A_1$  dell'adenosina possano esercitare effetti neuroprotettivi e il danno cerebrale potrebbe essere limitato bloccando l'eccessiva liberazione del glutammato, infatti, la somministrazione di analoghi  $A_1$  sulle terminazioni dei neuroni potrebbe inibire la liberazione della maggior parte dei neurotrasmettitori, glutammato compreso.

Di recente modulatori allosterici del recettore  $A_1$  sono in studio per il loro potenziale utilizzo nel dolore acuto e cronico di tipo infiammatorio e/o neuropatico (46).

### **Recettori $A_{2A}$**

I recettori  $A_{2A}$  sono costituiti da 410 aminoacidi e mostrano una certa somiglianza strutturale con i recettori  $A_1$ , con i quali condividono diversi aminoacidi a livello dei domini transmembrana. La maggiore massa molecolare di questo recettore (45 kDa) rispetto agli altri sottotipi di recettori adenosinici (da 36 a 37 kDa) può essere sostanzialmente attribuita alla maggiore lunghezza del dominio carbossi-terminale. Esso contiene numerosi siti di fosforilazione e non sembra essere coinvolto nello stretto accoppiamento alle proteine G che è invece una prerogativa della porzione N-terminale del 3° anello intracellulare. Il gene per il recettore  $A_{2A}$  è stato mappato sul cromosoma umano 22.

Studi effettuati su porzioni di cervello hanno evidenziato che i recettori  $A_{2A}$  sono in grado di stimolare l'attività dell'adenilato ciclasi e di determinare la produzione di cAMP attraverso il coinvolgimento della proteina  $G_s$ . A livello strutturale sono stati evidenziati dei ponti disolfuro posti tra la quarta e la quinta elica transmembranaria, il cui ruolo sembra importante per la conformazione recettoriale. I recettori  $A_{2A}$  sono localizzati soprattutto a livello del sistema nervoso centrale, infatti, studi di autoradiografia e ibridazione *in situ*, ne hanno mostrato la presenza in diversi distretti cerebrali. Le zone coinvolte sono quelle ricche di dopamina, come lo striato, il nucleo accumbens ed il tubercolo olfattorio dove è stata dimostrata un'interazione antagonistica tra i recettori  $A_{2A}$  ed i recettori dopaminergici  $D_2$  (47). Nella corteccia cerebrale ischemica di ratto l'adenosina, tramite l'attivazione del recettore  $A_{2A}$ , determina un aumento del rilascio del neurotrasmettitore glutammato.

Ai fini della prevenzione e del trattamento dell'ischemia cerebrale, si presomministrano antagonisti  $A_{2A}$  selettivi, che hanno un ruolo neuroprotettivo, e dopo l'attacco ischemico si somministrano agonisti  $A_{2A}$  selettivi che riducono i

danni provocati dai processi infiammatori, caratteristici della fase di riperfusione. E' ben conosciuto che i recettori  $A_{2A}$  sono localizzati anche nella muscolatura liscia vasale, a livello di condrociti e sinoviociti dove regolano diverse funzioni cellulari. Nel parenchima polmonare umano è stata dimostrata la presenza di questi recettori sia a livello della muscolatura sia nei macrofagi (48). I recettori  $A_{2A}$  sono presenti in tutti gli elementi corpuscolari del sangue, quali piastrine dove modulano effetti antiaggreganti, linfociti nei quali modulano la funzionalità immunitaria, neutrofili dove hanno proprietà antinfiammatorie ed infine nei macrofagi e nei monociti. Negli elementi figurati del sangue i recettori  $A_{2A}$  inibiscono i meccanismi di adesione dei neutrofili con l'endotelio e limitano l'infiammazione generata da anione superossido, riducendo così la risposta infiammatoria che accompagna l'ischemia cardiaca.

A livello del sistema nervoso centrale i recettori  $A_{2A}$  mediano soprattutto l'inibizione dell'attività locomotoria che deriva dalla capacità dell'adenosina di interagire con il sistema dopaminergico. Alcuni studi hanno evidenziato che questo aumento dell'attività locomotoria è bloccata dall'uso di antagonisti, come ad esempio la caffeina (1,3,7-trimetilxantina), che inducono una diminuzione dell'affinità verso i recettori  $D_2$  della dopamina. Recentemente è stata ipotizzata un'interazione diretta tra i recettori  $A_{2A}$  e  $D_2$ , poiché co-localizzati nei neuroni striatali. Questa interazione adenosina/dopamina nei gangli della base svolge un ruolo cruciale nella regolazione dell'attività motoria, ipotizzando un coinvolgimento del recettore  $A_{2A}$  nell'etiopatologia della malattia di Huntington. A tal riguardo, in numerosi studi sono state descritte le alterazioni del recettore  $A_{2A}$  dell'adenosina, in associazione all'espressione della proteina mutata huntingtina. Studi condotti utilizzando linee cellulari striatali ingegnerizzate con l'huntingtina normale e mutata hanno dimostrato un'alterata funzionalità del recettore  $A_{2A}$  nelle linee esprimenti l'huntingtina normale e troncata. In seguito, studi condotti su un piccolo gruppo di pazienti affetti da Huntington, hanno mostrato un aumento della densità recettoriale nelle cellule periferiche del sangue. Il coinvolgimento dei recettori  $A_{2A}$  nella patologia di Huntington, è sottolineato dal fatto che questi

sottotipi recettoriali sono largamente localizzati nei neuroni che degenerano precocemente, e dal ruolo regolatorio che i recettori svolgono nei confronti della neurotrofina BDNF, un fattore necessario per la sopravvivenza dei neuroni striatali.

### **Recettori A<sub>2B</sub>**

I recettori A<sub>2B</sub> sono formati da 328 aminoacidi ed hanno dimensioni inferiori rispetto ai recettori A<sub>2A</sub>. Questi recettori sono accoppiati a proteine G<sub>s</sub> e G<sub>q</sub>, che determinano rispettivamente l'attivazione dell'adenilato ciclasi e della fosfolipasi C. L'adenilato ciclasi induce un aumento del cAMP citoplasmatico, invece la fosfolipasi C porta alla formazione di diacilglicerolo (DAG) ed inositolo-trifosfato (IP<sub>3</sub>) a partire da fosfatidilinositolo-bifosfato (PIP<sub>2</sub>). Il cAMP prodotto attiva la proteina chinasi A (PKA), che modula diverse attività tra le quali l'apertura dei canali del Ca<sup>2+</sup>.

Il DAG stimola invece l'attività della proteina chinasi C (PKC), che fosforila in serina e treonina diversi substrati, ed infine l'IP<sub>3</sub> induce la mobilitazione del Ca<sup>2+</sup> dai depositi intracellulari. I recettori A<sub>2B</sub> presentano una bassa densità recettoriale e per tale motivo occorrono elevate concentrazioni di adenosina per attivarli. Tali recettori sono ben distribuiti in tutto l'organismo e sono coinvolti in numerosi processi fisiologici. Nel tessuto muscolare liscio inducono la contrazione della muscolaris mucosae e la riduzione del tono vascolare. Inducono a livello intestinale la secrezione di acido cloridrico nel lume stesso e nella ghiandola pineale di ratto mediano un aumento di cAMP e dei livelli di N-acetilserotonina. Nel sistema immunitario sono coinvolti nell'aumento della produzione di citochine pro infiammatorie e rilasciate da neutrofili, monociti, macrofagi, HMC-1 e basofili.

Recentemente attraverso tecniche di immunoistochimica sono stati identificati anche nell'epitelio umano bronchiale e polmonare, soprattutto a livello dei fibroblasti e mastociti dove determinano un aumento del rilascio dei mediatori allergici<sup>48</sup>. Sono presenti anche nelle cellule endoteliali, muscolari, neuronali, gliali

e nelle cellule neurosecretorie. Il ruolo del sottotipo recettoriale  $A_{2B}$  è legato soprattutto al rilascio di istamina,  $TNF-\alpha$ ,  $IL1\beta$  e  $IL6$  da mastociti ed eosinofili e alla comparsa di broncocostrizione soprattutto in soggetti affetti da patologie respiratorie su base infiammatoria. I recettori  $A_{2B}$  sono anche presenti a livello di condrociti e sinoviociti suggerendo un ruolo molto importante nella modulazione dello stato infiammatorio nelle patologie osteo-articolari (49).

### **Recettori $A_3$**

I recettori  $A_3$  hanno una massa molecolare di 36 KDa e sono formati da 320 aminoacidi come gli altri recettori possiedono sette domini transmembrana ad  $\alpha$  elica. Nella porzione N-terminale presentano uno o due siti di glicosilazione, non presenti negli altri sottotipi recettoriali. Invece il dominio C-terminale con la cisteina 302 interviene nella formazione del quarto anello intracellulare e nell'interazione con la proteina G. Questo recettore ha una bassa omologia di specie, infatti, l'affinità dei vari agonisti e/o antagonisti è simile tra i recettori di ratto e di uomo per i recettori  $A_1$ ,  $A_{2A}$  e  $A_{2B}$  e diverso per il recettore  $A_3$ . La stimolazione di questi recettori determina un calo dei livelli di cAMP in quanto attraverso la proteina  $G_i$  è inibita l'adenilato ciclasi.

Attraverso l'interazione con le proteine  $G_q$  si osserva invece un aumento dell'attività della fosfolipasi C e di conseguenza un incremento dei livelli di  $IP_3$ , e di  $Ca^{2+}$  intracellulare che funziona da secondo messaggero per l'attivazione della proteinchinasi C (50). La distribuzione del recettore  $A_3$  varia in base alla specie investigata, nell'uomo sono ubiquitari, ma con maggiore espressione nel sistema nervoso centrale e nel sistema cardiovascolare, sono presenti anche nel fegato e nel polmone (51).

Recenti studi suggeriscono che il recettore  $A_3$  gioca un ruolo duplice nella mediazione dello stato infiammatorio. Nei neutrofilari umani la stimolazione dei recettori  $A_3$  determinano un'inibizione di specifiche funzioni quali degranolazione, chemiotassi e produzione di anione superossido, e agonisti molto selettivi riducono la produzione di citochine pro-infiammatorie quali  $TNF-\alpha$ .

Numerosi studi hanno recentemente dimostrato una sovraespressione del recettore  $A_3$  nelle cellule tumorali (52). È stato anche dimostrato che in persone affette da cancro al colon vi è una sovraespressione fino a 3 volte maggiore di recettori  $A_3$  nei linfociti e nei neutrofili rispetto ai controlli sani. Dopo l'asportazione chirurgica della massa tumorale, i livelli di espressione del recettore tornano alla normalità (52).

A livello cardiovascolare i recettori  $A_3$  dell'adenosina sono coinvolti nelle condizioni di ischemia cardiaca, ipotensione, ed esercitano molti effetti cardioprotettivi modulando il rilascio del fattore tissutale (53).

Il sottotipo recettoriale  $A_3$  svolge importanti funzioni nell'ischemia cerebrale e cardiaca, nell'asma, nell'infiammazione e nella cancerogenesi. Questo recettore sembra inoltre coinvolto nel fenomeno dell'apoptosi caratterizzata da un aumento dei livelli di adenosina prodotta in seguito ad un danno cellulare.

A livello periferico i recettori  $A_3$  dell'adenosina sono espressi nei sinoviociti e condrociti, cellule che hanno una notevole importanza nelle patologie infiammatorie legate all'apparato osteoarticolare (49).

### **Ruolo fisiologico dell'adenosina**

Le risposte fisiologiche dell'adenosina sono molto complesse e dipendono in modo particolare dalla specie, dal tipo, dallo stato metabolico del tessuto e dal sottotipo recettoriale attivato ( $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  e  $A_3$ ).

Il ruolo principale dell'adenosina è quello di regolare il bilancio tra apporto e richiesta di energia. L'adenosina può quindi determinare un aumento della domanda di ossigeno nel caso in cui la cellula subisca un particolare stato di stress, come durante un esercizio fisico o in caso d'ipossia (54).

L'aumento della domanda di ossigeno fa diminuire la concentrazione di ATP intracellulare, provocando come risposta una crescita dei livelli intracellulari di AMP ed ADP. Una parte di AMP è idrolizzato in adenosina che, diffondendo per

diffusione facilitata attraverso la membrana, arriva nello spazio extracellulare dove interagisce con i recettori  $A_1$  e  $A_{2A}$ . In condizione di emergenza, il rilascio di purine avviene da cellule endoteliali, globuli rossi, piastrine, e da qualunque tipo cellulare danneggiato da stati ischemici/ipossici. Questa aumentata disponibilità extracellulare di purine rappresenta un meccanismo di difesa che permette l'attivazione contemporanea di più processi volti al ripristino della funzionalità cellulare e della normale omeostasi dell'ossigeno (55). Da questo quadro appare evidente il duplice ruolo dell'adenosina che così agendo controlla due tipi di funzioni: maggiore apporto d'ossigeno ai tessuti e inibizione di tale domanda rispetto alla disponibilità.

### **Potenziale ruolo terapeutico dell'adenosina**

Nel sistema nervoso centrale l'adenosina, presente a basse concentrazioni, svolge un effetto deprimente su diverse popolazioni neuronali per mezzo dei recettori  $A_1$ , riducendo la liberazione di neurotrasmettitori dai terminali nervosi presinaptici e potenziando la conduttanza al potassio a livello post-sinaptico (56). Evidenze sperimentali hanno dimostrato la capacità del recettore  $A_1$  di inibire la liberazione di vari neurotrasmettitori, quali dopamina, serotonina, noradrenalina, acetilcolina e glutammato (58). La stimolazione dei recettori  $A_{2A}$  è collegata ad una facilitazione della trasmissione dopaminergica e colinergica e ad un'inibizione delle terminazioni GABA-ergiche (59).

