

L'infiammazione articolare da microcristalli

Crystal-induced joint inflammation

F. Oliviero, L. Punzi

Cattedra e Divisione di Reumatologia, Università degli Studi di Padova

RIASSUNTO

L'infiammazione articolare da microcristalli rappresenta uno dei processi flogistici più intensi e destruenti che è dato conoscere. Sebbene molti dei meccanismi coinvolti in questo tipo di reazione siano stati ampiamente chiariti, alcuni aspetti restano sconosciuti ed in particolare quelli legati alla risoluzione spontanea del processo infiammatorio. In questa rassegna vengono presi in considerazione gli elementi principali in grado di influenzare il tipo e la durata della reazione infiammatoria, fra cui le caratteristiche dei cristalli, il tipo di legame proteico che ne condiziona la presentazione cellulare, e le cellule coinvolte dell'attacco acuto. Queste producono numerose sostanze responsabili sia della propagazione che, probabilmente, dell'autolimitazione dell'attacco acuto. Un ruolo importante spetta al transforming growth factor (TGF)- β in grado, da una parte, di promuovere la formazione dei cristalli e, dall'altra, di inibire la risposta infiammatoria.

Reumatismo, 2003; 55(1):16-27

L'infiammazione articolare indotta dai microcristalli è tra le più acute ed intense che è dato conoscere. A supporto di questa affermazione si possono citare le numerose ed autorevoli testimonianze ricevute nei secoli dai personaggi affetti da gotta (1, 2), la più nota e celebrata artropatia da microcristalli. Proprio sulla particolare capacità di questa malattia di indurre un'infiammazione particolarmente intensa ed essere poi in grado di autolimitarla, almeno durante i primi attacchi, si sono riversate molte attenzioni degli studiosi moderni, i quali hanno cercato di interpretare questo fenomeno con l'ambizione principale di poterlo trasferire ad altri tipi di infiammazione articolare. In effetti, i modelli d'infiammazione indotta dai cristalli di urato monosodico (UMS), di pirofosfato di calcio diidrate (PFCD) e da altri microcristalli di natura calcica, costituiscono un ottimo terreno di applicazione per lo studio della fisiopatologia dell'infiammazione articolare, soprattutto per ciò che concerne gli eventi acuti.

L'infiammazione da microcristalli è influenzata da molti fattori, tra cui alcuni collegati alle caratteristiche dei cristalli, ed in particolare alla loro struttura chimica, forma, grandezza e concentrazione, ed altri alle caratteristiche del mezzo in cui essi si trovano, ed in particolare alla composizione proteica e cellulare. L'entità della partecipazione di questi fattori può variare a seconda dell'evoluzione dell'attacco per cui, per una migliore analisi, conviene suddividere la fisiopatologia degli eventi dell'infiammazione da microcristalli in due fasi principali: attacco e risoluzione.

ATTACCO ACUTO DA MICROCRISTALLI

Le prime dimostrazioni della capacità dei cristalli di provocare infiammazione sono pervenute nel 1899 da Freudweiller, il quale riprodusse attacchi acuti di gotta mediante l'iniezione di microcristalli di urato monosodico (3). Questi esperimenti furono confermati e perfezionati molti anni più tardi da Faires e McCarty (4). Da allora numerosissimi studi sono stati condotti con vari tipi di cristalli, giungendo alla conferma dell'importanza che le caratteristiche dei cristalli, ed in particolare la loro struttura chimica, forma, grandezza e concentrazione, possono avere nell'infiammazione (Tab. I).

Indirizzo per la corrispondenza:

Dott.ssa Francesca Oliviero
Cattedra e Divisione di Reumatologia,
Università degli Studi di Padova
Via Giustiniani 2, 35128 Padova
E-mail: francesca.oliviero@unipd.it

Tabella I - Prove della capacità intrinseca dei cristalli di causare infiammazione.

1. La superficie dei cristalli abitualmente capaci di indurre flogosi è irregolare e rugosa, a differenza di quella dei cristalli non-flogogeni, che è liscia
2. I cristalli flogogeni possiedono una spiccata capacità di legarsi con numerose proteine presenti nel mezzo
3. I cristalli di urato monosodico attivano il Complemento anche in assenza di immunoglobuline
4. I cristalli di pirofosfato di calcio diidrato monoclinici sono frequentemente ritrovati nell'infiammazione acuta, rispetto ai triclinici.
5. La reazione infiammatoria ai cristalli di fosfato basico di calcio è maggiore con i cristalli a più grande superficie e con un minore rapporto Ca:P

CARATTERISTICHE DEI CRISTALLI

Struttura

Per ciò che concerne la struttura del cristallo, è stato suggerito che la superficie dei cristalli maggiormente capaci di indurre flogosi è di solito irregolare e rugosa, a differenza di quella dei cristalli non-flogogeni, liscia (5). Inoltre, i cristalli flogogeni possiedono una spiccata capacità di legarsi con numerose proteine presenti nel mezzo, ed in particolare con le IgG, fatto che contribuisce grandemente allo sviluppo dell'infiammazione (6). La risposta infiammatoria può comunque avvenire anche senza opsonizzazione, come dimostrato nel caso dell'attivazione del Complemento, sia per la sua via classica che per l'alternativa. Questo evento, che è uno dei più caratteristici dell'attacco acuto, viene favorito dal legame dei cristalli con le IgG o con la proteina C reattiva (PCR) (7), ma può avvenire anche direttamente (8, 9). I cristalli di UMS si legano ed attivano il C1 in assenza di immunoglobuline ed i prodotti di attivazione C1r e C1s sono stati ritrovati sulla superficie di cristalli di UMS esposti a plasma (10). A sua volta, la via classica del Complemento può essere attivata dalle IgG e dalla PCR. È interessante notare che l'attivazione della via alternativa avviene in vitro ad alte concentrazioni di cristalli (8). Nonostante sia stato dimostrato il clivaggio di C5 a C5b e C5a per mezzo di una convertasi C5 stabile formata sulla superficie dei cristalli, e che sia il C5a che il C3a possano svolgere un ruolo nella patogenesi dell'infiammazione da UMS (11), il contributo del Com-

plemento all'infiammazione sembra solo marginale. Infatti, negli animali depleti di Complemento, la reazione infiammatoria si verifica ed evolve con la stessa intensità (12).

Forma e dimensioni

Conferme dell'importanza di forma e dimensioni dei cristalli nel determinare un certo tipo di risposta infiammatoria, provengono da molti studi. Swan e coll. (13) hanno infatti dimostrato, studiando le caratteristiche dei cristalli dei pazienti con pseudogotta, una maggior frequenza di cristalli di PFCD monoclinici, rispetto ai triclinici, nell'infiammazione acuta, in contrasto con quanto affermato precedentemente da Schumacher e coll. (14) e in accordo con quanto riscontrato da Watanabe in un modello di "air pouch" nel ratto. Questo autore aveva riscontrato che i cristalli sintetici di PFCD monoclinici provocavano più infiammazione rispetto ai triclinici (15) (Tab. II).

Com'è noto, i cristalli di PFCD si possono ritrovare nelle articolazioni quasi esclusivamente sotto due forme cristallografiche principali, triclinica, con aspetto a parallelepipedo o a romboedro, e monoclinica, ad aspetto bastoncellare (16). Nell'esperienza di Swan, durante l'attacco acuto la grandezza media dei cristalli di PFCD monoclinici era 5,78 μm (range 3,8-9,2), mentre durante la fase di risoluzione 3,5 μm (range 2,3-5,3). In tutti i soggetti le dimensioni dei cristalli risultava inferiore durante la fase di risoluzione rispetto a quella acuta.

