



## Alterazioni istopatologiche e correlati sierici nei diversi *subsets* clinici delle spondiloartriti sieronegative

Laura Zanisi, Carlomaurizio Montecucco

Clinica Reumatologica, Università degli Studi di Pavia, Fondazione IRCCS  
Policlinico San Matteo, Pavia, Italia

---

### *Alterazioni istopatologiche e correlati sierici nei diversi subsets clinici delle spondiloartriti sieronegative*

**Introduzione:** le spondiloartriti sieronegative (SpA) costituiscono un gruppo eterogeneo di condizioni accomunate da alcune similitudini cliniche. Nelle SpA ad interessamento prevalentemente periferico, in corso di artrite la membrana sinoviale è l'organo bersaglio principale. Lo studio delle caratteristiche dell'infiltrato flogistico e della componente stromale a livello della membrana sinoviale si è rivelato utile sia per la comprensione dei meccanismi eziopatogenetici, sia per la stratificazione clinica, prognostica e di risposta alla terapia dei pazienti.

**Scopo dello studio:** riconoscimento di eventuali caratteristiche immuno-istologiche specifiche che permettano la diagnosi differenziale tra le SpA e l'artrite reumatoide (AR) e, nell'ambito delle SpA, tra i diversi sottogruppi diagnostici; ricerca di biomarcatori sistemici in grado di riflettere l'intensità e la composizione dell'infiltrato infiammatorio sinoviale.

**Materiali e metodi:** analisi immunoistochimica di biopsie sinoviali, prelevate da 39 pazienti affetti da SpA, a confronto con una coorte storica di 59 pazienti con AR, mediante marcature con anticorpi anti-CD20 (che identificano i linfociti B), anti-CD68 (macrofagi), anti-CD3 (linfociti T) e anti-CD21 (cellule follicolari dendritiche).

**Risultati:** l'entità dell'infiltrato flogistico sembra essere correlata, non tanto alla diagnosi, ma all'estensione della malattia, in quanto l'aggregazione T-B cellulare è incrementata nelle artriti ad interessamento poliarticolare indipendentemente dalla categoria diagnostica (AR o SpA). Invece, lo *score* macrofagico correla significativamente con l'attività di malattia sistemica, espressa dagli indici di fase acuta VES e PCR.

**Discussione:** il quadro istopatologico appare conservato nello spettro delle artriti infiammatorie croniche, tuttavia l'attuale stratificazione diagnostica non coincide del tutto con una stratificazione clinico-patologica basata sul grado di interessamento articolare.

### *Istopathological characteristics and serum correlations in different clinical subsets of seronegative spondyloarthropathies*

**Background:** seronegative spondyloarthropathies (SpA) are a group of different conditions, which share some clinical characteristics. In SpA with prevalent peripheral involvement, inflammatory arthritis has synovial membrane as main target. The immunocytochemical study of synovial membrane is important both for the comprehension of its etiopathogenesis and for clinical and prognostic stratification of patients, finally it's also useful for the assessment of the response to different treatments.

**Objectives:** identification of some immune and histological characteristics for the differential diagnosis between rheumatoid arthritis (RA) and SpA, and between SpA different diagnostic subgroups; finding of systemic biomarkers able to reflect the intensity and the composition of the synovial inflammatory infiltrate.

**Materials and methods:** immunocytochemistry of synovial membranes from 39 patients affected by SpA vs 59 patients with RA, by staining with anti-CD20 (which identify B lymphocytes), anti CD68 (macrophages), anti-CD3 (T lymphocytes), and anti-CD21 (dendritic follicular cells) antibodies.

**Results:** the amount of inflammatory infiltrate seems to be related to the disease extent, but not to the diagnosis, as B-T aggregation increases in arthritis with polyarticular involvement and it doesn't depend on diagnosis (SpA or RA). Otherwise, macrophage score is significantly related to systemic disease activity, expressed by acute phase indexes (ESR and CRP).

**Conclusions:** it appears histopathological features were conserved in the spectrum of chronic inflammatory arthritis, however to date diagnostic stratification is not coincident at all with clinical and pathological stratification, based on the grade of joint involvement.

---

## **Introduzione**

Le spondiloartriti sieronegative (SpA) sono un gruppo di patologie infiammatorie croniche caratterizzate da infiammazione, spesso asimmetrica, delle articolazioni sinoviali. Sono definite sieronegative a causa dell'assenza del fattore reumatoide (FR). Sono incluse nelle SpA cinque condizioni differenti: l'artrite psoriasica (PsA), la spondilite anchilosante (AS), l'artrite reattiva (ReA) o sindrome di Reiter, l'artrite associata alle malattie infiammatorie intestinali (IBD) e le spondiloartriti indifferenziate (uSpA) [1].