Alcuni autori hanno ipotizzato un possibile ruolo neuroprotettivo dell'adenosina a livello del sistema nervoso centrale evidenziandone la capacità di prevenire i danni conseguenti a fenomeni ischemici o ad attacchi epilettici, condizioni in cui la produzione di adenosina subisce un notevole incremento, attraverso la modulazione della liberazione di aminoacidi eccitatori ed inibitori (59). Tuttavia, altri autori hanno messo in dubbio tale effetto neuroprotettivo, proponendo un possibile contributo dell'adenosina al danno e alla morte delle cellule neuronali.

Questa duplice attività sembra imputabile al tipo di recettore attivato, alle possibili interazioni tra i recettori sulle cellule neuronali e gliali.

Le conoscenze acquisite negli ultimi anni circa le funzioni svolte dall'adenosina e dai suoi analoghi a livello del sistema nervoso centrale hanno portato ad ipotizzare un possibile impiego clinico di antagonisti purinergici nel trattamento di malattie neurodegenerative (malattia di Alzheimer, morbo di Parkinson, Corea di Huntington). Inoltre l'uso di antagonisti  $A_{2A}$  selettivi in associazione con basse dosi di L-DOPA ha permesso di ottenere risultati incoraggianti nella riduzione del tremore, sintomo tipico nella patologia di Parkinson (60). Alcuni autori hanno anche proposto l'uso di antagonisti del recettore  $A_1$ , capaci di facilitare la liberazione di acetilcolina, nel trattamento della malattia di Alzheimer.

A livello cardiaco l'adenosina è coinvolta nella regolazione dell'attività delle cellule pacemaker e dei miociti (61). Vari autori hanno descritto un'azione anti-ischemica dell'adenosina, questo effetto sembra essere legato a due meccanismi: il primo prevede che l'attivazione del recettore e il conseguente innalzamento di cAMP inneschi la cascata fosforilativa delle proteine ERK e la successiva attivazione delle proteine, capaci di favorire un prolungamento della sopravvivenza cellulare durante situazioni di ipossia. Il secondo meccanismo ipotizza l'attivazione delle correnti al  $K^+$  e delle correnti al  $Ca^{2+}$  in ingresso, con conseguente coinvolgimento delle PKA, consentendo un'azione protettiva nei confronti di fenomeni ischemici.

A livello del sistema respiratorio, l'adenosina svolge un ruolo chiave nei processi infiammatori e nella broncocostrizione associata ad asma e BPCO (62). L'inalazione di questa purina, generalmente sotto forma di AMP, causa un'evidente broncocostrizione in pazienti asmatici e in soggetti allergici non-asmatici. Il ruolo svolto dall'adenosina nell'insorgenza della patologia asmatica e nella BPCO non sembra attribuibile ad un'azione diretta del nucleoside sulla muscolatura liscia, quanto piuttosto ad un meccanismo indiretto che prevede l'interazione del mediatore con i recettori purinergici espressi su terminazioni nervose o su cellule infiammatorie come i mastociti. Una volta ricevuto lo stimolo,



queste cellule sono in grado di liberare mediatori dell'infiammazione quali leucotrieni, prostaglandine, interleuchine, *tumor necrosis factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) e istamina, che interagiscono con la muscolatura liscia inducendo broncocostrizione. Evidenze sperimentali hanno infatti dimostrato che l'adenosina agisce attraverso due vie nell'induzione della costrizione bronco-alveolare: la via neuronale e l'interazione con recettori purinergici presenti sulla membrana dei mastociti (63).

Per mezzo di studi *in vitro* è stato possibile osservare che l'adenosina è in grado di promuovere la liberazione di istamina, prostaglandina D<sub>2</sub> e popolazioni di cellule mastocitarie (64). I recettori per l'adenosina presenti sui mastociti appartengono ai sottotipi A<sub>2A</sub> e A<sub>2B</sub>. In condizioni fisiologiche, la concentrazione di adenosina è tale da consentire il legame preferenziale con i recettori A<sub>2A</sub>, a più alta affinità (63). In presenza di stati patologici, come asma e BPCO, la concentrazione di adenosina è tale da reclutare anche recettori A<sub>2B</sub>, caratterizzati da una bassa affinità, con conseguente degranolazione dei mastociti mediata da IP<sub>3</sub> e DAG, e aumento della liberazione di istamina (63).

Nel rene l'adenosina, attraverso l'interazione con i recettori A<sub>1</sub> promuove soprattutto un'azione vasocostrittrice e media una riduzione del flusso sanguigno renale con concomitante riduzione della velocità di filtrazione glomerulare.

L'adenosina è significativamente coinvolta nella modulazione delle risposte infiammatorie attraverso la regolazione dell'attività di diverse cellule immunitarie, dove svolge una marcata attività immunosoppressiva. Attraverso l'interazione con i recettori A<sub>2A</sub>, l'adenosina è in grado di inibire l'attività dei neutrofili, riducendo l'espressione di molecole di adesione, limitando la secrezione di citochine proinfiammatorie e di fattori di crescita (64).

Recettori A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub> sono espressi anche su macrofagi e cellule dendritiche ed è stato dimostrato che la stimolazione di questi recettori è associata ad una riduzione della liberazione di interleuchina (IL-12), TNF- $\alpha$ , *macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$*  (MIP-1 $\alpha$ ) e ossido nitrico (NO), e ad un aumento della produzione di interleuchina-10 (IL-10), citochina ad attività anti-infiammatoria.

In letteratura sono disponibili evidenze a sostegno della capacità dell'adenosina di indurre liberazione di istamina in seguito a interazione con recettori  $A_{2B}$  e  $A_3$  espressi sui mastociti (51). Alcuni autori hanno dimostrato che la liberazione di istamina è in grado di ridurre la produzione di  $TNF-\alpha$  e quindi di contenere il fenomeno infiammatorio, attraverso l'attivazione di recettori dell'istidina di tipo  $H_2$ , presenti su macrofagi (65). Studi recenti hanno dimostrato che topi *knockout* per l'enzima adenosina deaminasi, caratterizzati da elevati livelli endogeni di adenosina, sviluppano un'infiammazione mastocito-mediata molto simile a quella che si riscontra nella patologia asmatica. Questa evidenza, sostenuta dall'osservazione che pazienti con asma presentano livelli elevati di adenosina nel liquido broncoalveolare (BAL) e un incremento dell'espressione di recettori purinergici nelle cellule infiammatorie, suggerisce che il sistema dell'adenosina sia attivamente coinvolto nella fisiopatologia dell'asma e della BPCO.

## **SCOPO DELLA TESI**

L'artrite reumatoide (AR) è una malattia infiammatoria cronica ad eziologia sconosciuta che coinvolge le articolazioni diartrodiali (provviste di sinovia) e determina, se non adeguatamente trattata, una progressiva distruzione delle articolazioni coinvolte, con successiva deformità e deterioramento funzionale (66). Non essendo possibile prevenirla, risulta fondamentale una diagnosi precoce che consenta un tempestivo trattamento con farmaci definiti DMARDs (Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs). Difatti, un atteggiamento terapeutico "aggressivo" sin dal principio consente di migliorare significativamente la prognosi dei pazienti, rallentando o addirittura bloccando la progressione del danno articolare (67). Allo stato attuale, il farmaco di riferimento nella terapia dell'artrite reumatoide è il methotrexate (MTX), considerato unanimemente il "gold standard" terapeutico con il quale devono confrontarsi tutti i farmaci di nuova generazione (68-71). L'evento patogenetico fondamentale in corso di artrite reumatoide è rappresentato dalla *sinovite*, ovvero l'infiltrazione cronica da parte di macrofagici, linfociti e plasmacellule del tessuto che normalmente riveste e lubrifica le articolazioni diartrodiali. L'evento successivo è rappresentato dalla formazione di un tessuto ipertrofico (definito "panno" sinoviale), che è in grado di determinare la distruzione della cartilagine articolare e dell'osso subcondrale. La dimostrazione che un ruolo fondamentale nella genesi e nel mantenimento della sinovite reumatoide è svolto dal fattore di necrosi tumorale  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) (70,71) ha rappresentato un evento fondamentale nella terapia di tale patologia, in quanto il successivo sviluppo di molecole in grado di inibire l'azione di tale citochina (farmaci anti-TNF $\alpha$ ) ha conseguito risultati sorprendenti in termini di riduzione dell'attività di malattia, di induzione della remissione clinica e soprattutto del rallentamento della progressione del danno radiologico (72-74). Tali farmaci si sono dimostrati di efficacia pari o addirittura superiore ai classici DMARDs (incluso il MTX), pur non presentando un profilo di tossicità superiore (71). Inoltre, i principali studi condotti su pazienti affetti da artrite reumatoide in fase iniziale hanno evidenziato che un trattamento di combinazione tra MTX e farmaci antagonisti del TNF $\alpha$  ha efficacia statisticamente superiore, rispetto agli stessi

farmaci utilizzati singolarmente, nella induzione e nel mantenimento della remissione e nel blocco della progressione del danno articolare (71).

Attualmente, numerose evidenze sperimentali suggeriscono il coinvolgimento dell'adenosina nel processo flogistico dell'artrite reumatoide (75). L'adenosina, un nucleoside purifico rilasciato da una grande varietà di cellule a seguito di condizioni variegata che comportino uno stress cellulare, è considerata un potente regolatore endogeno della flogosi, in virtù della sua interazione con 4 sottotipi recettoriali accoppiati con la proteina G e denominati  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  e  $A_3$  (76-80). I recettori  $A_1$  e  $A_3$  mediano l'inibizione dell'enzima adenilato ciclasi e determinano una riduzione dei livelli di cAMP (51,76), mentre i recettori  $A_{2A}$  e  $A_{2B}$  stimolano l'attività dell'adenilato ciclasi con conseguente accumulo di cAMP (81,82). È stato ormai dimostrato che gli effetti anti-infiammatori dell'adenosina sono mediati dalla attivazione dei recettori  $A_{2A}$  and  $A_3$  (75,83). Infatti, uno studio condotto su monociti/macrofagi umani e murini ha dimostrato come l'attivazione dei recettori  $A_{2A}$  indotta dall'adenosina o suoi analoghi determini una soppressione dei livelli di TNF $\alpha$  e dell'IL-12 ed un aumento dei livelli di IL-10 (citochina con effetti anti-infiammatori) (84,85). Inoltre, una profonda soppressione dei livelli di citochine pro-infiammatorie TNF $\alpha$  e MIP-1 $\alpha$  è stata evidenziata *in vitro* con l'utilizzo di IB-MECA, un agonista del recettore  $A_3$ AR altamente selettivo; lo stesso IB-MECA è risultato efficace anche nel prevenire la comparsa di infiammazione in modelli sperimentali di artrite da adiuvanti condotti sulla cavia (86,87).

In aggiunta, numerose evidenze sperimentali suggeriscono che uno dei principali effetti anti-infiammatori del MTX consiste proprio nell'incremento delle concentrazioni extracellulari dell'adenosina, la quale successivamente agisce tramite interazione con i recettori  $A_{2A}$  e  $A_3$  (75, 88-90). Inoltre, è stato dimostrato come il MTX possa potenziare gli effetti anti-infiammatori di IB-MECA, attraverso una sovra-regolazione dell'espressione di  $A_3$ , suggerendo un potenziale effetto sinergistico delle due molecole (91).

Per quanto riguarda i dati in merito ai pazienti affetti da artrite reumatoide, uno studio ha evidenziato un aumento della espressione di  $A_3$  sulla membrana dei monociti a confronto dei controlli sani, e tale sovra-espressione è stata correlata con gli elevati livelli di citochine pro-infiammatorie come l'IL-2 e il TNF $\alpha$  (92). Il meccanismo proposto prevede che l'incremento di tali citochine possa determinare  $A_3$  e un aumento della espressione del recettore  $A_3$  tramite l'intervento del fattore

di trascrizione NF-KB (92). In effetti studi di bio-informatica hanno evidenziato la presenza di sequenze geniche riconosciute da NF-KB a livello del promotore di A<sub>3</sub> (92). E' stato inoltre evidenziato che la stimolazione del recettore A<sub>3</sub> tramite agonisti sa in grado di *resettare* la via di stimolazione mediata da NFkB attraverso una deregolazione dei livelli del complesso PKB/Akt, che normalmente regola l'attività del fattore di trascrizione (86). Infine, uno studio condotto su colture cellulari da pazienti affetti da artrite reumatoide ha evidenziato come l'agonista dei recettori dell'adenosina NECA (attivo sia su A<sub>2A</sub> che A<sub>3</sub>) sia in grado di sopprimere il rilascio di TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , sia al basale che dopo stimolo con LPS (93).

Scopo iniziale dello studio è stato quello di analizzare la presenza e la funzionalità dei recettori dell'adenosina A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub> sulle membrane dei linfociti e dei neutrofili di pazienti affetti da artrite reumatoide, combinando una metodica di binding recettoriale con il western blotting. In particolare, abbiamo studiato sia il grado di affinità dei recettori che la loro densità, considerando sia pazienti mai trattati farmacologicamente che dopo trattamento. I pazienti trattati farmacologicamente sono stati distinti in due gruppi: il primo trattato con MTX ed il secondo con farmaci antagonisti del TNF $\alpha$ . Come gruppo di controllo sono stati considerati volontari sani. Inoltre, abbiamo analizzato il profilo funzionale dei recettori valutando la produzione di cAMP dopo stimolo con agonisti specifici. E' stato inoltre eseguita una analisi dei livelli plasmatici di TNF $\alpha$  nei pazienti con artrite reumatoide, valutandolo prima e dopo trattamento farmacologico. Infine, è stata eseguita una analisi dello stato attivazione di NFkB, considerando le subunità p65 e p50, nei pazienti con artrite reumatoide prima e dopo il trattamento farmacologico.