Sebbene siano stati studiati meno rispetto a quelli di UMS e di PFCD, anche quelli di fosfato basico di calcio (BCP) (Tab. II), sembrano possedere differenti capacità di indurre infiammazione a seconda delle loro caratteristiche. Uno studio di Prudhommeaux e coll. (17) ha chiarito molti degli aspetti finora sconosciuti inerenti questo tipo di cristalli.

I cristalli di BCP sono così definiti perché sono sintetizzati sotto pH basico, diversamente dai cristalli di acidi, quali quelli di brushite. Utilizzando adeguate metodiche d'indagine è possibile ritrovarli frequentemente nelle articolazioni. Nella maggior parte dei casi sono asintomatici ma possono anche produrre infiammazioni di notevole entità (18), talvolta perfino a carattere distruttivo (19, 20). La maggior parte degli studi condotti in passato sull'infiammazione da cristalli di BCP, sono stati effettuati utilizzando cristalli di idrossiapatite sintetica, un tipo di cristallo che non è mai stato ritrovato nei tessuti biologici. Per studiare le capacità flogogene dei cristalli di BCP "in vivo", Prudhommeaux e coll. (17) hanno invece iniettato

Tabella II - Caratteristiche principali dei cristalli contenenti calcio identificati nel liquido sinoviale.

<i>Pirofosfato di calcio diidrateo</i> - monoclinali - triclinali
<i>Fosfato basico di calcio</i> - idrossiapatite - fosfato octacalcico - fosfato tricalcico
<i>Fosfato di calcio diidrateo (brushite)</i>
<i>Fosfato triplo o ammonio magnesio fosfato</i> - struvite - newberite
<i>Ossalato di calcio</i>

nel sottocutaneo del ratto, utilizzando un modello di "air-pouch" simil-sinoviale, cristalli abitualmente ritrovati nelle articolazioni umane, determinando le loro proprietà fisico-chimiche. Come valutazione dell'infiammazione, è stato determinato il volume e la cellularità del versamento. Significative differenze sono state osservate per volume di versamento e numero di globuli bianchi, a seconda dei vari tipi di cristalli di BCP utilizzati. L'intensità della risposta infiammatoria è risultata correlata con la superficie specifica e con il rapporto Ca:P del cristallo. Poiché tale rapporto è inversamente correlato con la solubilità del cristallo di BCP, è possibile dedurre che i cristalli più insolubili inducano le risposte infiammatorie maggiori.

Carica di superficie

Anche la carica di superficie sembra importante nel determinare il tipo di risposta ai cristalli. La carica negativa dei cristalli di UMS favorisce infatti l'adsorbimento delle estremità Fab delle IgG, che sono caricate positivamente, contribuendo così ad aumentare la capacità flogistica dei cristalli di UMS (21-23).

CARATTERISTICHE DEL MEZZO

Fattori umorali

È noto da tempo il coinvolgimento di alcuni fattori umorali nell'infiammazione da cristalli di UMS (24). Oltre alla succitata attivazione del Complemento, nell'infiammazione sono soprattutto coinvolte le chinine (26) ed il fattore di Hageman. Questo può es-

sere stimolato dai cristalli di UMS, con conseguente attivazione da contatto del sistema della coagulazione e produzione di callicreina, bradichinina, plasmina ed altri mediatori (26) (Tab. III). Tuttavia, come già osservato per il Complemento, il sistema della coagulazione non è necessario per lo sviluppo dell'infiammazione da UMS. Infatti, la gotta è stata segnalata in pazienti con deficit di fattore di Hageman (27, 28) e una risposta infiammatoria acuta all'iniezione di cristalli di UMS si è osservata in polmoni deprivati di fattore di Hageman (29).

Proteine

Associati a vari cristalli sono stati identificati almeno 30 polipeptidi diversi, fra cui: C1q, C1r, C1s, fibronectina, fibrinogeno, IgG, enzimi lisosomiali ed apolipoproteine (10). L'adsorbimento di un tipo di proteina anziché un altro dipende in parte dalle proprietà intrinseche dei cristalli e delle proteine, ma soprattutto dalle caratteristiche del mezzo in cui avviene la reazione. Sembra che le proteine che dimostrano maggiore e più pronta tendenza a legarsi con i cristalli siano le IgG. Il loro adsorbimento alla superficie dei cristalli facilita la reazione con i recettori Fc della superficie delle cellule rispondenti, favorendo così la fagocitosi con la formazione di fagolisosomi (21).

Con l'evoluzione dell'attacco acuto, le condizioni fisico-chimiche e biochimiche locali possono mutare tanto da modificare la tendenza dei cristalli a certi tipi di legame. Così, tra le proteine capaci di legarsi ai cristalli in maniera preferenziale, appaiono le apolipoproteine, ed in particolare l'apolipoproteina E. Questa sostanza, che può essere prodotta dalle cellule del lining sinoviale, inibisce la fagocitosi e la risposta cellulare, a differenza di altre proteine di rivestimento dei cristalli che, come abbiamo visto, sono proinfiammatorie (30).

Poiché è stato dimostrato, nella gotta sperimentale del cane, che la fagocitosi dei cristalli da parte delle cellule del lining rappresenta uno degli eventi più precoci osservabili dopo l'iniezione intraarticolare di cristalli di UMS (31), si può quindi ipotizzare che le stesse cellule di rivestimento sinoviale siano indotte a produrre apolipoproteina E la quale, a sua volta, inibendo la fagocitosi, tende a limitare l'attacco di gotta. Ciò fornirebbe una prima interpretazione dell'autolimitazione dell'attacco.

Cellule

Monociti/macrofagi

Che siano neoformati o derivanti dal disfacimento di depositi preformati, come accade di solito rispetti-

vamente nella gotta e nella psudogotta, i cristalli provocano tutta una serie di eventi cellulari che svolgono un ruolo centrale nello sviluppo dell'artropatia da microcristalli globalmente considerata.

Si ritiene che le prime cellule ad essere coinvolte siano i sinoviociti ed i macrofagi del rivestimento sinoviale, che sono dotati di recettori Fc per le IgG. L'adsorbimento delle IgG alla superficie dei cristalli facilita la loro reazione con i recettori Fc sulla superficie di queste e di altre cellule rispondenti, favorendo la fagocitosi (21). Le cellule così stimolate rilasciano numerosi mediatori dell'infiammazione ed inoltre sintetizzano e secernono numerose citochine, fra cui l'interleuchina-1 (IL-1), l'IL-6, l'IL-8 ed il tumor necrosis factor (TNF) α , che a loro volta attirano ed attivano altre cellule, soprattutto neutrofili (32, 33). A conferma del ruolo importante di queste citochine pro-infiammatorie, l'IL-1 β ed il TNF α sono stati ritrovati in elevate concentrazioni nel liquido sinoviale (LS) delle artropatie da microcristalli di UMS e PFCD (34, 35) (Fig. 1). Si ritiene che la loro capacità di provocare direttamente la chemiotassi dei neutrofili sia

piuttosto limitata (36), ma che possano stimolare l'ingresso dei neutrofili attraverso l'induzione dell'espressione di molecole d'adesione, in particolare l'ELAM (Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule)-1, da parte delle venule post-capillari (37). Nel ruolo di fattore chemiotattico rilevante sembra invece coinvolta l'IL-8. Questa è una molecola a basso PM, dotata di una potente capacità di indurre chemiotassi ed attivazione dei neutrofili. Essa viene rilasciata dalle cellule mononucleate esposte a cristalli di UMS o di altro tipo e le sue concentrazioni sono elevate nel LS di pazienti con gotta (38) (Fig. 2). Il rilascio di IL-8 da parte delle cellule mononucleate è inibito dal pretrattamento con cicloesimide, un inibitore della sintesi proteica, e se i cristalli di UMS vengono rivestiti con lipoproteine a bassa densità (LDL), che inibiscono l'aderenza dei cristalli di UMS alle membrane cellulari interferendo con l'attivazione della membrana indotta da cristalli. La preincubazione del sovrinatante con eparina-agarosio, che si lega all'IL-8, o con anticorpi specifici anti-IL-8 che neutralizzano l'IL-8, riduce la sua attività chemiotattica.