Gli aspetti comuni più caratteristici di queste malattie sono rappresentati da: assenza di fattore reumatoide e anticorpi anti-peptide citrullinato; assenza dei noduli reumatoidi nel sottocutaneo; artrite infiammatoria periferica, di solito asimmetrica, agli arti inferiori; sacroileite radiologicamente evidente; entesiti (infiammazione al sito di inserzione dei tendini, legamenti e capsule articolari sulla superficie dell'osso), tendiniti o dattilite; manifestazioni cutanee (psoriasi, pustolosi, cheratodermia blenorragica, eritema nodoso, pioderma gangrenoso), oculari (uveite, congiuntivite, episclerite) e mucose (ulcere orali, intestinali, genitali), malattia infiammatoria intestinale, uretrite, cervicite e tromboflebite. La stretta associazione con l'allele HLA-B27 ha ulteriormente supportato l'ipotesi di accomunare queste differenti condizioni in un unico gruppo. La proporzione di pazienti positivi per l'allele HLA-B27 tuttavia varia dal 95% nella spondilite anchilosante al 70-80% nell'artrite reattiva, dal 50% nell'artrite psoriasica e associata alle IBD, con sacroileite/spondilite, al 70-84% nelle uSpA [2]. È stata inoltre dimostrata aggregazione familiare per la psoriasi, la sacroileite, la spondilite, l'uveite, l'enterite e la sindrome di Reiter, nonché una forte ereditarietà [3].

I soggetti con SpA possono essere distinti in base alla presentazione clinica in pazienti con predominante interessamento assiale o periferico, secondo i nuovi criteri sviluppati e validati dall'ASAS (*Assessment of SpondyloArthritis International Society*) [4]. I criteri ASAS per la SpA periferica possono essere applicati a pazienti con artrite periferica (di solito asimmetrica e predominante agli arti inferiori) o entesite o dattilite. In aggiunta, deve essere presente almeno una caratteristica tra le seguenti: uveite, HLA-B27, precedente infezione genitourinaria o gastroenterica, psoriasi, malattia infiammatoria intestinale, sacroileite documentata dalle radiografie o dalla RM. In alternativa, devono presentarsi almeno due tra i seguenti elementi: artrite, entesite, dattilite, malattia infiammatoria intestinale, storia familiare positiva per SpA (Figura 1).

### ***La sinovite periferica nelle spondiloartriti sieronegative***

La membrana sinoviale rappresenta la sede principale dell'insulto flogistico in corso di artrite cronica. Di notevole interesse risulta lo studio istopatologico focalizzato sulla distribuzione e prevalenza della componente stromale ed infiltrativa a livello della membrana sinoviale. Lo studio delle biopsie sinoviali ha fornito infatti importanti informazioni sui meccanismi patogenetici delle malattie in-

fiammatorie croniche articolari e il grado di risposta dei pazienti al trattamento con DMARDS (*Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs*). Questi risultati supportano l'uso di campioni di membrana sinoviale come marcatori surrogati in studi che valutano nuove terapie in piccole coorti di pazienti [5]. Infine, lo studio delle alterazioni cellulari, istologiche e molecolari della sinovite può risultare di centrale importanza per lo sviluppo di nuovi strumenti diagnostici e prognostici.

In genere nelle artriti il *lining* intinale è marcatamente ispessito, soprattutto a causa di un incremento dei macrofagi CD68+, mentre il *sublining* è ampiamente infiltrato di linfociti B e T, plasmacellule e macrofagi, con edema stromale e proliferazione dei vasi sanguigni. Inoltre, si riscontra un'augmentata produzione di differenti citochine e l'espressione diffusa di molecole di adesione cellulare. In particolare, la membrana sinoviale nelle SpA è caratterizzata da iperplasia del *lining* meno pronunciata e un numero minore di monociti-macrofagi rispetto all'artrite reumatoide (AR) [6]. Nonostante la psoriasi e la PsA siano ritenute mediate da un meccanismo T-dipendente, nella sinovia sono riportati livelli inferiori di linfociti T, in confronto all'AR, ma è stata dimostrata un'espansione oligoclonale T-cellulare che sarebbe alla base dell'infiammazione.

Nel tessuto sinoviale è stata osservata una vascolarizzazione maggiore rispetto all'AR e caratterizzata macroscopicamente da vasi sanguigni tortuosi [7]. L'espressione di VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), insieme ad altri marcatori angiogenetici, quali il fattore di von Willebrand, l'integrina  $\alpha V\beta 3$  e il BFGF (*Basic Fibroblast Growth Factor*), è aumentata [8]. I vasi sanguigni nella sinovia reumatoide e delle SpA esprimono diverse molecole di adesione, come ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina, coinvolte nell'adesione leucocitaria e nella diapedesi.