## **PAZIENTI E METODI**

**Pazienti.** Tutti i pazienti arruolati in tale studio sono stati reclutati presso l'Unità Operativa di Reumatologia dell'Ospedale Sant'Anna di Ferrara ed hanno aderito dopo aver firmato un relativo consenso informato. In tutti i pazienti la diagnosi di artrite reumatoide è stata formulata in accordo ai criteri classificativi dell'American College of Rheumatology rivisitati nel 1987 (15). Ogni paziente è stato sottoposto ad esame anamnestico, clinico, elettrocardiogramma ed ha eseguito i comuni esami emato-chimici di routine.

I pazienti inclusi nello studio (n=56) sono stati classificati in 3 gruppi: 1) pazienti affetti da artrite reumatoide in fase iniziale (n=20), mai trattati con DMARDs; 2) pazienti in terapia con MTX (n = 23); 3) pazienti in terapia con farmaci antagonisti del TNF $\alpha$  (infliximab o adalimumab) (n = 13). I dati clinico-demografici dei 3 gruppi di pazienti sono illustrati nella tabella 4A e la terapia nella tabella 4B.

I controlli sani (n = 30), sovrapponibili per età con i pazienti affetti da artrite reumatoide, sono stati arruolati presso la Banca del Sangue dell'Ospedale Sant'Anna di Ferrara. Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico dello stesso Ospedale ed ogni partecipante ha aderito spontaneamente dopo aver preso visione del consenso informato in accordo con i principi sottolineati dalla Dichiarazione di Helsinki.

### **Isolamento dei linfociti e dei neutrofili dal sangue dei pazienti.**

I linfociti ed i neutrofili sono stati isolati dal sangue periferico dei pazienti in accordo con le metodiche già descritte (77,78). Le cellule sono state isolate non più tardi di 3-4 ore dopo avere eseguito il prelievo ematico. Al sangue è stata aggiunta una soluzione contenente Dextrano T500 al 6% (Sigma, St Louis, MO) e gli eritrociti sono stati fatti sedimentare per 60 minuti. I globuli bianchi sono stati raccolti dopo centrifugazione per 15 minuti a 100 giri ed i restanti eritrociti lisati in acqua distillata a 4°C. Le cellule sono state raccolte dopo centrifugazione per 5 minuti a 250 giri, successivamente sospese in tampone fosfato Krebs-Ringer stratificato su 10 ml di Fycoll-Hypaque (GE Healthcare, UK).

I neutrofili sono stati raccolti dopo sedimentazione e la vitalità cellulare è risultata superiore al 95% come evidenziato dal test di esclusione trypan blue. Dopo

centrifugazione a 400 giri per 15 minuti a 4°C il pellet di mononucleati è stato risospeso e centrifugato due volte a 20,000 giri per 10 minuti. I linfociti e i neutrofili opportunamente diluiti a  $1 \times 10^6$  cellule/campione sono stati immediatamente impiegati per gli esperimenti con il cAMP.

Per ottenere la sospensione delle membrane plasmatiche, le frazioni cellulari sono state centrifugate in tampone ipotonico a 20,000 giri per 10 minuti. Il risultante pellet è stato ri-sospeso in tris HCl 50 mM buffer pH 7.4 contenente 2 UI/ml di adenosina deaminasi (Sigma, St Louis, MO) ed incubati per 30 minuti a 37°C. Dopo l'incubazione la sospensione è stata nuovamente centrifugata a 18000 rpm per 10 minuti. Il pellet finale è stato impiegato per i saggi di binding con i radioligandi. La concentrazione della proteina è stata determinata con metodica Bio-Rad (94) utilizzando l'albumina bovina come standard di riferimento.

**Esperimenti di Saturation Binding per i recettori A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> and A<sub>3</sub>.** Gli esperimenti di saturation binding per il recettore A<sub>1</sub> sono stati eseguiti utilizzando [<sup>3</sup>H]-DPCPX ([<sup>3</sup>H]-1,3-dipropyl-8-cyclopentyl-xanthine, attività specifica 120 Ci/mmol, Perkin Elmer Life e Analytical Sciences, Boston, USA) come radioligando (95). Le membrane dei linfociti e dei neutrofili (60 µg di protein/analisi) sono state incubate con concentrazioni da 8 a 10 del radioligando [<sup>3</sup>H]-DPCPX (0.01-20 nM), per 90 minuti a 25°C. Binding non specifico è stato determinato in presenza di DPCPX 1 µM.

Gli esperimenti di saturation binding per il recettore A<sub>2A</sub> sono stati eseguiti utilizzando [<sup>3</sup>H]-ZM 241385 ([<sup>3</sup>H]- 4-(2-[7-amino-2-(2-furyl) [1,2,4]-triazolo [2,3-a][1,3,5] triazin-5-ylamino] ethyl)phenol, attività specifica 27 Ci/mmol, Biotrend, Cologne, Germany), come radio-ligando (81). Le membrane cellulari (60 µg of protein/analisi) sono state incubate per 60 minuti a 4°C con varie concentrazioni del radioligando [<sup>3</sup>H]-ZM 241385 (0.01-20 nM). Binding non specifico è stato determinato in presenza di ZM 241385 1 µM.

Gli esperimenti di saturation binding per il recettore A<sub>2B</sub> sono stati eseguiti utilizzando [<sup>3</sup>H]-MRE 2029F20 ([<sup>3</sup>H]-N-benzo[1,3]dioxol-5-yl-2-[5-(2,6-dioxo-1,3-dipropyl-2,3,6,7-tetrahydro-1*H*-purin-8-yl)-1-methyl-1*H*-pyrazol-3-yl-oxy]-acetamide, attività specifica 123 Ci/mmol, GE Healthcare, UK) come radioligando (82). Le membrane cellulari (80 µg of protein/assay) e [<sup>3</sup>H]-MRE 2029F20 (0.01-30 nM) sono stati incubati per 60 minuti a 4°C. Binding non specifico è stato determinato in presenza di MRE 2029F20 1 µM.

Gli esperimenti di saturation binding per il recettore A<sub>3</sub> sono stati eseguiti utilizzando [<sup>3</sup>H]-MRE 3008F20 ([<sup>3</sup>H]-5N-(4-methoxyphenylcarbamoyl) amino-8-propyl-2-(2-furyl) pyrazolo [4,3-e]-1,2,4-triazolo [1,5-c]pyrimidine, specific activity 67 Ci/mmol, GE Healthcare, UK) come radioligando (95). Le membrane (80 µg di proteine/analisi) sono state incubate con [<sup>3</sup>H]-MRE 3008F20 (0.01-30 nM) a 4°C per 150 minuti. La radioattività libera e legata è stata separata filtrando il campione su filtri di vetro Whatman GF/B utilizzando un apparecchio di filtrazione Brandel cell. La radioattività legata al filtro è stata letta con uno scintillatore Packard 2500 TR.

**Analisi di Western Blotting.** I linfociti umani sono stati lavati con soluzione salina tampone fredda contenente 1mM di sodio ortovanadato, 104 mM 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride, 0.08 mM aprotinin, 2 mM leupeptin, 4 mM bestatin, 1.5 mM pepstatin A, 1.4 mM E-64 (Sigma, St Louis, MO). Successivamente le cellule sono state lisate in soluzione di lisi Triton e la concentrazione di proteina determinata tramite analisi di proteina BCA (Pierce, Rockford, IL). Le aliquote dei campioni di proteina (50 µg) sono state analizzate utilizzando anticorpi specifici per i recettori dell'adenosina umani A<sub>2A</sub> e A<sub>3</sub> (1 µg/ml diluizione, Alpha Diagnostic, San Antonio, Texas) (96). I filtri sono stati lavati e incubati per 1 ora a temperatura ambiente con anticorpi secondari coniugati con perossidasi (diluizione 1:2000).

**Misurazione dei livelli di AMP ciclico. I linfociti e i neutrofilii umani** (10<sup>6</sup> cellule/campione) sono stati incubati con una soluzione tampone 0.5 ml di Krebs Ringer, contenente 1.0 IU/ml di adenosina deaminasi (Sigma, St Louis, MO) e preincubate per 10 minuti sotto agitazione a 37°C. Successivamente l'effetto di tipici agonisti dei recettori A<sub>2A</sub> e A<sub>3</sub> è stato studiato utilizzando NECA (5'-N-ethylcarboxamidoadenosine, Sigma, St Louis, MO) e Cl-IB-MECA (N<sup>6</sup>-(3-iodobenzyl)-2-chloro-adenosine-5'-N-methyluronamide, Sigma, St Louis, MO) a differenti concentrazioni (1 nM-1 µM). Le cellule sono state inoltre incubate con forskolin (1 µM, Sigma, St Louis, MO) e/o Ro 20-1724 (0.5 mM, 4-(3-butoxy-4-methoxybenzyl)-2-imidazolidinone, Sigma, St Louis, MO) come inibitori della fosfodiesterasi per valutare l'attività dell'adenilato ciclasi. La soluzione acquosa finale è stata testata per i livelli di AMP ciclico a mezzo di una analisi di binding competitivo utilizzando [<sup>3</sup>H]-ciclico AMP (GE Healthcare, UK), trizma base 0.1 M, aminophylline 8.0 mM, mercaptoethanol 6.0 mM, pH 7.4.



**Concentrazioni di adenosina nel plasma umano.** Le concentrazioni di adenosina sono state valutate utilizzando un sensore specifico che si basa sulla conversione di adenosina in inosina, ipoxantina e acido urico con produzione di perossido di idrogeno (97). I tre enzimi richiesti per tale processo enzimatico, adenosina deaminasi, nucleoside fosforilasi e xantina ossidasi sono stati caricati su specifici sensori ottenuti dalla Sycopel International (Jarrow, Tyne and Wear, UK). Le sonde sono state controllate da un potenziostato (Biosensor Driver, Sycopel International) che ha mantenuto l'elettrodo funzionante a +650 mV per rilevare il perossido di idrogeno.

**Rilascio di TNF- $\alpha$  nel plasma umano.** I livelli di TNF- $\alpha$  sono stati misurati nel plasma umano ottenuto da controlli sani e dai pazienti con artrite reumatoide mediante metodica immunoenzimatica altamente sensibile, impiegando TNF- $\alpha$  umano (R&D Systems, Minneapolis, USA), in accordo con le istruzioni del produttore (93).

**Attivazione di NF $\kappa$ B nei linfociti e neutrofilii umani.** Gli estratti di nucleo dalle cellule dei controlli sani e dei pazienti affetti da artrite reumatoide sono state ottenute tramite un kit specifico (Active Motif, Carlsbad, USA), in accordo con le istruzioni del produttore.

La attivazione di NF $\kappa$ B è stata valutata misurando le subunità proteiche p65 e p50 negli estratti nucleari utilizzando il kit TransAM NF $\kappa$ B (Active Motif, Carlsbad, USA).

Le subunità fosforilate di NF $\kappa$ B si legano in modo specifico agli oligonucleotidi contenenti le sequenze NK $\kappa$ B consenso (5'-GGGACTTTCC-3'). L'anticorpo primario utilizzato per rilevare NF $\kappa$ B riconosce un epitomo su ciascuna subunità che risulta accessibile solo quando esse sono attivate e legate al loro bersaglio sul DNA. Un anticorpo secondario coniugato con una perossidasi (HRP) ha dato luogo ad un viraggio colorimetrico che è stato quantificato tramite spettrofotometria a 450 nm (98).

**Analisi statistica dei dati.** Le costanti di dissociazione all'equilibrio per il saturation binding, l'affinità o valori  $K_D$  così come le densità massime di specifici siti di legame,  $B_{max}$  sono state calcolate utilizzando il programma Ligand (Kell Biosoft, Ferguson, MO) (99). Gli esperimenti di funzionalità sono stati calcolati tramite analisi di regressione non lineare utilizzando tipiche curve dose-risposta (GraphPAD Prism, San Diego, CA). L'analisi dei dati è stata eseguita da una

analisi di varianza one-way. Le differenze tra i gruppi sono state esaminate con il test di Dunnett e sono state considerate significative per valori di  $p < 0.01$ . Tutti i dati sono stati espressi come medie  $\pm$  errore standard medio (SEM).

## RISULTATI

### **Affinità e densità dei recettori dell'adenosina nei pazienti con artrite reumatoide.**

I parametri relativi alla affinità ( $K_D$ , nM) e alla densità ( $B_{max}$ , fmol/mg protein) dei recettori  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  e  $A_3$  sulle membrane dei linfociti e neutrofili dei pazienti e del gruppo di controlli sani sono riportati nella figura 6 e nella tabella 5.

Considerando il primo gruppo di pazienti (affetti da artrite reumatoide in fase precoce, mai trattata con DMARDs), non abbiamo riscontrato differenze nella affinità e densità dei recettori  $A_1$  e  $A_{2B}$  espressi sulle membrane dei linfociti, rispetto i controlli sani (Tabella 5). Diversamente, la affinità dei recettori  $A_{2A}$  e  $A_3$  in tale gruppo di pazienti è risultata inferiore ai controlli ( $K_D = 2.00 \pm 0.15^*$  versus  $1.26 \pm 0.11$  nM, per  $A_{2A}$  e  $3.10 \pm 0.10^*$  versus  $1.78 \pm 0.16$  nM, per  $A_3$  \*,  $p < 0.01$ ), mentre la densità dei recettori  $A_{2A}$  e  $A_3$  è risultata significativamente superiori nei pazienti rispetto al gruppo di controllo ( $B_{max} = 163 \pm 11^*$  versus  $55 \pm 6$  nM, per  $A_{2A}$  and  $270 \pm 10^*$  versus  $135 \pm 12$  nM, per  $A_3$  \*,  $p < 0.01$ ; figure 7A, 7C). Risultati simili sono stati ottenuti analizzando l'espressione dei recettori sulle membrane dei neutrofili: a) nessuna differenza significativa in termini di affinità e/o densità dei recettori  $A_1$  e  $A_{2B}$  fra i pazienti ed in controlli sani; b) riduzione della affinità ed aumento della densità dei recettori  $A_{2A}$  e  $A_3$  nei pazienti con artrite reumatoide rispetto ai controlli sani (tabella 5; figura 6B, 6D).