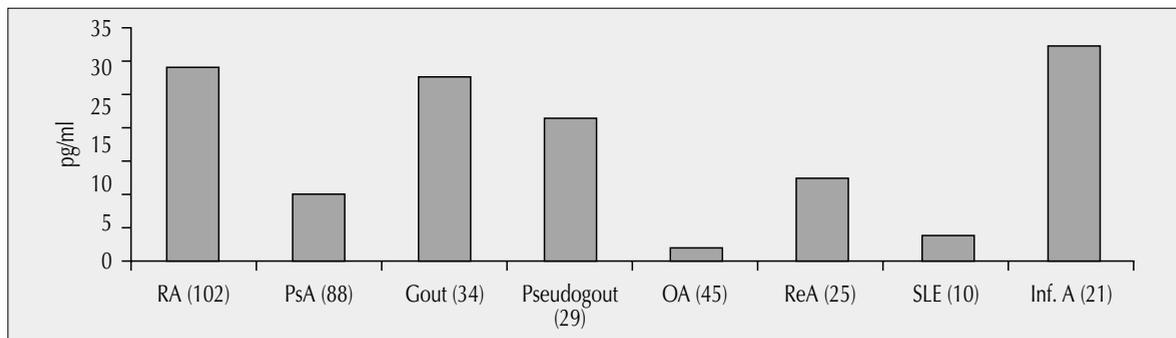


Figura 1 - Livelli di IL-1 β nel liquido sinoviale di pazienti con artropatie di varia natura, da Punzi et al. Crit Rev Clin Lab Sci, 2002 (35). () = numero di casi. RA = rheumatoid arthritis; PsA = psoriatic arthritis; OA = osteoarthritis; ReA = reactive arthritis; SLE = systemic lupus erythematosus; Inf.A = infectious arthritis.

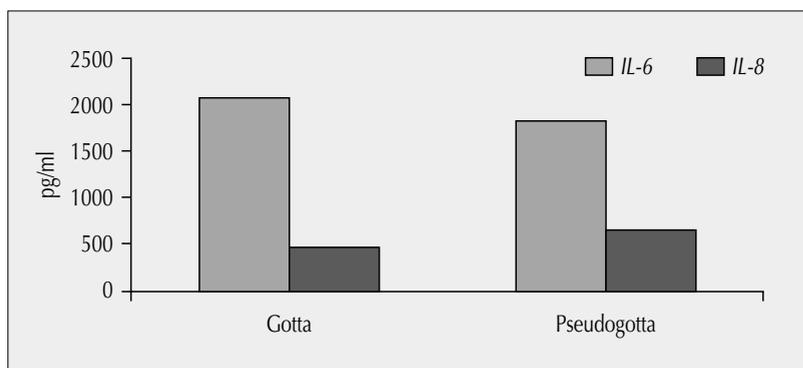


Figura 2 - Livelli di IL-6 ed IL-8 in 30 pazienti con gotta e 28 con pseudogotta (esperienza personale).

L'IL-8 è inoltre un potente attivatore dei neutrofili e si ritiene che la brillante risposta alla colchicina nella gotta sia almeno parzialmente legata ai suoi effetti di soppressione dell'attivazione dei neutrofili indotta dall'IL-8 (36). Della famiglia delle chemiochine, il MIP (macrophage inflammatory protein)-1 α , può contribuire grandemente ad amplificare gli effetti dell'IL-8. Miller e Brelsford (39) hanno dimostrato che l'IL-8 è la maggiore chemiotassina per i neutrofili anche nel LS dei pazienti con artropatia da cristalli di PFCD. Durante il trattamento con colchicina, i livelli di IL-8 permangono elevati, mentre diminuisce il numero di neutrofili. Recentemente è stato dimostrato che la combinazione di TNF α e GM-CSF con i cristalli di UMS o PFCD stimola la produzione, da parte dei neutrofili, di IL-8, ma non di MIP-1 α , favorendo così la chemiotassi dei neutrofili, ma non delle cellule mononucleate.

Il ruolo dell'IL-6 sarebbe soprattutto volto alla propagazione sistemica dell'infiammazione prodotta dai cristalli, attraverso la stimolazione di eventi classici quali la febbre, la leucocitosi e la produzione di proteine della fase acuta da parte del fegato (40).

Neutrofili

Si tratta di un comparto cellulare assolutamente indispensabile per lo sviluppo dell'artrite da microcristalli. Una volta attirati nel luogo dove si trovano i cristalli, i neutrofili si dedicano alla loro fagocitosi, facilitata dal rivestimento proteico, soprattutto con IgG. Nel caso dei cristalli di UMS, una volta che questi siano fagocitati, si assiste ad una rapida dissoluzione della membrana fagolisosomiale, con un rilascio interno del contenuto lisosomiale, rigonfiamento cellulare e morte (41). Queste osservazioni hanno portato alle ipotesi del "sacco suicida" o "perforation-from-within". È stato proposto che quando i cristalli rivestiti dalle proteine sono fagocitati e vanno a legarsi con i fagolisosomi, gli enzimi digeriscono le proteine adsorbite, favorendo la lisi dei fagolisosomi, con successiva morte cellulare e rilascio all'esterno del contenuto dei neutrofili e conseguente amplificazione dell'infiammazione. Si pensa che l'apparente mancata lesione diretta della membrana plasmatica da parte dei cristalli sia dovuta all'effetto inibitorio delle proteine di rivestimento dei cristalli.

Inoltre, l'interazione dei cristalli con la superficie della membrana cellulare produce un rilascio extra-cellulare di enzimi lisosomiali e di radicali li-

beri con meccanismo non citolitico. I cristalli di UMS scatenano sulla superficie cellulare parecchi segnali che possono dipendere dalle perturbazioni di membrana, dalle reazioni fisico-chimiche, dai rapporti tra proteine di membrana e citoscheletro, producendo dei segnali di attivazione citoplasmatica. L'attivazione dei neutrofili da parte dei microcristalli di UMS avviene per mezzo di una tirosina chinasi differente da quella indotta dal fMPL e specifica dei cristalli (42). Si tratta di una proteina di 70 KD la cui attivazione dipende dal contatto di membrana e mette in gioco il citoscheletro. È interessante notare che la colchicina inibisce la sua espressione e non ha alcun effetto sulle altre proteine-chinasi (43).