Considerando invece l'effetto del trattamento farmacologico con MTX ed anti-TNF $\alpha$  sulla espressione e sulla funzionalità dei recettori, abbiamo evidenziato differenze sostanziali. Intanto, entrambi i trattamenti non comportavano modifiche significative sulla affinità e la densità dei recettori  $A_1$  e  $A_{2B}$  rispetto ai controlli, mentre nei pazienti trattati con antagonisti del TNF $\alpha$  l'affinità e a densità dei recettori  $A_1$  and  $A_{2B}$  si *resettava* su valori non differenti ai controlli sani, sia esaminando i linfociti che in neutrofili. Al contrario, il trattamento con MTX determinava delle alterazioni sulla affinità e sulla densità dei recettori simili a quelle già evidenziate nei pazienti con malattia precoce, mai trattata con DMARDs (tabella 5; figure 6, 7A, 7B).

### **Espressione dei recettori dell'adenosina nei pazienti con artrite reumatoide tramite analisi western blotting.**

Nelle figure 7C, 7D, 7E sono riportati i risultati in immunoblotting e la analisi densitometrica relativa alla espressione dei recettori  $A_{2A}$  e  $A_3$  sui controlli sani ( $n = 3$ ), sui pazienti affetti da artrite reumatoide non trattati ( $n = 3$ ) e dopo trattamento ( $n = 6$ ).

Anche per quanto concerne tale aspetto abbiamo evidenziato differenze rilevanti nei 3 gruppi di pazienti; in particolare, nel gruppo trattato con antagonisti del  $TNF\alpha$  l'espressione dei recettori risultava sovrapponibile ai controlli sani, mentre nei pazienti trattati con MTX l'espressione di  $A_{2A}$  e  $A_3$  risultava incrementata e quindi non differente rispetto i pazienti con malattia in fase precoce (figure 7C, 7D, 7E).

**Potenza degli agonisti  $A_{2A}$  and  $A_3$  nei pazienti con artrite reumatoide.** Come prima cosa abbiamo analizzato la sensibilità dell'adenilato ciclasi verso agenti noti per attivare in maniera specifica tale sistema enzimatico. Considerando quindi i linfociti dei 3 gruppi di pazienti rispetto ai controlli sani, non abbiamo rilevato differenze significative in termini di attività dell'enzima sia al basale (controlli  $15\pm 2$  pmol/ $10^6$  cellule; artrite non trattati:  $14\pm 2$  pmol/ $10^6$  cellule; pazienti trattati con MTX:  $17\pm 2$  pmol/ $10^6$  cellule; pazienti trattati con anti-TNF:  $16\pm 2$  pmol/ $10^6$  cellule) che dopo stimolazione con un attivatore diretto come la forskolina (controlli:  $61\pm 6$  pmol/ $10^6$  cellule; artrite non trattati:  $63\pm 7$  pmol/ $10^6$  cellule; pazienti trattati con MTX:  $62\pm 5$  pmol/ $10^6$  cellule; pazienti trattati con anti-TNF:  $65\pm 6$  pmol/ $10^6$  cellule). Come atteso, i livelli di cAMP in presenza di un inibitore dell'enzima fosfodiesterasi (Ro 201724) sono risultati aumentati da 1.4 a 1.6 volte rispetto ai controlli e da 1.3 a 1.5 volte rispetto alla presenza di forskolina. Risultati analoghi sono stati ottenuti sui neutrofili (dati non mostrati) confermando quindi l'assenza di variazioni sia al basale che dopo stimolo dell'attività dell'adenilato ciclasi (in presenza o assenza di Ro 201724) nei pazienti con AR rispetto ai controlli. Successivamente abbiamo studiato le variazioni nella concentrazione di cAMP in presenza degli agonisti recettoriali NECA o Cl-IB-MECA. La figura 8 illustra la potenza di tipici agonisti recettoriali come NECA (8A, 8C) e Cl-IB-MECA (8B, 8D) sui linfociti e i neutrofili dei 3 gruppi di pazienti rispetto ai controlli sani. I risultati attestano che nell'artrite reumatoide non trattata i valori di

EC<sub>50</sub> per NECA (la concentrazione di agonista in grado di elicitare il 50% di massima formazione di cAMP) sono significativamente inferiori rispetto ai controlli, indicando un aumento nella potenza di NECA (figura 8E). Analogamente, abbiamo evidenziato un incremento nella potenza di CI-IB-MECA (agonista selettivo di A<sub>3</sub>) sia nei pazienti con AR non trattati che dopo trattamento con MTX, suggerendo che l'aumento della espressione dei recettori sia associato ad un aumento nella potenza. Diversamente, nel terzo gruppo di pazienti (trattati con antagonisti del TNF $\alpha$ ) la potenza di NECA e CI-IB-MECA è risultata simile ai controlli sani (figura 8E).

#### **Concentrazione di adenosina nel plasma dei pazienti con artrite reumatoide.**

La figura 9A mostra le concentrazioni di adenosina e dei suoi metabolici (inosina e ipoxantina) nei 3 gruppi di pazienti con artrite reumatoide e nei controlli sani. Da tale analisi abbiamo evidenziato un significativo aumento delle concentrazioni dei metabolici dell'adenosina su tutti i pazienti con AR rispetto ai controlli sani (figura 9A).

#### **Concentrazione del TNF- $\alpha$ nel plasma di pazienti con artrite reumatoide.**

Le concentrazioni plasmatiche del TNF $\alpha$  sono state studiate nei 3 gruppi di pazienti e nei controlli sani. Come logico attendersi, nei controlli sani i livelli basali di TNF $\alpha$  sono risultati estremamente bassi mentre nei pazienti con artrite mai trattata abbiamo osservato un significativo aumento dei livelli di tale citochina (figura 9B). Per quanto concerne i gruppi in trattamento, mentre nei pazienti MTX-trattati presentavano valori di TNF $\alpha$  fino a 2.6 volte superiori rispetto ai controlli sani, nei pazienti in terapia con anti-TNF $\alpha$  i livelli del TNF $\alpha$  sono risultati simili al gruppo di controllo (indipendentemente dalla risposta clinica) (figura 9B).

#### **Attivazione di NF $\kappa$ B su linfociti e neutrofilo dei pazienti con artrite reumatoide.**

I livelli di NF $\kappa$ B sono stati esaminati nei pazienti con AR non trattata, nei due gruppi in trattamento e nei controlli sani. I risultati hanno evidenziato un incremento statisticamente significativo delle subunità attivate p65 e p50 nei pazienti con artrite non trattata e nel gruppo MTX-trattato rispetto ai controlli sani (figura 9). Diversamente, nei pazienti trattati con antagonisti del TNF- $\alpha$  entrambe le subunità

sono risultate ridotte rispetto ai pazienti con malattia non trattata (figure 9C e 9E). Tali risultati sono stati evidenziate tanto sui linfociti che sui neutrofili (figure 9D, 9F).

## DISCUSSIONE

L'adenosina è un nucleoside endogeno con funzioni regolatorie in molteplici funzioni cellulari, il cui meccanismo d'azione prevede l'interazione con diversi sottotipi recettoriali, identificati come  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  e  $A_3$ . Tra le varie funzioni biologiche dell'adenosina, l'effetto anti-infiammatorio viene mediato dalla interazione con i recettori  $A_{2A}$  e  $A_3$  (69). Recenti studi suggeriscono un possibile ruolo dell'adenosina nell'artrite reumatoide. Ad esempio, il recettore  $A_3$  è risultato sovra-espresso sulla membrana dei monociti di pazienti con tale patologia (91); il MTX, principale *farmaco di fondo* nella AR, esplica il proprio effetto anti-flogistico solo in presenza dei recettori  $A_{2A}$  e  $A_3$  (75). Inoltre, numerose studi condotti su modelli sperimentali di artrite hanno confermato l'efficacia di vari agonisti  $A_3$  nel miglioramento delle manifestazioni flogistiche e nella prevenzione del danno articolare (85,90,100-102). Recentemente, in uno studio randomizzato di fase II, CF101 (un agonista  $A_3$  con formulazione orale) è risultato efficace nel controllare le manifestazioni cliniche dell'AR (103). In tale studio, inoltre, l'entità della risposta clinica è stata posta in relazione con i livelli di espressione del recettore  $A_3$ , suggerendone un potenziale ruolo come *biomarker* di malattia (103). Attualmente, il MTX rappresenta il farmaco "gold standard" nel trattamento della AR, con il quale tutte le molecole di nuova generazione vengono confrontate. È ormai noto che uno degli effetti infiammatori del MTX consiste nell'aumento dei livelli di adenosina, la quale esplica il proprio effetto interagendo con i recettori  $A_{2A}$  e  $A_3$ . L'adenosina stessa, pertanto, con meccanismo paracrino, stimolerebbe l'aumento della espressione dei recettori  $A_3$ . Inoltre, in un modello sperimentale di artrite, è stato dimostrato un benefico effetto nella combinazione tra MTX e CF101, con un potenziamento dell'effetto anti-infiammatorio di CF101 indotto dalla sovra-espressione di  $A_3$ , mediata dal MTX stesso (91).

La strategia terapeutica corrente dell'AR prevede, in caso di persistente aumento dell'attività di malattia nonostante il trattamento con MTX, l'aggiunta di un farmaco anti-TNF $\alpha$  (104). Tali farmaci hanno radicalmente cambiato la prognosi dei pazienti con AR, ma esistono numerose controindicazioni al loro impiego, in particolare nei pazienti ad elevato rischio di infezioni. Inoltre tali molecole, a causa del loro costo molto elevato, non possono essere prescritte in maniera

indiscriminata a tutti i pazienti, ma soltanto in coloro che hanno fallito o mal tollerato un ciclo terapeutico con farmaci DMARDs tradizionali, ivi compreso il MTX.

Allo stato attuale delle nostre conoscenze, vi sono scarse informazioni in merito all'effetto che la terapia con i farmaci anti-TNF $\alpha$  esercita sulla espressione dei recettori dell'adenosina in corso di AR. Pertanto, sulla base di tali premesse, abbiamo voluto studiare il pattern di espressione e di funzionalità dei recettori A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub> nell'AR "in toto", ovvero considerando sia la malattia in fase precoce, non trattata con farmaci DMARDs, che dopo trattamento continuativo con MTX e con gli antagonisti del TNF $\alpha$ . Tutte le analisi sono state raffrontate con i dati ottenuti su un gruppo di controllo, rappresentato da soggetti sani.

La funzionalità dei recettori è stata esaminata tramite tecnica di *saturation binding* e mediante la misurazione dei livelli di cAMP. I risultati ottenuti ci consentono di affermare che: 1) in corso di AR si verifica un aumento della espressione dei recettori A<sub>2A</sub> and A<sub>3</sub>; 2) a tale aumento della espressione corrisponde una riduzione della affinità di legame ma un aumento della potenza recettoriale; 3) il trattamento con MTX determina una sovra-regolazione della espressione di tali recettori, la cui entità risulta comunque sovrapponibile a quanto rilevato nei soggetti mai trattati; 4) il trattamento con farmaci anti-TNF $\alpha$  determina un "reset" di tutte le alterazioni osservate, ovvero densità, affinità ed espressione; 5) i recettori A<sub>1</sub> e A<sub>2B</sub> non sembrano coinvolti nel processo flogistico dell'AR. I nostri dati, pertanto, confermano quanto già evidenziato da Ochaion et al., i quali evidenziavano un incremento della espressione di A<sub>3</sub> nei mononucleati di pazienti affetti da AR i trattamento con MTX a confronto con i controlli sani (91). Anche i nostri dati, tramite analisi densitometrica e di *western blotting*, hanno evidenziato un aumento della espressione di A<sub>2A</sub> e A<sub>3</sub> sui linfociti e neutrofili dei pazienti con AR, sia prima che dopo trattamento con MTX.

Inoltre, misurando le variazioni nella concentrazione di cAMP a seguito della interazione con agonisti specifici (NECA e CI-IB-MECA), abbiamo evidenziato come a tale aumento della espressione corrisponda un incremento della potenza recettoriale. Tale aspetto è stato constatato nei pazienti affetti da AR prima e dopo terapia con MTX, ma non nel gruppo trattato con antagonisti del TNF $\alpha$ .

Inoltre, la misurazione plasmatici dei livelli di adenosina e dei suoi metaboliti ha evidenziato un incremento significativo di tale sostanza nel plasma dei pazienti con



AR a confronto con i controlli sani. Questo aspetto può in parte giustificare i dati relativi alla riduzione della affinità che abbiamo evidenziato, dal momento in cui alcuni studi in vitro hanno evidenziato che una prolungata esposizione all'adenosina causa una ridotta sensibilità alla stessa nella cellule bersaglio (105). Pertanto si può ipotizzare che il corso di AR lo stato flogistico cronico comporti un persistente aumento dei livelli di adenosina la quale si rende responsabile della ridotta affinità dei recettori  $A_{2A}$  e  $A_3$ , che risulterebbero parzialmente de-sensibilizzati. Di conseguenza, la sovra-espressione di tali recettori può anche essere interpretata alla stregua di un potenziale meccanismo di compensazione a tale de-sensibilizzazione.