Fibroblasti, condrociti, sinoviociti

Queste cellule sono recentemente molto studiate soprattutto per indagare sugli effetti dei cristalli di calcio. I meccanismi di traduzione del segnale di questi cristalli per le cellule proliferanti avviene attraverso tutta una serie di sofisticati eventi, fra i quali uno dei più precoci è rappresentato da un forte incremento del Ca⁺⁺ intracellulare. Halverson e coll. (44) hanno dimostrato che i cristalli di BCP possono indurre un aumento del Ca⁺⁺ intracellulare di circa 10 volte nei fibroblasti umani, probabilmente dovuto ad un aumento del flusso di quello extra-cellulare, con ripercussioni sulle risposte precoci alla stimolazione cellulare da cristalli, quali l'espressione di eg, c-fos e mitogenesi. I cristalli di BCP possono indurre la mitogenesi in numerosi tipi di cellule, fra cui i fibroblasti ed i condrociti, portando a conseguenze rilevanti quali la proliferazione sinoviale caratteristica della Milwaukee Shoulder Syndrome. L'attivazione cellulare da BCP è associata ad induzione del nuclear factor-kB ed attivazione della protein kinase C in diversi modelli animali. Inoltre, è stato recentemente chiarito che i principali mediatori del segnale al nucleo indotto dai cristalli di calcio appartengono alla via del P42 e P44 mitogen-activated-protein (MAP) kinase (MAPK), membri della famiglia degli extracellular signal-regulate kinase (ERK) (45). Si ritiene che la via del MAPK p42/44 rappresenti una tappa importante del segnale di traduzione che dai cristalli porta alla produzione di metalloproteasi (MMP)-1 e MMP-3. Interessante è la constatazione che questo aumento della produzione di MMP si accompagnerebbe ad una riduzione della produzione degli inibitori delle metalloproteinasi TIMP. I possibili effetti biologici in vitro dei cristalli di calcio sono rappresentati nella figura 3.

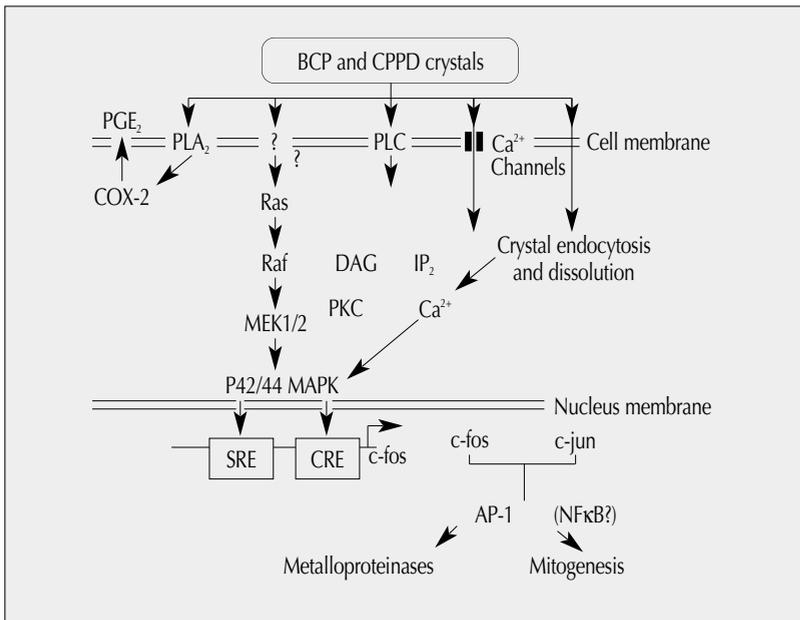


Figura 3 - Effetti dei cristalli di BCP e pirofosfato di calcio diidrato in vitro (da Herman S et al, Curr Op Rheumatol 2000).

Cellule endoteliali

Negli ultimi anni va acquistando sempre più rilievo il ruolo dell'endotelio vascolare nella patogenesi dell'infiammazione. Molti studi hanno dimostrato come, in risposta alla stimolazione di citochine proinfiammatorie, in particolare IL-1 e TNF, le cellule endoteliali si attivano producendo sostanze proteiche e glicoproteine di superficie. Tra queste vi sono le molecole di adesione selectina-E, ICAM (intercellular adhesion molecule)-1 e VCAM (vascular cell adhesion molecule)-1, che facilitano l'adesione vascolare e la conseguente transmigrazione dei leucociti circolanti nel sito dell'infiammazione. Nelle artropatie da microcristalli la selectina-E, una glicoproteina espressa dalle cellule endoteliali attivate, ma non stimolate (46), è stata particolarmente studiata allo scopo di comprendere i meccanismi della risposta endoteliale e della chemiotassi in queste affezioni infiammatorie. Nell'infiammazione gottosa indotta nel maiale è stato osservato che la selectina-E viene espressa dopo qualche ora dalla stimolazione da parte delle citochine e contribuisce all'adesione iniziale dei leucociti circolanti. Utilizzando un frammento Fab2 radiomarcato con un anticorpo monoclonale che riconosce la selectina-E, Chapman e coll. (47) hanno studiato la fissazione del tracciante nelle articolazioni che erano state precedentemente iniettate con microcristalli di UMS. È stata osservata un'iperfissazione scintigrafica nelle articolazioni 7 e 24 ore dopo l'infiltrazione. L'aspetto scintigrafico

co riflette l'espressione delle selectina-E, come dimostrata in preparati immunoistologici. Gli stessi AA, studiando la cinetica dell'espressione della selectina-E in un modello di infiammazione da cristalli di UMS iniettati nel sottocutaneo del maiale,

Tabella III - Mediatori coinvolti nell'infiammazione indotta da microcristalli (da Lioté et Bardin, 1995, modificata) (73).

Fonte	Prodotti
Neutrofili	Proteasi lisosomiali Leucotriene B4 Crystal-induced chemotactic factor Radicali liberi dell'ossigeno IL-8
Fibroblasti sinoviali	Prostaglandine Proteasi lisosomiali
Macrofagi	Prostaglandine IL-1, IL-6, IL-8 Radicali liberi dell'ossigeno
Piastrine	Metaboliti dell'acido arachidonico Proteasi lisosomiali Amine piogene
Complemento	C3a, C5a
Sistema contatto	Callicreina Bradichinina Plasmina

hanno dimostrato che quest'espressione dipende dalla concentrazione dei cristalli di UMS iniettati localmente (48). Essi hanno inoltre distinto quattro fasi: la prima, tra la 2^a e la 6^a ora, comporta un aumento progressivo dell'espressione della selectina-E associata ad un'accumulo di leucociti; la seconda è caratterizzata da una diminuzione dell'infiltrato leucocitario intorno all'8^a ora, contemporanea alla massima espressione della selectina-E. La terza fase, tra l'8^a e la 24^a ora dopo l'iniezione, è contraddistinta da una diminuzione della selectina-E, malgrado un marcato indurimento cutaneo. La quarta fase vede la risoluzione dell'infiammazione cutanea mentre i cristalli sono ancora presenti localmente. La regolazione della selectina-E potrebbe dipendere dalla capacità intrinseca delle cellule endoteliali a diminuire la sua espressione (49). Sempre Chapman e coll. hanno recentemente ancora approfondito i loro studi sulla selectina-E (50). Essi hanno incubato i cristalli di UMS con cellule mononucleate; quindi il sovrantante è stato utilizzato per testare la capacità di indurre l'espressione di selectina-E durante la cocoltura con cellule endoteliali umane da vena ombelicale. Hanno così dimostrato che i cristalli di UMS sono potenti stimolatori della produzione di IL-1 e TNF α da parte dei monociti e che queste citochine sono responsabili dell'attivazione delle cellule endoteliali monocito-mediata. In seguito hanno osservato il comportamento di queste reazioni dopo aggiunta di anticorpi anticitochine. In una seconda parte di questo studio, è stato studiato il ruolo del TNF α in un modello di monoartrite da UMS indotta nel maiale, in presenza od assenza di anti-TNF α . Il blocco del TNF è efficace nel sopprimere sia l'espressione della selectina-E che la migrazione dei PMN nelle articolazioni infiammate.

Alcune citochine regolatrici, come il TGF β , inibiscono l'espressione della selectina-E da parte delle cellule endoteliali in vitro e riducono l'adesione di monociti o dei polimorfonucleati neutrofili all'endotelio (51).

Partendo dalla constatazione che i livelli di TGF β sono particolarmente elevati nel LS dei pazienti con gotta, Lioté e coll. hanno esaminato gli effetti di questa sostanza sulla risposta infiammatoria ai cristalli in un modello di "air pouch" del ratto (52). Hanno così osservato che la somministrazione di TGF β 1 contemporanea alla od un'ora dopo la somministrazione di cristalli di UMS porta ad una marcata inibizione nel numero delle cellule reclutate nel sito dell'infiammazione e nel volume di versamento, suggerendo che il TGF β 1 può essere un im-

portante fattore limitante la durata dell'attacco di gotta. Paradossalmente però, se da un lato il TGF β rappresenta un fattore antinfiammatorio, dall'altro può favorire la cristallizzazione dei PFCD attraverso la stimolazione della formazione di pirofosfato inorganico extracellulare (53). In un recente studio e in accordo con quanto osservato da altri autori (54) è stato dimostrato che nel LS di pazienti con osteoartrosi i livelli di TGF β sono significativamente più elevati in presenza di cristalli di PFCD e/o condrocalinosi. L'aumento del TGF β , tuttavia, correla in modo inverso con l'IL-1 β (55).

AUTOLIMITAZIONE DELL'ATTACCO ACUTO

La risoluzione spontanea dell'attacco acuto di gotta costituisce uno degli aspetti più interessanti dell'infiammazione indotta da cristalli. Kelley e

Tabella IV - Eventi favorevoli la risoluzione dell'attacco acuto da microcristalli.

<p><i>1. Dissoluzione e clearance dei microcristalli</i></p> <p>a) aumento calore locale</p> <p>b) azione delle mieloperossidasi dopo fagocitosi da parte dei neutrofili</p> <p>c) alterazione della morfologia dei microcristalli da parte dei radicali liberi indotti dalle interazioni leucociti-cristalli</p> <p>d) l'aumento del flusso vascolare aiuta il trasporto dell'urato al di fuori dall'articolazione e fa diminuire la tendenza alla formazione di cristalli per sovrassaturazione</p>
<p><i>2. Modificazione del rivestimento proteico</i></p> <p>a) Gli anioni superossido rilasciati durante l'attacco acuto possono alterare le proprietà delle proteine legate ai cristalli</p> <p>b) Le proteine che entrano in articolazione od il materiale rilasciato dalla lisi leucocitaria possono spiazzare le IgG dalla superficie dei cristalli</p> <p>c) Le apolipoproteine B ed E prodotte dalla membrana sinoviale infiammata possono svolgere un ruolo antiflogistico rivestendo i microcristalli</p>
<p><i>3. Inibizione dei mediatori dell'infiammazione</i></p> <p>a) da parte di recettori inibitori naturali delle citochine proinfiammatorie (sTNFR, IL-1Ra) prodotti durante l'infiammazione</p> <p>b) da parte di citochine anti-infiammatorie (TGFβ)</p>
<p><i>4. Altri fattori</i></p> <p>a) Gli ormoni della corteccia surrenalica, rilasciati durante l'attacco acuto come reazione da allarme, possono sopprimere la risposta infiammatoria</p> <p>b) La degradazione dell'adenosina, potente inibitore dell'adesione leucocitaria e della produzione di superossidi, può essere inibita dai neutrofili attivati</p>

Schumacher (56) hanno chiamato in causa vari fattori (Tab. IV), alcuni dei quali sono tuttora validi ed hanno ricevuto conferma, mentre se ne sono aggiunti altri nuovi.

Dissoluzione e clearance dei microcristalli

- a) L'aumento del calore causato dall'infiammazione può aumentare la solubilità dell'urato, diminuendo la tendenza verso la formazione di nuovi cristalli e favorendo la dissoluzione di cristalli già preesistenti.
- b) La dissoluzione dei microcristalli può anche essere la conseguenza diretta dell'azione delle mieloperossidasi leucocitarie dopo fagocitosi da parte dei PMN. Alcuni cristalli fagocitati possono essere distrutti dalle mieloperossidasi dei leucociti, diminuendo così il peso dei cristalli rilasciati dalle cellule rotte e capaci di perpetuare la risposta infiammatoria.
- c) I radicali liberi indotti dalle interazioni leucociti-cristalli che possono alterare la morfologia dei cristalli (57).
- d) L'aumento del flusso vascolare può aiutare il trasporto dell'urato al di fuori dall'articolazione e diminuire la tendenza alla formazione di cristalli dovuta alla sovrassaturazione.

Modificazione del rivestimento proteico dei microcristalli

È già stato ampiamente sottolineato il ruolo del rivestimento proteico nel modulare le capacità flogogene dei microcristalli. La modificazione del legame proteine-cristalli può quindi rappresentare un fattore di notevole importanza nella limitazione e nello spegnimento dell'attacco acuto. Varie tappe sono state suggerite:

- a) Gli anioni superossido rilasciati dall'interazione durante l'attacco acuto di gotta possono alterare le proprietà delle proteine legate ai cristalli (57).
- b) Le proteine che entrano in articolazione o il materiale rilasciato dalla lisi leucocitaria possono spiazzare le IgG dalla superficie dei cristalli e così diminuire le loro proprietà flogistiche (58, 59). L'elastasi leucocitaria libera può ad es. clivare le IgG dalla loro regione Fc e così diminuire la fagocitosi dipendente dalla opsonizzazione. Gli stessi enzimi lisosomiali sembrano capaci non solo di lisare il rivestimento immunoglobulinico, ma anche di adsorbirsi sulla superficie dei cristalli, rendendoli così meno flogogeni (31).

Come è stato accennato in precedenza, ad un certo punto dell'attacco acuto, alcune LDL (low density lipoprotein) quali le apolipoproteine (apo) B ed E possono legarsi ai cristalli in sostituzione di altre protei-

ne riducendo la capacità dei cristalli di indurre la produzione di IL-1 β da parte dei macrofagi e di attivare i PMN in vitro (30), e inibendo la citolisi dei neutrofili indotta dai cristalli di PFCD e di UMS (60).

Queste LDL di grandi dimensioni sono normalmente assenti nell'articolazione, mentre si possono ritrovare in notevole concentrazione nei liquidi infiammatori. È probabile che la loro concentrazione aumenti durante la prima fase del processo flogistico indotto da cristalli e sia in parte determinata da un aumentato afflusso legato all'aumento della permeabilità capillare ed in parte dalla produzione locale da parte delle cellule sinoviali. In effetti, cristalli di UMS rivestiti da apoB sono stati dimostrati durante la fase tardiva della crisi di gotta (61).

In uno studio in vivo condotto sul modello sperimentale della "air pouch" nel ratto è stato dimostrato che i cristalli di PFCD provocano la comparsa delle LDL dopo 3 ore dalla loro iniezione raggiungendo il livello massimo dopo 24 ore (62). L'aumento delle LDL è accompagnato da una diminuzione di alcuni markers di infiammazione considerati, PGE₂ e β glucuronidasi, rafforzando l'ipotesi che le LDL possano contribuire alla risoluzione degli attacchi acuti di pseudogotta.

Inibizione dei mediatori dell'infiammazione

Nei LS dell'infiammazione indotta da microcristalli è possibile ritrovare, oltre alle citochine proinfiammatorie, anche loro inibitori, quali i recettori solubili del TNF (63) e l'IL-1Ra (64).