Negli ultimi anni il ruolo del fattore di trascrizione NF- $\kappa$ B nelle malattie infiammatorie croniche è stato oggetto di numerosi studi. E' noto che in corso di AR la sovra-espressione del TNF $\alpha$  e di altre citochine pro-infiammatorie sia regolata proprio da NF- $\kappa$ B (106). In particolare, il "concetto" di NF- $\kappa$ B implica l'esistenza di proteine omo ed etero-dimeriche comprendenti varie subunità, codificate da una famiglia di geni correlati al proto-oncogene *c-rel*. In particolare, numerosi studi hanno evidenziato che in corso di AR sia particolarmente attivo l'etero-dimero comprendente le subunità p50 e p65 (106). Di conseguenza, NF- $\kappa$ B è attualmente considerato un obiettivo terapeutico "ideale" in corso di AR. Inoltre, uno studio condotto su monociti di pazienti affetti da AR ha evidenziato come l'attivazione di NF- $\kappa$ B sia mediata primariamente dall'aumento dei livelli di TNF $\alpha$  (107). Infatti, il pre-trattamento *ex vivo* dei monociti con un anticorpo monoclonale anti-TNF $\alpha$  determinava una significativa riduzione della attivazione di NF $\kappa$ B (107). Questi dati sono stati confermati indirettamente dai nostri risultati, in quanto gli elevati livelli di TNF- $\alpha$  presenti nei pazienti con AR (e persistenti anche dopo trattamento con MTX) si associano ad una sovra-regolazione della espressione dei recettori  $A_{2A}$  e  $A_3$ , probabilmente mediata dall'aumento dell'attività di NF- $\kappa$ B. Al contrario, nei pazienti trattati continuativamente con antagonisti del TNF $\alpha$  i bassi livelli di tale citochina si traducono in una riduzione dell'attività di NF- $\kappa$ B ed una ridotta densità dei recettori  $A_{2A}$  e  $A_3$ . Se tale *resetting* indotto dai farmaci anti-TNF $\alpha$  possa avere un significato clinico predittivo non è noto, non avendo noi eseguito una stratificazione dei pazienti tra *responder* e *non-responder* alle terapie, e può rappresentare un utile spunto per valutazioni future.

Nell'AR una diagnosi precoce ed un trattamento tempestivo con DMARDs rappresentano un aspetto fondamentale che è in grado di condizionare in maniera significativa la prognosi dei pazienti. Pertanto, la sovra-regolazione dei recettori  $A_{2A}$  e  $A_3$  potrebbe assumere anche un significato diagnostico, come suggerito da Fishman et al. (86), i quali hanno considerato tale alterazione recettoriale come un possibile *bio-marker* di malattia. Tuttavia noi riteniamo che non essendo stati testati in altri modelli di malattia infiammatoria cronica (es. artrite psoriasica, polimialgia reumatica, morbo di Crohn), tale affermazione debba essere sottoposta al vaglio di ulteriori evidenze sperimentali.

In conclusione, i nostri dati confermano il coinvolgimento dell'adenosina e dei suoi recettori in un modello di patologia infiammatoria cronica immuno-mediata come l'artrite reumatoide.

In più, il MTX ed i farmaci anti-TNF $\alpha$  determinano alterazioni opposte nella espressione e nella funzionalità dei recettori  $A_{2A}$  e  $A_3$ , e tale differenza sembra essere in relazione con la diminuita attivazione di NFkB indotta dai farmaci anti-TNF $\alpha$ .

## CONCLUSIONI

I nostri dati confermano il coinvolgimento dei recettori dell'adenosina A<sub>2A</sub> e A<sub>3</sub> nel processo flogistico della malattia reumatoide. Viene confermato inoltre l'effetto favorente del methotrexate sulla espressione degli stessi recettori, il che rappresenta un potenziale favorevole sinergismo in caso di future terapie con gli agonisti dell'adenosina (in particolare del recettore A<sub>3</sub>). Alla luce delle attuali conoscenze, il nostro è il primo studio ad avere indagato la espressione dei recettori dell'adenosina nei pazienti cronicamente trattati con gli antagonisti del TNF $\alpha$ , i quali determinano un *resetting* di tale espressione verosimilmente connessa con la ridotta attivazione del fattore di trascrizione NF $\kappa$ B. Ulteriori studi sono necessari per confermare tale dato in relazione alla presenza o meno della risposta clinica.

**Tabella 4.** Parametri clinici (A) dei pazienti arruolati nello studio e trattamento farmacologico (B) impiegato.

**Legenda:**

	<b>Controlli sani</b>	<b>AR non trattati</b>	<b>AR MTX-trattati</b>	<b>AR anti-TNF<math>\alpha</math>-trattati</b>
	<b>(n = 30)</b>	<b>(n = 20)</b>	<b>(n = 23)</b>	<b>(n = 13)</b>
<b>A: Parametri clinici</b>				
F/M	16/14	18/2	18/5	8/5
Età, anni	54.6 $\pm$ 6.5	52.7 $\pm$ 2.8	56.6 $\pm$ 11.8	52.9 $\pm$ 3.1
Durata di malattia (mesi)	-	10.9 $\pm$ 3.1	67.5 $\pm$ 14.1	107.36 $\pm$ 88.5
Preced. DMARDs, N°	-	0	2 (range 1-4)	3 (range 1-7)
Fattore Reumatoide, N°(%)	-	6 (30%)	13 (57%)	10 (73%)
Anti-CCP, N°(%)	-	8 (40%)	10 (43%)	7 (55%)
DAS (baseline)	-	3.5 $\pm$ 0.2	3.8 $\pm$ 0.8	4.6 $\pm$ 0.6
HAQ (baseline)	-	0.5 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.1	1.8 $\pm$ 0.6
<b>B: Terapia N (%)</b>				
Methotrexate (10-15 mg weekly)	-	-	23 (100%)	9 (82%)
Hydroxichloroquine (200 mg/daily)	-	-	18(78%)	3 (27%)
Low dose steroids (4 mg/daily)	-	-	20(87%)	10 (91%)
Infliximab (3-5 mg/6-8 weeks)	-	-	-	9 (82%)
Adalimumab (40 mg/weekly)	-	-	-	2 (18%)

DMARDs disease-modifying antirheumatic drugs; anti-CCP: anticorpi anti-peptide ciclico citrullinato; DAS: disease activity score; HAQ: healthy assessment questionnaire.

**Tabella 5.** Parametri di binding dei recettori dell'adenosina nei linfociti e neutrofilii dei pazienti con AR e nei controlli sani.

LINFOCITI	[ <sup>3</sup> H]-DPCPX A <sub>1</sub> R	[ <sup>3</sup> H]-ZM 241385 A <sub>2A</sub> R	[ <sup>3</sup> H]-MRE2029F20 A <sub>2B</sub> R	[ <sup>3</sup> H]-MRE3008F20 A <sub>3</sub> R
<b>Controlli</b> n= 30	K <sub>D</sub> =1.65 ±0.12 nM Bmax = 35±4 fmol/mg protein	K <sub>D</sub> = 1.26±0.11 nM Bmax = 55±6 fmol/mg protein	K <sub>D</sub> = 2.12±0.23 nM Bmax = 52±5 fmol/mg protein	K <sub>D</sub> = 1.78±0.16 nM Bmax = 135±12 fmol/mg protein
<b>AR non</b> <b>trattati</b> n=20	K <sub>D</sub> = 1.70±0.04 nM Bmax = 33±2 fmol/mg protein n=12	K <sub>D</sub> =2.00 ±0.15* nM Bmax =163±11* fmol/mg protein n=18; *, p<0.01	K <sub>D</sub> = 2.33±0.10 nM Bmax = 53±2 fmol/mg protein n=12	K <sub>D</sub> = 3.10±0.10*nM Bmax = 270±10* fmol/mg protein n=16; *, p<0.01
<b>AR MTX-</b> <b>trattati</b> n=23	K <sub>D</sub> = 1.57±0.07 nM Bmax =34±2 fmol/mg protein n=10	K <sub>D</sub> =1.72±0.12* nM Bmax =178±16* fmol/mg protein n=18; *, p<0.01	K <sub>D</sub> = 2.22±0.08 nM Bmax = 56±3 fmol/mg protein n=10	K <sub>D</sub> =3.53±0.28* nM Bmax =297±13* fmol/mg protein n=18; *, p<0.01
<b>AR anti-</b> <b>TNFα</b> <b>trattati</b> n=13	K <sub>D</sub> = 1.63±0.08 nM Bmax = 36±2 fmol/mg protein n=8	K <sub>D</sub> =1.39±0.06 nM Bmax = 53±3 fmol/mg protein n=10	K <sub>D</sub> = 2.30±0.11 nM Bmax = 50±2 fmol/mg protein n=8	K <sub>D</sub> = 1.93± 0.19 nM Bmax =129± 8 fmol/mg protein n=10
NEUTROFI LI	[ <sup>3</sup> H]-DPCPX A <sub>1</sub> R	[ <sup>3</sup> H]-ZM 241385 A <sub>2A</sub> R	[ <sup>3</sup> H]-MRE2029F20 A <sub>2B</sub> R	[ <sup>3</sup> H]-MRE3008F20 A <sub>3</sub> R
<b>Controlli</b> n= 30	K <sub>D</sub> =1.72±0.18 nM Bmax = 32±3 fmol/mg protein	K <sub>D</sub> = 1.32±0.10 nM Bmax = 70±6 fmol/mg protein	K <sub>D</sub> = 2.42±0.21 nM Bmax = 77±8 fmol/mg protein	K <sub>D</sub> = 2.37±0.25 nM Bmax = 462±32 fmol/mg protein
<b>AR non</b> <b>trattati</b> n=20	K <sub>D</sub> =1.79±0.08 nM Bmax = 31±3 fmol/mg protein n=10	K <sub>D</sub> =2.03±0.13* nM Bmax =152±10* fmol/mg protein n=16; *, p<0.01	K <sub>D</sub> =2.68±0.11 nM Bmax =75±4 fmol/mg protein n=10	K <sub>D</sub> =3.08±0.16* nM Bmax =680±37* fmol/mg protein n=16; *, p<0.01
<b>AR MTX-</b> <b>trattati</b> n=23	K <sub>D</sub> =1.84±0.06 nM Bmax = 31±2 fmol/mg protein n=10	K <sub>D</sub> =2.18 ±0.17* nM Bmax =163±12* fmol/mg protein n=18; *, p<0.01	K <sub>D</sub> = 2.27±0.11 nM Bmax =76±3 fmol/mg protein n=10	K <sub>D</sub> = 3.21±0.27*nM Bmax = 715±41* fmol/mg protein n=18; *, p<0.01
<b>AR anti-</b> <b>TNFα</b> <b>trattati</b> n=13	K <sub>D</sub> =1.62±0.11 nM Bmax = 33±2 fmol/mg protein n=8	K <sub>D</sub> =1.37±0.10 nM Bmax = 68±4 fmol/mg protein n=10	K <sub>D</sub> = 2.43±0.17 nM Bmax =74±5 fmol/mg protein n=8	K <sub>D</sub> = 2.14± 0.23 nM Bmax = 451± 25 fmol/mg protein n=10

I risultati sono espressi come media ± SEM. Le differenze sono state considerate significative per valori di p<0.01 vs controlli.

## Legenda delle figure.

**Figura 6** – Curve di saturazione del legame di [<sup>3</sup>H]-ZM 241385 al recettore A<sub>2A</sub> e grafico Scatchard dei linfociti (A) e neutrofili (B) dei soggetti esaminati. Curve di saturazione del legame di [<sup>3</sup>H]-MRE 3008F20 al recettore A<sub>3</sub> e grafico Scatchard dei linfociti (C) e neutrofili (D) dei soggetti esaminati [controlli, n=30; AR non trattati, n=20; AR MTX-trattati RA, n=23; AR anti-TNF $\alpha$  trattati, n=13]. I risultati sono riportati nella tabella 2 come media  $\pm$  SEM. I valori di *P* sono determinati con il test di Dunnett (\*, *p*<0.01 vs i controlli).

**Figura 7** – Densità dei recettori dell'adenosina espressa come Mmax (fmol/mg proteina) nei linfociti (A) e neutrofili (B) dei soggetti esaminati [controlli, n=30; AR non trattati, n=20; AR MTX-trattati RA, n=23; AR anti-TNF $\alpha$  trattati, n=13]. I risultati sono riportati nella tabella 2 come media  $\pm$  SEM. I valori di *P* sono determinati con il test di Dunnett (\*, *p*<0.01 vs i controlli).

Analisi di Western blotting che evidenzia il segnale di immunoblot dei recettori A<sub>2A</sub> e A<sub>3</sub> nei linfociti dei controlli sani (n=3, A, A', A''); AR non trattati (n=3, B, B', B'') AR anti-TNF $\alpha$  trattati (n=3, C, C', C''); AR MTX-trattati RA (n=3, D, D', D'') e analisi densitometrica dei recettori A<sub>2A</sub> e A<sub>3</sub>(D,E).

**Figura 8** – Curve concentrazione-risposta dell'effetto di NECA sulla produzione di cAMP nei linfociti (A) e neutrofili (C) dei soggetti in esame. Curve concentrazione-risposta dell'effetto di Cl-IB-MECA sulla produzione di cAMP nei linfociti (B) e neutrofili (D) dei soggetti in esame. (E) Potenza di NECA e Cl-IB-MECA espressa come valori EC<sub>50</sub> o IC<sub>50</sub> (nM) sui linfociti e neutrofili dei soggetti in esame [controlli, n = 12; AR non trattati, n = 10; AR MTX-trattati

RA, n = 11; AR anti-TNF $\alpha$  trattati, n = 8]. I risultati sono riportati nella tabella 2 come media  $\pm$  SEM. I valori di *P* sono determinati con il test di Dunnett (\*,  $p < 0.01$  vs i controlli).

**Figura 9** – Concentrazioni di adenosina, inosina e ipoxantina (A) nel plasma dei controlli (n = 6), pazienti AR non trattati (n = 6), anti-TNF $\alpha$  trattati (n = 6), MTX-trattati (n = 6). Livelli plasmatici di TNF $\alpha$  (B) nei controlli (n = 8), pazienti AR non trattati (n = 8), anti-TNF $\alpha$  trattati (n = 6), MTX-trattati (n = 6). Attivazione di NF $\kappa$ B (p65) nei linfociti (C), neutrofili (D) e attivazione di NF $\kappa$ B (p50) nei linfociti (E), neutrofili (F) dei controlli (n = 8), pazienti AR non trattati (n = 7), anti-TNF $\alpha$  trattati (n = 7), MTX-trattati (n = 8). I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM. I valori di *P* sono determinati con il test di Dunnett (\*,  $p < 0.01$  vs controlli; \*\*,  $p < 0.01$  vs i pazienti).

**Figura 6**

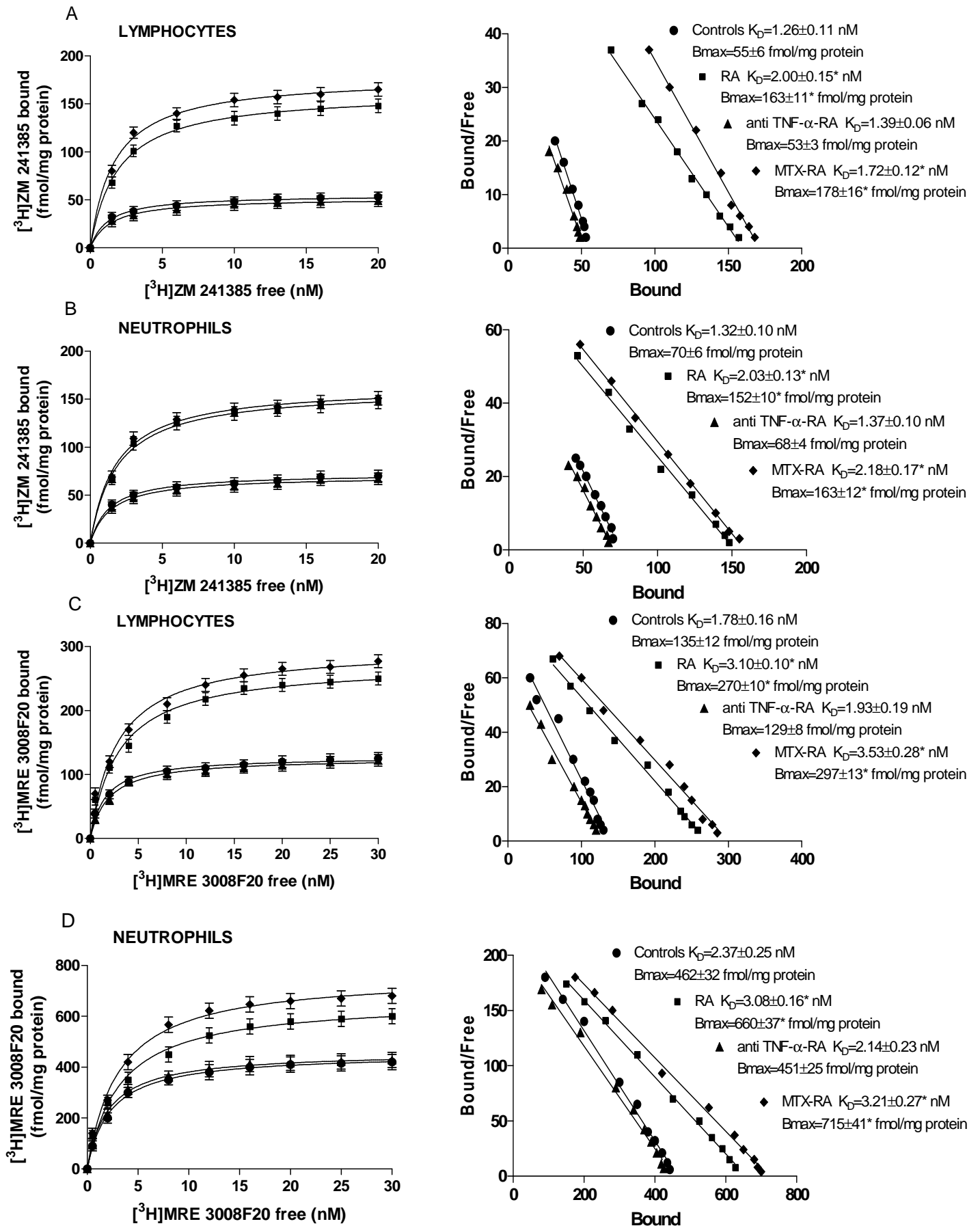




Figura 7

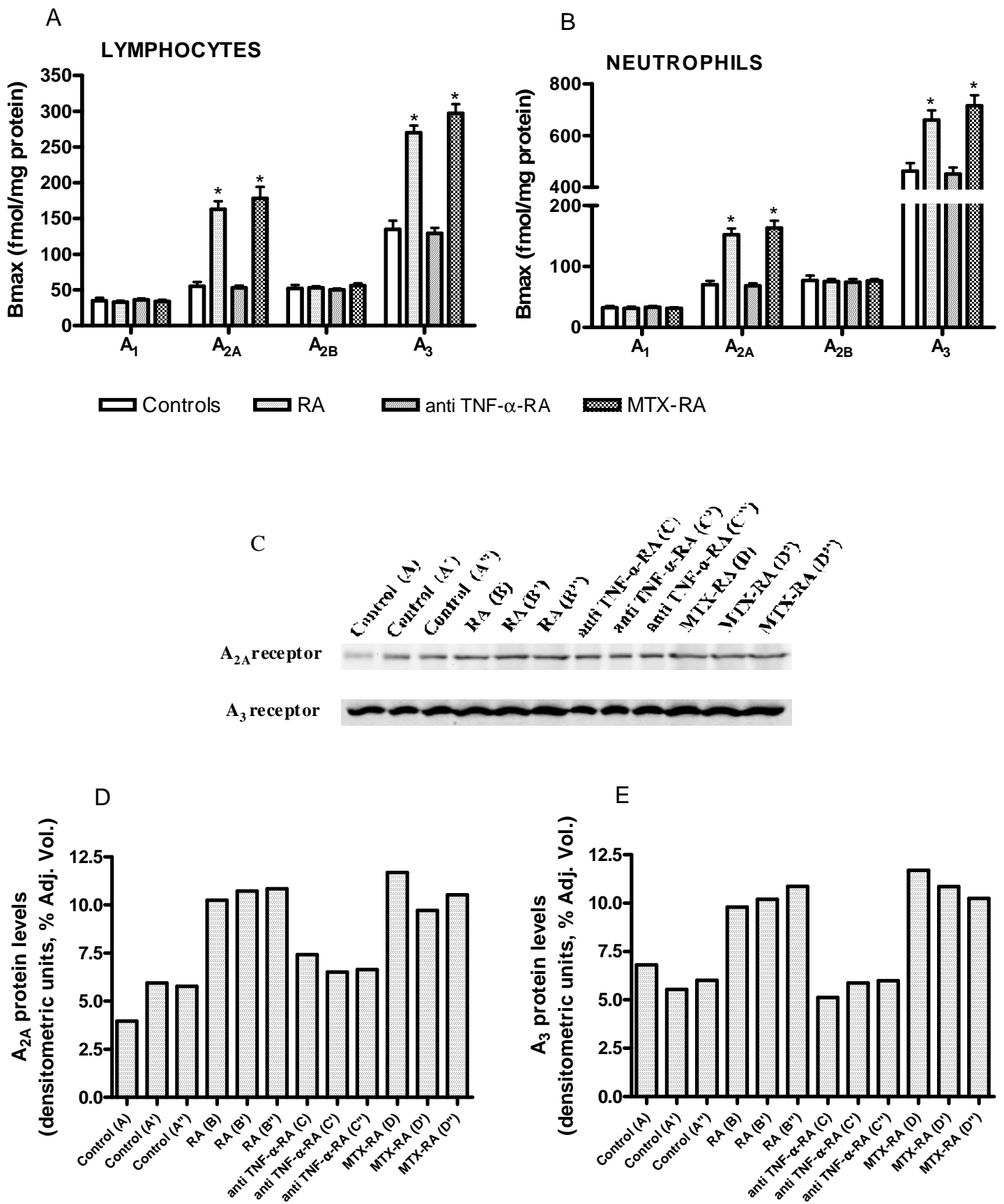
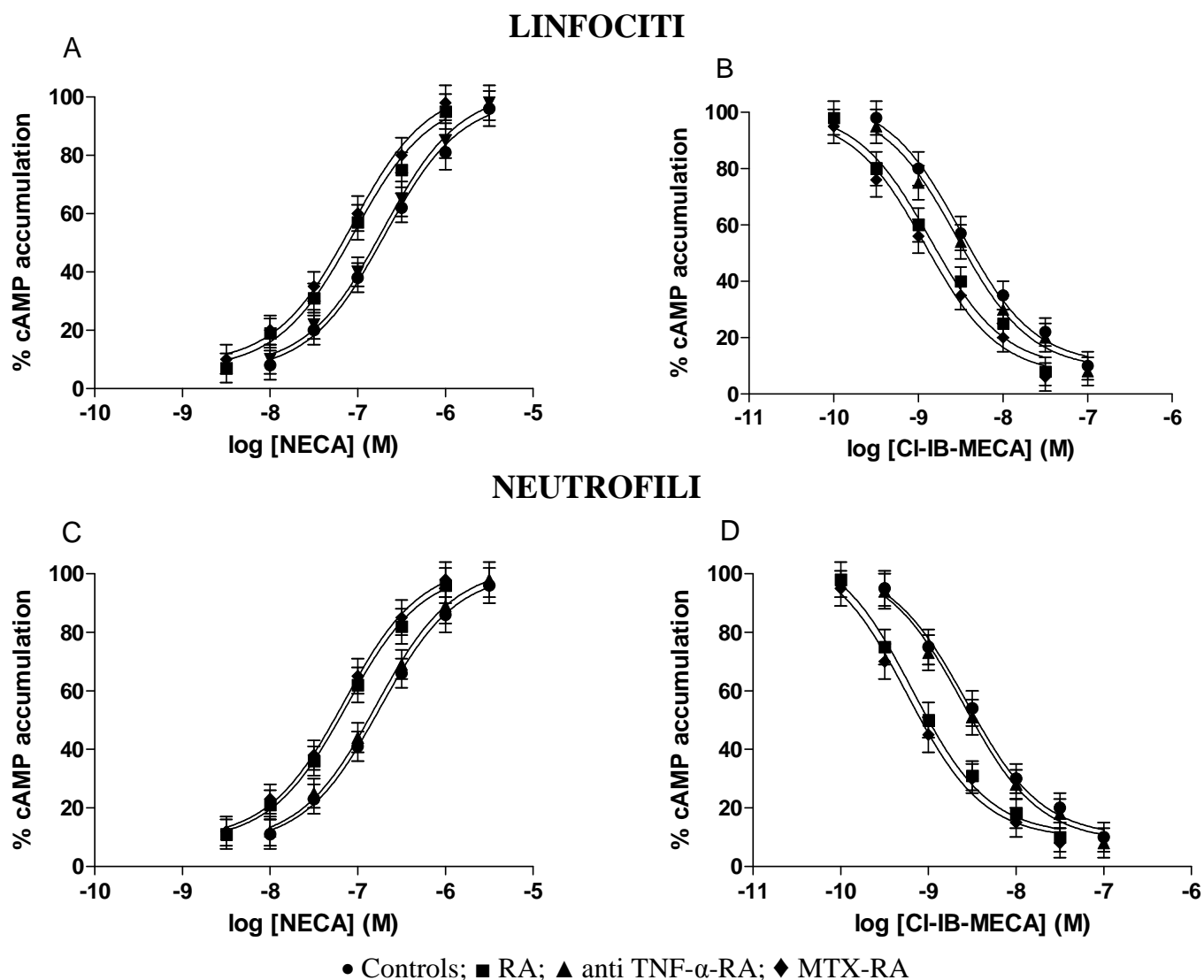