Anche il TGF β può inibire la secrezione di IL-1 β ed aumentare la sintesi del suo antagonista (65). Il TGF β 1 iniettato contemporaneamente od un'ora dopo la somministrazione di cristalli di UMS porta ad una marcata inibizione nel numero delle cellule reclutate nel sito dell'infiammazione e nel volume di versamento (51).

REAZIONE ORMONALE

Gli ormoni rilasciati dalla corticale surrenalica in risposta alla fase acuta possono sopprimere la reazione infiammatoria. È stato osservato che i livelli plasmatici di FSH, LH, progesterone, 17 β -estradiolo e cortisolo diminuiscono in modo significativo in pazienti con gotta, mentre aumenta il rapporto testosterone, 17 β -estradiolo (66). Questi autori suggeriscono che il 17 β -estradiolo possa giocare un ruolo chiave nella regolazione della biosintesi delle purine e nel metabolismo dell'acido urico. Non vi sono invece differenze dei livelli di ormoni sessuali tra pa-

zienti iperuricemici asintomatici e pazienti normouricemici (67). In un modello sperimentale di gotta nel ratto (68) è stato dimostrato che l'amministrazione locale di ormone adenocorticotropo (ACTH) svolge un'azione antinfiammatoria attraverso l'attivazione del recettore della melanocortina.

MICROCRISTALLI E CRONICIZZAZIONE DELL'ARTROPATIA

Il tipo di risposta infiammatoria può rientrare tra i fattori che condizionano il passaggio alla cronicizzazione delle artropatie da microcristalli (Tab.V). Questi possono essere suddivisi in fattori locali e fattori generali. Fra i fattori locali rientrano: l'integrità dei tessuti articolari, i traumi e microtraumi ripetuti, la capacità di risposta riparativa ai vari attacchi, la predisposizione genetica alla produzione di alcune citochine coinvolte nella risposta infiammatoria, la capacità di inibire la neoformazione di cristalli, la capacità di inibire il disfacimento dei depositi preformati. Fra i fattori generali si possono includere: l'età, l'aumentata produzione di soluti responsabili della formazione di cristalli (iperuricemia, ipercalcemia, ecc), l'assunzione di farmaci che influenzano la formazione dei cristalli o la risposta infiammatoria, le malattie associate, le caratteristiche genetiche del soggetto.

Le reazioni infiammatorie da microcristalli possono avere intensità e durata differente a seconda dei soggetti, con conseguenze sull'integrità dei tessu-

ti articolari, che a suo turno condiziona il passaggio alla cronicizzazione lenta o dopo fasi successive. Questo processo può essere favorito od accelerato da altri eventi o condizioni, quali: la presenza di traumi o microtraumi ripetuti che favoriscono da un lato il riaccendersi delle crisi e dall'altro la formazione di lesioni croniche; la capacità di risposta riparativa, che può essere regolata geneticamente o condizionata da varie altre condizioni associate, quali malattie o farmaci assunti. In questo contesto è molto interessante una nostra osservazione fatta con i cardiotrapiantati (69). Com'è noto, questi soggetti assumono dosi generose di ciclosporina e diuretici ed inoltre, spesso, immunosoppressori e steroidi. Per cui hanno livelli di uricemia molto incrementati, con forte tendenza allo sviluppo di gotta. Il LS dei cardiotrapiantati affetti da gotta, rispetto agli altri gottosi, presentava livelli di infiammazione in generale e di interleuchine infiammatorie in particolare, significativamente inferiori. In questi pazienti però la gotta si presentava nella maggior parte dei casi con espressione poliarticolare ed addirittura, in 4 soggetti, già tofacea all'esordio. È stato quindi suggerito che, mentre alcuni farmaci assunti da questi pazienti (ciclosporina, diuretici) favoriscono l'iperuricemia e la tendenza alla gotta, gli altri (steroidi, azatioprina) riducono la risposta infiammatoria, rendendo l'espressione della gotta meno flogistica ma più facilmente poliarticolare e cronica.

Altri fattori da tenere in adeguata considerazione sono l'età e le malattie associate all'invecchiamento. In effetti, ad es. la gotta negli anziani ha una particolare predilezione per i noduli di Heberden, dove tende ad assumere rapidamente aspetti tofacei (70). Molto intrigante è anche il rapporto fra artriti da microcristalli ed altre artropatie, in particolare l'artrite reumatoide (AR). Attraverso analisi radiografiche e del LS, alcuni autori hanno dimostrato una correlazione negativa fra AR e PFCD (71) e fra AR e gotta (72). Le ipotesi apportate per spiegare questi rapporti sono varie, e non tutte confermate. Fra le più probabili, vi è la capacità della membrana sinoviale e/o del LS reumatoide di inibire la formazione di cristalli.

Tabella V - Fattori che condizionano il passaggio alla cronicizzazione delle artropatie da microcristalli.

<p><i>Fattori locali</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Integrità dei tessuti articolari - Traumi e microtraumi ripetuti - Capacità di risposta riparativa ai vari attacchi - Predisposizione genetica alla produzione di alcune citochine coinvolte nella risposta infiammatoria - Capacità di inibire la neoformazione di cristalli - Capacità di inibire il disfacimento dei depositi preformati
<p><i>Fattori generali</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Età - Aumentata produzione di soluti responsabili della formazione di cristalli (iperuricemia, ipercalcemia, ecc) - Assunzione di farmaci che influenzano la formazione dei cristalli o la risposta infiammatoria - Caratteristiche genetiche - Malattie associate

BIBLIOGRAFIA

1. Marson P. San Trofimo di Arles, "Avvocato de' Podagrosi". Reumatismo 2001; 53: 75-83.
2. Antonello A, Ripa Bonati M, D'Angelo A, Gambero G, Calò L, Bonfante L. Gotta e rene tra XVII e XIX secolo. Reumatismo 2002; 54: 165-71.

SUMMARY

The inflammatory response to microcrystals is one of the most powerful and intriguing examples of inflammation observable in man. Although many mechanisms of this reaction are well known, some aspects need to be further clarified, in particular those related to the self-limited nature of the process. Type and duration of the inflammatory reactions are mainly influenced by crystals characteristics, including shape and size, which, in turn may involve the crystal-binding of several proteins, essential for the modulation of cellular responses. Cells most involved in the acute attacks are macrophage and neutrophils, which are responsible for the secretion of several important mediators of inflammation, such as prostaglandins and cytokines. These substances may in turn influence both intensity and duration of the acute attack. The proinflammatory effects of interleukin (IL)-1, IL-6, IL-8 and tumour necrosis factor (TNF)- α are counterbalanced by the anti-inflammatory activity of transforming growth factor (TGF)- β , which may inhibit both the cell recruitment and cytokine synthesis. The role of TGF is crucial, not only by limiting acute inflammation but also by promoting formation and deposit of calcium crystals. However, the final effect of the balance between inflammatory and anti-inflammatory cytokines may also depend by other tissutal and cellular factors, not all of which are still completely understood.

Parole chiave - Infiammazione da microcristalli, urato monosodico, pirofosfato di calcio, transforming growth factor- β , prostaglandine.

Key words - Crystal-induced inflammation, monosodium urate crystals, calcium pyrophosphate dihydrate crystals, transforming growth factor- β , prostaglandins.