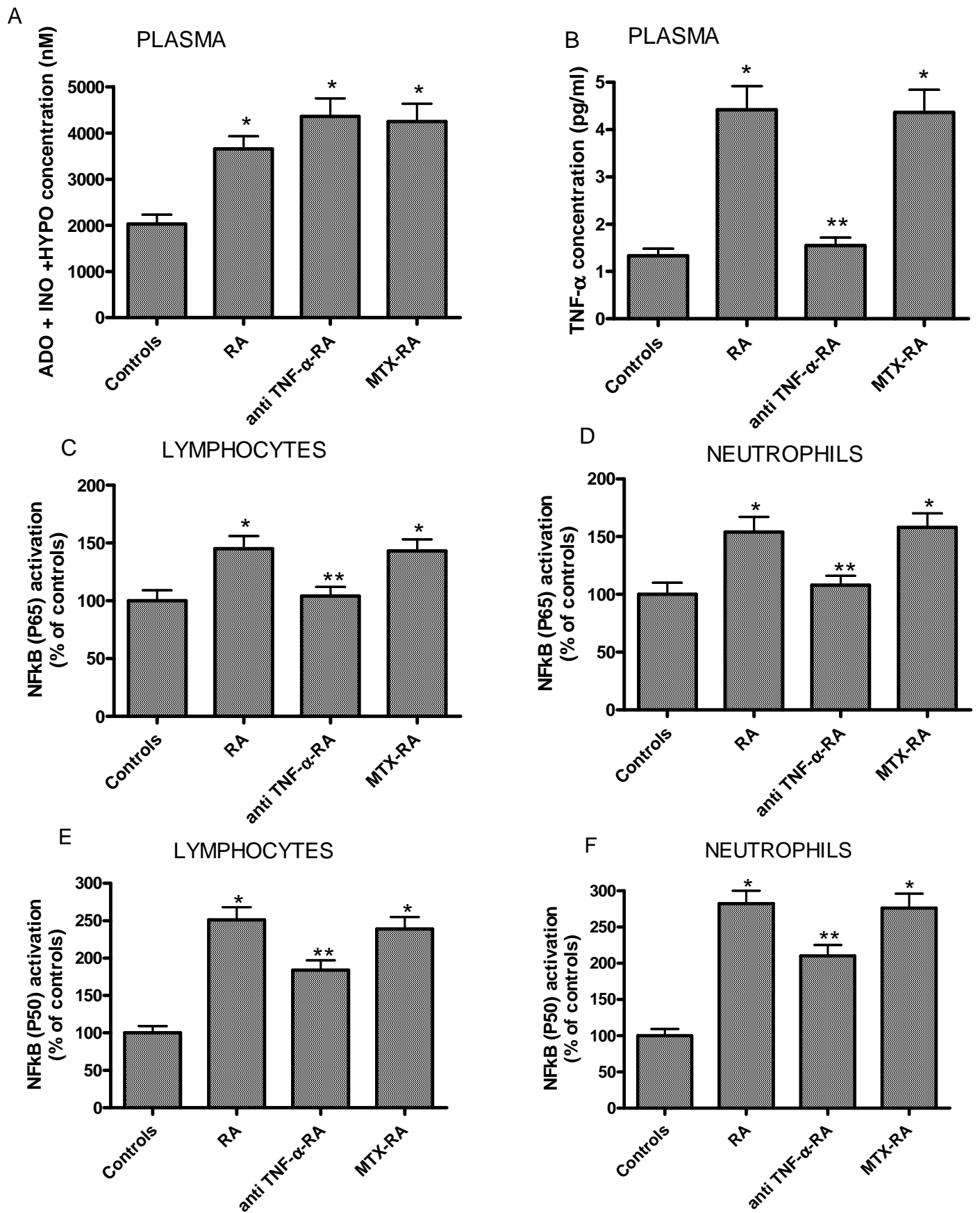
Figura 8



**E – Potenza degli agonisti A<sub>2A</sub> e A<sub>3</sub> nei soggetti in esame.**

	<b>LINFOCITI</b>		<b>NEUTROFILI</b>	
	NECA EC <sub>50</sub> (nM)	CI-IB-MECA IC <sub>50</sub> (nM)	NECA EC <sub>50</sub> (nM)	CI-IB-MECA IC <sub>50</sub> (nM)
Controlli n= 12	210±18	3.0 ± 0.3	175±15	2.7 ± 0.2
AR non trattati N=10	90±8*	1.3 ± 0.1*	74±6*	1.1 ± 0.1*
AR MTX- trattati N=11	85±8*	1.2 ± 0.1*	70±6*	1.0 ± 0.1*
AR anti-TNF $\alpha$ trattati N=8	195±16	2.9 ± 0.3	163±14	2.6 ± 0.2

Figura 9



## BIBLIOGRAFIA

1. Todesco S, Gambari PF. *Malattie Reumatiche*. Mc Graw-Hill 2002.
2. Cimmino MA, Parisi M, Moggiana G, Mela GS, Accardo S. Prevalence of rheumatoid arthritis in Italy: the Chiavari study. *Ann Rheum Dis* 1998. **57**:315-318.
3. Pincus T, Callahan LF. What is the natural history of rheumatoid arthritis? *Rheum Dis Clin North Am* 1993; 19: 123-51.
4. Guedes C, Dumont-Fischer D, Leichter-Nakache S, Boissier MC; Mortality in rheumatoid arthritis. *Rev Rhum Engl Ed*. 1999; 66: 492-8.
5. Varesini G, Barone F, Bompane D, Catuogno M, Sili Scavalli A. La patogenesi dell'artrite reumatoide alla luce degli sviluppi delle conoscenze in immunologia; *Advances in immunology and rheumatoid arthritis pathogenesis*. *Reumatismo*, 2004; 1 (Suppl. 1):9-20.
6. Carotti M, Salaffi F, Manganelli P, Salvolini L, Bichi Secchi E, De Bernardinis S. L'interessamento polmonare sub-clinico nell'artrite reumatoide: studio mediante tomografia ad alta risoluzione. *Reumatismo* 2001; 53: 280-8.
7. Dhawan SS, Ouyyumi AA. Rheumatoid arthritis and cardiovascular disease. *Curr Atheroscler Rep* 2008 10:128-33.
8. Maradit-Kremers H, Nicola PJ, Crowson CS, Ballman KV, Gabriel SE; Cardiovascular death in rheumatoid arthritis: a population-based study. *Arthritis Rheum*. 2005; 52:722-32.
9. Nishimura K, Sugiyama D, Kogata Y, Tsuji G; Nakazawa T, Kawano S, Saigo K, Morinobu A, Koshiha M, Kuntz KM, Kamae I, Kumagai S. Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med* 2007; 146:797-808.
10. Larsen A, Dale K, Eek M. Radiographic evaluation of rheumatoid arthritis and related conditions by standard reference films. *Acta Radiol Diagn (Stockh)*. 1977; 18:481-91

11. Sharp JT, Young DY, Bluhm GB, Brook A, Brower AC. How many joints in the hands and wrists should be included in a score of radiologic abnormalities used to assess rheumatoid arthritis? *Arthritis Rheum* 1985; 28:1326-35.
12. Wakefield R, Gibbon WW, Conaghan PG, O'Connor P, McGonagle D, Pease C et al. The value of sonography in the detection of bone erosions in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 12: 2762-27.
13. McQueen FM. Magnetic resonance imaging in early inflammatory arthritis: what is its role? *Rheumatology* 2000; 39: 700-6.
14. Scutellari PN, Orzincolo C, Feggi LM, Delli Gatti I, Prandini N, Trotta F. Value and limitations of scintigraphy of the hand in rheumatoid arthritis. *Minerva Med* 1985;76: 2213-8.
15. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; 31:315-24.
16. Padovan M, Govoni M, Trotta F. La semeiotica delle "early arthritis". *Reumatismo* 2003; 55: 187-194
17. Fries J, Williams CA, Morfeld D, Singh G, Sibley J. Reduction in long-term disability in patients with rheumatoid arthritis by disease-modifying antirheumatic drug-based treatment strategies. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 616-22.
18. Quinn MA, Emery P. Window of opportunity in early rheumatoid arthritis: possibility of altering the disease process with early intervention. *Clin Exp Rheumatol* 2003; 21 (5 Suppl 31): S154-7.
19. Visser H, le Cessie S, Vos K, Breedveld F, Hazes J. How to diagnose rheumatoid arthritis early. A prediction model for persistent (erosive) arthritis. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 357-65.
20. Emery P, Breedveld FC, Dougados M, Kalden JR, Schiff MH, Smolen JS. Early referral recommendation for newly diagnosed rheumatoid arthritis: evidence based development of a clinical guide. *Ann Rheum Dis* 2002; 61:290-7.
21. Atzeni F, Sarzi-Puttini P. Early rheumatoid arthritis. *Reumatismo* 2007; 59:100-117.

22. Barrett EM, Scott DG, Wiles NJ, Symmons DP. The impact of rheumatoid arthritis on employment status in the early years of disease: a UK community-based study. *Rheumatology (Oxford)* 2000; 39: 1403-9.
23. Salaffi F, Stancati A. Disability and quality of life of patients with rheumatoid arthritis: assessment and perspectives. *Reumatismo* 2004; 56 (Suppl. 1):87-106.
24. Bortolotti R, Noro G. Rheumatoid arthritis in the elderly. *G Gerontol* 2004; 52:539-546.
25. Combe B, Landewe R, Lukas C, Bolosiu HD, Breedveld F, Dougados M, et al. EULAR recommendations for the management of early arthritis: report of a task force of the European Standing Committee for the International clinical Studies Including Therapeutics (ESCISIT). *Ann Rheum Dis* 2007; 66:34-45.
26. American College of Rheumatology Subcommittee on Rheumatoid Arthritis Guidelines. Guidelines for the management of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 328-46.
27. Fiocco U, Bombardieri S. Differences in pharmacology of tumor necrosis factor (TNF) antagonists. *Reumatismo*, 2005; 57 (Suppl. 1):8-16.
28. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Immunologia cellulare e molecolare*. Piccin 2002.
29. van Vollenhoven RF. Switching between biological agents. *Clin Exp Rheumatol* 2004; 22 (5 Suppl 35): S115-21.
30. Scallon BJ, Cai A, Solowski N, Rosenberg A, Song XY, Shealy D et al. Binding and functional comparisons of two types of tumor necrosis factor antagonists. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 301: 418-26.
31. Kempeni J. Update on D2E7: A fully human anti-tumour necrosis factor monoclonal antibody. *Ann Rheum Dis* 2000; 59 (Suppl 1): i44-i45.
32. Doran MF, Crowson CS, Pond GR, O'Fallon WM, Gabriel SE. Frequency of infections in patients with RA compared with controls: a population-based study. *Arthritis Rheum* 2002; 46:2287-93.
33. Kaneko H, Yamada H, Mizuno S, Udagawa T, Kazumi Y, Sekikawa K et al. Role of tumor necrosis factor alpha in Mycobacterium-induced granuloma formation in tumor necrosis factor-alpha-deficient mice. *Lab Invest* 1999; 79: 379-86.

34. Trotta F, Valentini G. Safety of anti-TNF $\alpha$  biological drugs. *Reumatismo* 2005; 57 (Suppl. 1):34-39.
35. Ellerin T, Rubin RH, Weinblatt ME. Infections and anti-tumor necrosis factor alpha therapy. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 3013-22.
36. Baghai M, Osmon DR, Wolk DM, Wold LE, Haidukewych GJ, Matteson EL. Fatal sepsis in a patient with rheumatoid arthritis treated with etanercept. *Mayo Clin Proc* 2001; 76: 653-6.
37. Magnano MD, Robinson WH, Genovese MC. Demyelination and inhibition of tumor necrosis factor (TNF). *Clin Exp Rheumatol* 2004; 22 (Suppl 35): S134-40.
38. Eriksson C, Engstrand S, Sundqvist KG, Rantapää-Dalqvist S. Autoantibody formation in patients with rheumatoid arthritis treated with anti-TNF-alpha therapy. *Ann Rheum Dis* 2005; 64:403-7.
39. Favalli EG, Sinigaglia L, Varenna M, Arnoldi C. Drug induced lupus following treatment with infliximab in rheumatoid arthritis. *Lupus* 2002; 11: 753-5.
40. Beuthien W, Mellinshoff HU, von Kempis J. Skin reaction to adalimumab. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 1690-2.
41. Chung ES, Packer M, Lo KH, Fasanmade AA, Willerson JT. Randomized, double-blind, placebo-controlled, pilot trial of infliximab, a chimeric monoclonal antibody to tumor necrosis factor-alpha, in patients with moderate to severe heart failure: results of the anti-TNF Therapy Against Congestive Heart Failure (ATTACH) trial. *Circulation* 2003; 107: 3133-40.
42. Dunwiddie TV, Diao L, Proctor WR. Adenine nucleotides undergo rapid, quantitative conversion to adenosine in the extracellular space in rat hippocampus. *The Journal of neuroscience: the official journal of the society for neuroscience.* 1997; 17:7673-7682.
43. Porkka-Heiskanen T, Strecker RE, Thakkar M, Bjorkum AA, Greene RW, Mccarley RW. Adenosine: a mediator of the sleep-inducing effects of prolonged wakefulness. *Science* 1997; 76:1265-1268.
44. Brown RA, SpinA DE, Page CP. Adenosine receptors and asthma. *British journal of pharmacology.* 2008; 153:S446-S456.

45. Klaasse EC, Ijzerman AP, De Grip WJ, Beukers MW. Internalization and desensitization of adenosine receptor. *Purinergic signalling* 2007; 4:21-37.
46. Baraldi P, Tabrizi M, Gessi S, Borea PA. (2008). Adenosine receptor antagonists: translating medicinal chemistry and pharmacology into clinical utility. *J Chem Rev* 2008; 108:238-63.
47. Tarditi A, Camurri A, Varani K, Borea PA, Woodman B, Bates G, Cattaneo E, Abbracchio MP. Early and transient alteration of Adenosine A<sub>2A</sub> receptor signalling in a mouse model of Huntington disease. *Neurobiology disease* 2006; 23:44-53.
48. Varani K, Caramori G, Vincenzi F, Adcock I, Casolari P, Leung E, MacLennan S, Gessi S, Morello S, Barnes Pj, Ito K, Chung Kf, Cavallesco G, Azzena G, Papi A, Borea Pa. (2006). Alteration of adenosine receptors in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2006; 173:398-406.
49. Varani K, De Mattei M, Vincenzi F, Gessi S, Merighi S, Pellati A, Ongaro A, Caruso A, Cadossi R, Borea PA. Characterization of adenosine receptors in bovine chondrocytes and fibroblast-like synoviocytes exposed to low frequency low energy pulsed electromagnetic fields. *Osteoarthritis cartilage* 2008; 16:292-304.
50. Baraldi PG, Tabrizi MA, Gessi S, Borea PA. Adenosine receptor antagonists: translating medicinal chemistry and pharmacology into clinical utility. *J Chem Rev* 2008; 108:238-63.
51. Gessi S, Merighi S, Varani K, Leung E, Mac Lennan S, Borea PA. The A<sub>3</sub> adenosine receptor: An enigmatic player in cell biology. *Pharmacology & therapeutics*. 2008; 117:123–140.
52. Gessi S, Cattabriga E, Avitabile A, Gafa' R, Lanza G, Cavazzini L, Bianchi N, Gambari R, Feo C, Liboni A, Gullini S, Leung E, Mac-Lennan S, Borea PA. Elevated expression of A<sub>3</sub> adenosine receptors in human colorectal cancer is reflected in peripheral blood cells. *Clinical cancer research: an official journal of the American association for cancer research*. 2004; 10:5895-5901.
53. Linden J. Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2001; 41:775-787.