3. Freudweiller M. Experimentelle Untersuchungen über das Wesen der Gichtknoten. Dtsch Arch Klin Med 1899; 63: 266.
4. Faires JS and McCarty DJ. Acute arthritis in man and dog after intrasynovial injection of sodium urate crystals. Lancet ii 1962; 266-9.
5. Mandel NS. The structural basis of crystal-induced membranolytic. Arthritis Rheum 1976;19:439-45.
6. Terkeltaub RA, Ginsberg MH. The inflammatory reaction to crystals. Rheum Dis Clin North Am 1988; 14: 353-64.
7. Hasselbacher P. C3 activation by monosodium urate monohydrate and other crystallin material. Arthritis Rheum 1979; 22: 571-8.
8. Giclas PC, Ginsberg MH, Cooper NR. Immunoglobulin G independent pathway by monosodium urate crystals. J Clin Invest 1979; 63: 759-64.
9. Fields TR, Abramson SB, Weismann G, Kaplan AP and Ghebrehiwet B. Activation of the alternative pathway of complement by monosodium urate crystals. Clin Immunol Immunopathol 1983; 26: 249-57.
10. Terkeltaub R, Tenner AJ, Kozin F, Ginsberg MH. Plasma protein binding by monosodium urate crystals. Arthritis Rheum 1983; 26: 775-83.
11. Schiavon F, Marson P, Punzi L, Malatesta V, Gambari PF. Total complement activity in synovial fluid: an overview of 370 cases of knee joint effusion. Clin Exp Rheumatol 1987; 5/S:171.
12. Spilberg I, Osterland CK. Anti-inflammatory effect of the trypsin-kallikrein inhibitor in acute arthritis induced by urate crystals in rabbits. J Lab Clin Med 1970; 76: 472-9.
13. Swan A, Heywood B, Chapman B, Seward H, Dieppe P. Evidence for a causal relationship between the structure, size and load of calcium pyrophosphate dihydrate crystals and attacks of pseudogout. Ann Rheum Dis 1995; 54: 825-30.
14. Schumacher HR, Fishbein P, Phelps P, Tse R, Krauser R. Comparison of sodium urate and calcium pyrophosphate crystal size and other factors. Arthritis Rheum 1995; 18: 783-93.
15. Watanabe W, Baker DG, Schumacher HR. Comparison of the acute inflammation induced by calcium pyrophosphate dihydrate, apatite and mixed crystals in the rat air pouch model of a synovial space. J Rheumatol 1992; 9: 1453-7.
16. Govoni M, Trotta F. I cristalli nel liquido sinoviale. Reumatismo 1996; 48(suppl 2): 59-67.
17. Prudhommeaux F, Schiltz C, Lioté F, Hina A, Champy R, Bucki B, et al. Variation in the inflammatory properties according to crystal type. Arthritis Rheum 1996; 39: 1319-26.
18. McCarty DJ, Halverson PB. Basic calcium phosphate (apatite, octacalcium phosphate, tricalcium phosphate) crystal deposition diseases. In Arthritis and Allied Conditions, Twelfth ed, Edited by DJ McCarty, Philadelphia, Lea & Fabiger, 1993.
19. McCarty DJ, Halverson PB, Carrera GF, Brewer BJ, Kozin F. "Milwaukee shoulder"-association of microspheroids containing hydroxyapatite crystals, active collagenase, and neutral protease with rotator cuff defects. Arthritis Rheum 1981; 24: 464-73.
20. Schumacher HR, Miller JL, Ludivico C, Jessar RA. Erosive arthritis associate with apatite crystal deposition. Arthritis Rheum 1981; 24: 31-7.
21. Nagase M, Baker DG, Shumacher HR. Immunoglobulin G coating on crystals and ceramics enhances polymorphonuclear cell superoxide production: correlation with immunoglobulin G adsorbed. J Rheumatol 1989; 16: 971-6.

22. Antommattei O, Heimer R, Baker DG, Schumacher HR. Binding of synovial fluid proteins to monosodium urate crystals in vitro. *Clin Exp Rheumatol* 1990; 8: 29-34.
23. Bardin T, Cherian PV, Schumacher HR. Immunoglobulins on the surface of monosodium urate crystals: an immunoelectron microscopic study. *J Rheumatol* 1984; 11: 339-41.
24. Ballabio CB, Cirila E, Colombo B, Marcolongo R, Passero G, Pipitone V. "La Gotta e le iperuricemie". Edizioni Wellcome, Pomezia (Roma), 1977.
25. Melmon KL, Webster ME, Goldfinger SE, Seegmiller JE. The presence of a kinin in inflammatory synovial effusions from arthritides of varying etiologies. *Arthritis Rheum* 1967; 10: 13-20.
26. Ginsberg MH, Jacques B, Cochrane CG, Griffin JH. Urate crystal-dependent cleavage of Hageman factor in human plasma and synovial fluid. *J Lab Clin Med* 1979; 95: 497-506.
27. Green D, Arsever CL, Grumet KA, Ratnoff OD. Classic gout in Hageman factor (factor XII) deficiency. *Arch Intern Med* 1982; 142: 1556-7.
28. Londino AV, Luparello FJ. Factor XII deficiency in a man with gout and angioimmunoblastic lymphadenopathy. *Arch Intern Med* 1984; 144: 1497-8.
29. Spilberg I. Urate crystals arthritis lacking Hageman factor. *Arthritis Rheum* 1974; 17: 143-8.
30. Terkeltaub RA, Duer CA, Curtiss LK. Apolipoprotein (apo) E inhibits the capacity of monosodium urate to stimulate neutrophils. *J Clin Invest* 1991; 87: 20-6.
31. Ortiz-Bravo E, Baker DG, Schumacher HR Jr. Mechanisms involved in the initiation, perpetuation and self-limited nature of acute gouty arthritis. *Rev Rhum (Eng ed)* 1994; 61: 121-6.
32. Wigley FM, Fine IT, Newcombe DS. The role of human synovial fibroblast in monosodium urate crystal-induced synovitis. *J Rheumatol* 1983; 10: 602-11.
33. Naccache PH, Grimars M, Roberge CJ, Gilbert C, Lussier A, De Médicis R, et al. Crystal-induced neutrophil activation: Limitation and modulation of calcium mobilization and superoxide generation by microcrystals. *Arthritis Rheum* 1991; 34: 333-42.
34. Cavasin F, Punzi L, Finco B, Schiavon F, Bertazzolo N, Spiazzi AM, et al. Interleukin-1 in synovial fluid of various arthropathies. *Scand J Rheumatol* 1990;(Suppl) 85: 32.
35. Punzi L, Calò L, Plebani M. Clinical significance of cytokine determination in synovial fluid. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2002; 39: 63-88.
36. Terkeltaub R, Zachariae C, Santoro D, Martin J, Peveri P, Matsushima K. Monocyte-derived neutrophil chemotactic factor/interleukin-8 is a potential mediator of crystal-induced inflammation. *Arthritis Rheum* 1991; 34: 894-903.
37. Pober JS. Cytokine-mediated activation of vascular endothelium. *Am J Pathol* 1988; 133: 426-33.
38. Bertazzolo N, Punzi L, Pianon M, Cesaro G, Todesco S. Interrelationship between interleukin-8 and neutrophils in synovial fluid of crystal-induced arthritis. *J Rheumatol* 1994; 21: 1776.
39. Miller EJ, Brelsford WG. Interleukin-8: the major neutrophil chemotaxin in a case of pseudogout. *J Rheumatol* 1993; 20: 1250-2.
40. Guerne PA, Terkeltaub R, Zuran B, Lotz M. Inflammatory microcrystals stimulate interleukin-6 production and secretion by human monocytes and synovial cells. *Arthritis Rheum* 1989; 32: 1443-52.
41. Hoffstein S, Weissmann G. Mechanisms of lysosomal enzyme release from leukocytes. IV. Interaction of monosodium urate crystals with dogfish and human leukocytes. *Arthritis Rheum* 1975; 8: 153-65.
42. Gaudry M, Roberge CJ, De Médicis R, Lussier A, Poubelle PE, Naccache PH. Crystal-induced neutrophil activation. III. Inflammatory microcrystals induce a distinct pattern of tyrosine phosphorylation in human neutrophils. *J Clin Invest* 1993; 91: 1649-55.
43. Roberge CJ, Gaudry M, De Médicis R, Lussier A, Poubelle PE, Naccache PH. Crystal-induced neutrophil activation. IV. Specific inhibition of tyrosine phosphorylation by colchicine. *J Clin Invest* 1993; 92: 1722-9.
44. Halverson PB, Greene A, Cheung HS. Intracellular calcium responses to BCP crystals in fibroblasts. *Osteoarthritis Cartilage* 1998; 6: 324-9.
45. Cheung HS. Calcium crystals effects on the cell of the joint: implications for pathogenesis of disease. *Curr Opin Rheumatol* 2000; 12: 223-7.
46. Daxecker H, Raab M, Markovic S, Karimi A, Griesmacher A, Mueller MM. Endothelial adhesion molecule expression in an in vitro model of inflammation. *Clin Chim Acta* 2002; 325: 171-5.
47. Chapman PT, Jamar F, Harrison AA, Binns RM, Peters AM, Haskard DO. Noninvasive imaging of E-selectin expression by activated endothelium in urate crystal-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 1752-6.
48. Chapman PT, Jamar F, Harrison AA, Shofield JB, Peters AM, Binns RM, et al. Characterization of E-selectin expression leukocyte traffic, and clinical sequelae in urate crystal-induced inflammation: an insight into gout. *Br J Rheumatol* 1996; 35: 323-34.
49. Read MA, Whitley MZ, Williams AJ, Collins T. NFκB and IκBα. an inducible regulatory system in endothelial activation. *J Exp Med* 1994; 179: 503-12.
50. Chapman PT, Yarwood H, Harrison AA, Stocker CJ, Jamar F, Gundel RH, et al. Endothelial activation in monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation. In vitro and in vivo studies on the roles of tumor necrosis factorα and interleukin-1. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 955-65.
51. Gamble JR, Khew-Goodall Y, Vadas MA. Transforming growth factor-β inhibits E-selectin expression on human endothelial cells. *J Immunol* 1993; 150: 4494-503.
52. Lioté F, Prudhommeaux F, Schiltz C, Champy R, Herbelin A, Ortiz-Bravo E, et al. Inhibition and prevention of monosodium urate monohydrate crystal-induced acute inflammation in vivo by transforming growth factor beta I. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 1192-8.
53. Rosenthal AK, Cheung HS, Ryan LM. Transforming growth factor beta 1 stimulates inorganic pyrophosphate elaboration by porcine cartilage. *Arthritis Rheum* 1991; 34: 904-11.

54. Terkeltaub RA. What does cartilage calcification tell us about osteoarthritis? *J Rheumatol* 2002; 29: 411-5.
55. Punzi L, Oliviero F, Ramonda R. TGF β levels in synovial fluid of osteoarthritis with or without calcium pyrophosphate dihydrate crystals. *J Rheumatol*, in press.
56. Kelley WN, Schumacher HR: Crystal-associated synovitis. In Kelley WN, Harris ED, Ruddy S, Sledge CB Ed, "Textbook of Rheumatology", Fourth Ed, Saunders WB Co., Philadelphia, 1993; pp 1291-1336.
57. Marcolongo R, Calabria AA, Lallumera M, Gerli R, Alessandrini C, Cavallo G. The "switch-off" mechanism of spontaneous resolution of acute gout attacks. *J Rheumatol* 1988; 15: 101.
58. Rosen MS, Baker D, Schumacher HR. Products of polymorphonuclear cell injury inhibit IgG enhancement of monosodium urate induced superoxide production. *Arthritis Rheum* 1986; 29: 1480.
59. Ortiz-Bravo E, Clayburne G, Sieck M. Immunolabeling of proteins coating monosodium urate crystal in sequential samples from acute gouty arthritis and MSU induced inflammation in the rat subcutaneous air pouch. *Arthritis Rheum* 1990; 33 (suppl): 555.
60. Burt HM, Jackson JK, Rowell J. *J Rheumatol* 1989; 16: 809-17.
61. Ortiz-Bravo E, Sieck MS, Schumacher HR: Changes in the protein coating monosodium urate crystals during active and subsiding inflammation. Immunogold studies of synovial fluid from patients with gout or fluids obtained using the rat subcutaneous air pouch model. *Arthritis Rheum* 1993; 36: 1274-85.
62. Kumagai Y, Watanabe W, Kobayashi A, Sato K, Onuma S, Sakamoto H. Inhibitory effect of low density lipoprotein on the inflammation-inducing activity of calcium pyrophosphate dihydrate crystals. *J Rheumatol* 2001; 28: 2674-80.
63. Roux-Lombard P, Punzi L, Hasler F, Bas S, Todesco S, Gallati H et al. Soluble tumor necrosis factor receptors in human inflammatory synovial fluids. *Arthritis Rheum* 1993; 36: 485-9.
64. Roberge CJ, de Medicis R, Dayer JM, Rola-Pleszczynski M, Naccache PH, Poubelle PE. Crystal-induced neutrophil activation. V. Differential production of biologically active IL-1 and IL-1 receptor antagonist. *J Immunol* 1994; 152: 5485-94.
65. Wahl SM, Costa GL, Corcoran M, Whal LM, Berger AE. Transforming growth factor β mediates IL-1-dependent induction of IL-1 receptor antagonist. *J Immunol* 1993; 150: 3553-60.
66. Marinello E, Riario-Sforza G, Marcolongo R. Plasma follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, and sex hormones in patients with gout. *Arthritis Rheum* 1985; 28: 127-31.
67. Rosen R, Tomer Y, Carel R, Weinberg A. Serum 17-beta-estradiol and testosterone levels in asymptomatic hyperuricaemic men. *Clin Rheumatol* 1994; 13: 219-23.
68. Getting SJ, Christian HC, Flower RJ, Perretti M. Activation of melanocortin type 3 receptor as a molecular mechanism for adrenocorticotrophic hormone efficacy in gouty arthritis. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 2765-75.
69. Pianon M, Punzi L, Livi U, Schiavon F, Bertazzolo N, Avossa M, Todesco S: Synovial fluid levels of proinflammatory interleukins in gouty arthritis (GA) of heart transplant recipients (HTR). Comparison with non-HTR GA. *Arthritis Rheum* 1998; 41: S195.
70. Fam AG, Stein J, Rubenstein J. Gouty arthritis in nodal osteoarthritis. *J Rheumatol* 1996; 23: 684-9.
71. Doherty M, Dieppe P, Watt I. Low incidence of calcium pyrophosphate dihydrate crystals deposition in rheumatoid arthritis, with modification of radiographic features in coexistent disease. *Arthritis Rheum* 1984; 27: 1002-9.
72. Fallace DJ, Klinenberg JR, Morheim D, Berlanstein B, Biren PC, Callis G. Coexistent gout and rheumatoid arthritis: case report and literature review. *Arthritis Rheum* 1979; 22: 81-6.
73. Lioté F, Bardin Th: Pourquoi la crise de goutte s'interrompt-elle spontanément? In De Sèze S, Rycckewaert A, Kahn MF et coll. "L'Actualité Rhumatologique", Expansion Scientifique, Paris 1995, pg 260-8.