54. Fredholm BB, Chern Y, Franco R, Sitkovsky M. Aspects of the general biology of Adenosine A<sub>2A</sub> signalling. *Progress in neurobiology*. 2007; 83: 263-276.
55. Choukèr A, Thiel M, Lukashev D, Ward Jm, Kaufmann I, Apasov S, Sitkovsky Mv, Ohta A. Critical role of Hypoxia and A<sub>2A</sub> adenosine receptors in liver tissue-protecting physiological anti-inflammatory pathway. 2008; *Molecular medicine* 2008; 14:116-23.
56. Abbracchio MP, Cattabeni F. Brain adenosine receptors as target for therapeutic intervention in neurodegenerative diseases. *Annals of the New York academy of sciences* 1999; 890:79-92.
57. Ribeiro JA. What can adenosine neuromodulation do for neuroprotection? Current drug targets. *CNS and neurological disorders*. 2005; 4:325-329.
58. Moreau JL, Huber G. (1999). Central adenosine A<sub>2A</sub> receptor: an overview. *Brain research reviews* 1999; 31:65-82.
59. Yildirim M, Marangoz C. Anticonvulsivant effects of focal and intracerebroventricular adenosine on penicillin-induced epileptiform activity in rats. *Brain research* 2007; 1127:193-200.
60. Schwarzschild MA, Agnati L, Fuxe K, Chen Jf, Morelli M. Targeting adenosine A<sub>2A</sub> receptors in Parkinson's disease. *Trends in neurosciences* 2006; 29:647-654.
61. Mubagwa K, Flameng W. (2001). Adenosine receptors and myocardial protection: an updated overview. *Cardiovascular research*. 2001; 52:25-39.
62. Polosa R, Holgate St. Adenosine receptors as promising therapeutic targets for drug development in chronic airway inflammation. *Current drug targets*. 2006; 7:699-706.
63. Spicuzza L, Bonfiglio C, Polosa R. Reserch applications and implications of adenosine in diseased airways. *Trends in pharmacological sciences*. 2003; 24:409-413.
64. Hasko G, Cronstein BN. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends in immunology*. 2004; 25:33-39.
65. Smith Sr, Denhardt G, Terminelli C. A role for histamine in cytokine modulation by the adenosine A<sub>3</sub> receptor agonist, 2-Cl-IB-MECA. *European journal of pharmacology* 2002; 457:57-69.

66. Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 2003;423:356-61.
67. Shaver TS, Anderson JD, Weidensaul DN, Shahouri SS, Busch RE, Mikuls TR, et al. The problem of rheumatoid arthritis disease activity and remission in clinical practice. *J Rheumatol* 2008;35:1015-22.
68. Visser K, van der Heijde D. Optimal dosage and route of administration of methotrexate in rheumatoid arthritis: a systematic review of the literature. *Ann Rheum Dis* 2008; in press.
69. Cronstein BN. Low-dose methotrexate: a mainstay in the treatment of rheumatoid arthritis. *Pharmacol Rev* 2005;57:163-72.
70. Ackermann C, Kavanaugh A. Tumor necrosis factor as a therapeutic target of rheumatologic disease. *Expert Opin Ther Targets* 2007;11:1369-84.
71. Caporali R, Pallavicini FB, Filippini M, Gorla R, Marchesoni A, Favalli EG, et al. Treatment of rheumatoid arthritis with anti-TNF-alpha agents: A reappraisal. *Autoimmun Rev* 2008 in press.
72. Breedveld FC, Weisman MH, Kavanaugh AF, Cohen SB, Pavelka K, van Vollenhoven R, et al. The PREMIER study: A multicenter, randomized, double-blind clinical trial of combination therapy with adalimumab plus methotrexate versus methotrexate alone or adalimumab alone in patients with early, aggressive rheumatoid arthritis who had not had previous methotrexate treatment. *Arthritis Rheum* 2006;54:26-37.
73. van der Heijde D, Klareskog L, Rodriguez-Valverde V, Codreanu C, Bolosiu H, Melo-Gomes J, et al. TEMPO Study Investigators. Comparison of etanercept and methotrexate, alone and combined, in the treatment of rheumatoid arthritis: two-year clinical and radiographic results from the TEMPO study, a double-blind, randomized trial. *Arthritis Rheum* 2006; 54:1063-74.
74. St Clair EW, van der Heijde DM, Smolen JS, Maini RN, Bathon JM, Emery P, et al. Active-Controlled Study of Patients Receiving Infliximab for the Treatment of Rheumatoid Arthritis of Early Onset Study Group. Combination of infliximab and methotrexate therapy for early rheumatoid arthritis: a randomized, controlled trial. *Arthritis Rheum* 2004; 50:3432-43.

75. Montesinos MC, Desai A, Delano D, Chen JF, Fink JS, Jacobson MA, et al. Adenosine A<sub>2A</sub> or A<sub>3</sub> receptors are required for inhibition of inflammation by methotrexate and its analog MX-68. *Arthritis Rheum* 2003;48:240-47.
76. Fredholm BB, Ijzerman AP, Jacobson KA, Klotz K-N, Linden J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* 2001;53:527-52.
77. Varani K, Gessi S, Dalpiaz A, Ongini E, Borea PA. Characterization of A<sub>2A</sub> adenosine receptors in human lymphocyte membranes by [<sup>3</sup>H]-SCH 58261 binding. *Br J Pharmacol* 1997;122:386-92.
78. Varani K, Gessi S, Dionisotti S, Ongini E, Borea PA. [<sup>3</sup>H]-SCH 58261 labelling of functional A<sub>2A</sub> adenosine receptors in human neutrophil membranes. *Br J Pharmacol* 1998; 123:1723-31.
79. Gessi S, Varani K, Merighi S, Cattabriga E, Iannotta V, Leung E, et al. A<sub>3</sub> adenosine receptors in human neutrophils and promyelocytic HL60 cells: a pharmacological and biochemical study. *Mol Pharmacol* 2002;61:415-24.
80. Gessi S, Varani K, Merighi S, Cattabriga E, Avitabile A, Gavioli R, et al. Expression of A<sub>3</sub> adenosine receptors in human lymphocytes: upregulation in T cell activation. *Mol Pharmacol* 2004;65:711-19.
81. Varani K, Laghi-Pasini F, Camurri A, Capecchi PA, Maccherini M, Di Ciolla F, et al. Changes of peripheral A<sub>2A</sub> adenosine receptors in chronic heart failure and cardiac transplantation. *FASEB J* 2003;17:280-82.
82. Varani K, Gessi S, Merighi S, Vincenzi, F, Cattabriga, E, Benini, A, et al. Pharmacological characterization of novel adenosine ligands in recombinant and native human A<sub>2B</sub> receptors. *Biochem Pharmacol* 2005;70:1601-1612.
83. Sullivan GW. Adenosine A<sub>2A</sub> receptor agonists as anti-inflammatory agents. *Curr Opin Investig Drugs* 2003;4:1313-9.
84. Thiel M, Chouker A. Acting via A<sub>2</sub> receptors, adenosine inhibits the production of tumor necrosis factor-alpha of endotoxin-stimulated human polymorphonuclear leukocytes. *J Lab Clin Med* 1995; 126:275-82.

85. Khoa ND, Montesinos MC, Reiss AB, Delano D, Awadallah N, Cronstein BN. Inflammatory cytokines regulate function and expression of adenosine A<sub>2A</sub> receptors in human monocytic THP-1 cells. *J Immunol.* 2001; 167:4026-32.
86. Fishman P, Bar-Yehuda S, Madi L, Rath-Wolfson L, Ochaion A, Cohen S. et al. The PI3K-NFκB signal transduction pathway is involved in mediating the anti-inflammatory effect of IB-MECA in adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Res Ther* 2006; 8:R33.
87. Szabo C, Scott GS, Virag L, Egnaczyk G, Salzman A, Shanley TP, et al. Suppression of macrophage inflammatory protein (MIP)-1a production and collagen-induced arthritis by adenosine receptor agonist. *Br J Pharmacol* 1998;125: 379-87.
88. Montesinos MC, Yap JS, Desai A, Posadas I, McCrary CT, Cronstein BN. Reversal of the antiinflammatory effects of methotrexate by the nonselective adenosine receptor antagonist theophylline and caffeine. Evidence that the antiinflammatory effects of methotrexate are mediated via multiple adenosine receptors in rat adjuvant arthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43:656-63.
89. Cronstein BN. Low-dose methotrexate: a mainstay in the treatment of rheumatoid arthritis. *Pharmacol Rev* 2005;57:163-72.
90. Montesinos MC, Desai A, Cronstein BC. Suppression of inflammation by low-dose methotrexate is mediated by adenosine A<sub>2A</sub> but not A<sub>3</sub> receptor activation in thioglycollate-induced peritonitis. *Arthritis Res Ther* 2006;8:R53.
91. Ochaion A, Bar-Yehuda S, Cohn S, Del Valle L, Perez-Liz G, Madi L, et al. Methotrexate enhances the anti-inflammatory effect of CF101 via up-regulation of the A<sub>3</sub> adenosine receptor expression. *Arthritis Res Ther* 2006;8:R169.
92. Madi L, Cohen S, Ochayin A, Bar-Yehuda S, Barer F, Fishman P. Overexpression of A<sub>3</sub> adenosine receptor in peripheral blood mononuclear cells in rheumatoid arthritis: involvement of nuclear factor-κB in mediating receptor level. *J Rheumatol* 2007; 34:20-6.
93. Forrest CM, Harman G, McMillan RB, Stoy N, Stone TW, Darlington LG. Modulation of cytokine release by purine receptors in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2005;23:89-92.

94. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal Biochem* 1976;72:248.
95. Varani K, Merighi S, Gessi S, Klotz KN, Leung E, Baraldi PG, et al. [<sup>3</sup>H]-MRE 3008-F20: a novel antagonist radioligand for the pharmacological and biochemical characterization of human A<sub>3</sub> adenosine receptors. *Mol Pharmacol* 2000;57:968-75.
96. Merighi S, Mirandola P, Milani D, Varani K, Gessi S, Klotz KN, et al. Adenosine receptors as mediators of both cell proliferation and cell death of cultured human melanoma cells. *J Invest Dermatol* 2002;119:923-33.
97. Pearson T, Nuritova F, Caldwell D, Dale N, Frenguelli BG. A depletable pool of adenosine area CA1 of the rat hippocampus. *J Neurosci* 2001;21:2298-307.
98. Gomez Cabrera MC, Martinez A, Santangelo G, Pallardò FV, Sastre J, Vina J. Oxidative stress in marathon runners: interest of antioxidant supplementation. *Br J Nutrition* 2006;96:S31-3.
99. Munson PJ, Rodbard D. Ligand: a versatile computerized approach for the characterization of ligand binding systems. *Anal Biochem* 1980;107:220-39.
100. Baharav E, Bar-Yehuda S, Madi L, Silberman D, Rath-Wolfson L, Halpren M, Ochaion A, Weinberger A, Fishman P. Antiinflammatory effect of A<sub>3</sub> adenosine receptor agonists in murine autoimmune arthritis models. *J Rheumatol*. 2005; 32:469-76.
101. Rath-Wolfson L, Bar-Yehuda S, Madi L, Ochaion A, Cohen S, Zabutti A, Fishman P. IB-MECA, an A<sub>3</sub> adenosine receptor agonist prevents bone resorption in rats with adjuvant induced arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2006; 24: 400-6.
102. Ochaion A, Bar-Yehuda S, Cohen S, Amital H, Jacobson KA, Joshi BV, Gao ZG, Barer F, Patoka R, Del Valle L, Perez-Liz G, Fishman P. The A<sub>3</sub> adenosine receptor agonist CF502 inhibits the PI3K, PKB/Akt and NF-kappaB signaling pathway in synoviocytes from rheumatoid arthritis patients and in adjuvant-induced arthritis rats. *Biochem Pharmacol*. 2008; 76:482-94.
103. Silverman MH, Strand V, Markovits D, Nahir M, Reitblat T, Molad Y, Rosner I, Rozenbaum M, Mader R, Adawi M, Caspi D, Tishler M, Langevitz P, Rubinow A, Friedman J, Green L, Tanay A, Ochaion A, Cohen S, Kerns WD, Cohn I, Fishman-Furman

- S, Farbstein M, Yehuda SB, Fishman P. Clinical evidence for utilization of the A3 adenosine receptor as a target to treat rheumatoid arthritis: data from a phase II clinical trial. *J Rheumatol* 2008; 35:41-8.
104. Saag KG, Teng GG, Patkar NM, Anuntiyo J, Finney C, Curtis JR, Paulus HE, Mudano A, Pisu M, Elkins-Melton M, Outman R, Allison JJ, Suarez Almazor M, Bridges SL Jr, Chatham WW, Hochberg M, MacLean C, Mikuls T, Moreland LW, O'Dell J, Turkiewicz AM, Furst DE; American College of Rheumatology. American College of Rheumatology 2008 recommendations for the use of nonbiologic and biologic disease-modifying antirheumatic drugs in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2008; 59:762-84.
105. Klasse EC, Ijzerman AP, de Grip WJ, Beukers MW. Internalization and desensitization of adenosine receptors. *Purinergic Signal* 2008; 4:21-37.
106. Simmonds RE, Foxwell BM. NF-kB and its relevance to arthritis and inflammation. *Rheumatology* 2008;47:584-90.
107. Dichamp I, Bourgeois A, Dirand C, Herbein G, Wendling D. Increased nuclear factor-kappaB activation in peripheral blood monocytes of patients with rheumatoid arthritis is mediated primarily by tumor necrosis factor-alpha. *J Rheumatol* 2007; 34:1976-83.