Si ritiene che la degradazione cartilaginea e ossea sia mediata dalle metalloproteinasi di matrice (MMPs), largamente presenti sia nell'AR che nella PsA. In particolare, un'elevata espressione di MMPs è stata associata a malattia più erosiva [9]. Infatti, la distruzione articolare è progressiva in almeno la metà dei pazienti con PsA e il danno articolare radiologicamente evidente è sovrapponibile a quanto osservato nell'AR [10]. Infine, una caratteristica di spicco della sinovia reumatoide e nella PsA è l'espressione abbondante di citochine proinfiammatorie, tra le quali TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-18.

In conclusione, considerando globalmente queste osservazioni, l'infiltrato sinoviale in entrambe le condizioni mostra più similitudini che differenze, anche se la sinovia della PsA può mostrare un'iperplasia sinoviale del *lining* meno pronunciata e meno cellule T sinoviali rispetto all'AR [8].

Al contrario, Kruthof *et al.* [11] hanno concluso che la sinovite nelle SpA è caratterizzata, rispetto all'AR, da una maggiore vascolarizzazione e infiltrazione di macrofagi CD163+ e leucociti polimorfonucleati (PMNs), mentre i valori di iperplasia del *lining*, aggregati linfoidi, cellule dendritiche CD83+ sono inferiori. Tutti i parametri istopatologici analizzati in questo studio mostravano un ampio *range* di *scores* all'interno del gruppo delle SpA, che riflette l'ampia variabilità interindividuale. Infatti, non sono state osservate differenze significative né tra la PsA e SpA non psoriasiche, né tra la PsA ad interessamento oligoarticolare e poliarticolare. Questi dati indicano che l'istopatologia sinoviale della PsA, sia oligoarticolare che poliarticolare, è simile a quella degli altri sottotipi di SpA, mentre queste ultime possono essere differenziate dall'AR in base ad alcune caratteristiche sinoviali.

Nella sinovia reumatoide si riscontra anche una linfogeneesi ectopica, responsabile dello sviluppo locale antigene-dipendente delle cellule B e della produzione di autoanticorpi. Per linfogeneesi ectopica si intende l'organizzazione delle cellule B e T in centri germinativi competenti [12]. Aggregati linfoidi con dimensioni e grado di organizzazione variabili non sono specifici dell'AR, ma sono stati descritti anche nelle biopsie sinoviali dei pazienti con PsA da Cañete JD *et al.* [13]. Infatti, si può osservare una ben definita segregazione B/T cellulare, in particolar modo negli aggregati più grandi.

Sulla base delle analogie strutturali e molecolari tra i centri germinativi nei tessuti linfoidei e la linfomatosi nella sinovite reumatoide [14, 15], si ritiene che gli infiltrati linfoidei possano rivestire un ruolo nello sviluppo locale dei linfociti B antigene-mediato e nelle risposte autoanticorpali. Potrebbero anche contribuire alla presentazione antigenica, alla costimolazione delle cellule T e alla sintesi di mediatori solubili. Anche nella PsA è stata ipotizzata l'espansione clonale delle cellule B e T sinoviali a supporto di un processo locale antigene-mediato, ma, a differenza dell'AR, la mancanza di autoanticorpi rilevabili rende dubbio il ruolo dei linfociti B.

Le strutture linfomatosi non sembrano indicare un *subset* clinico particolare, ma possono scomparire dopo la completa remissione della malattia indotta da terapie anti-TNF $\alpha$ , mentre il *pattern* linfomatosi rimane stabile nella sinovite persistente. Come ipotizzato nell'AR, la linfomatosi sinoviale non è correlata alla durata o severità di malattia. Invece, al contrario di quanto dimostrato nell'AR, in cui la presenza del FR è stata associata a maggior aggregazione degli infiltrati, è stata esclusa un'associazione tra positività per FR e anti-CCP e linfomatosi [13].

Infine, è ancora oggetto di approfondimento se nelle SpA le caratteristiche istopatologiche della membrana sinoviale riflettano l'attività di malattia sistemica. Lo studio di Beaten D *et al.* [16] indaga se le caratteristiche istopatologiche sinoviali riflettano specifici fenotipi clinici e/o l'attività globale di malattia. Nelle SpA l'attività globale di malattia sembra essere associata essenzialmente con l'infiltrato infiammatorio di macrofagi – specialmente i CD163+ – e di PMNs, nonché con il grado di iperplasia del *lining*, indipendentemente dal sottotipo di SpA, dal trattamento e dalla durata di malattia. In conclusione, dato che la correlazione tra attività di malattia globale e istopatologia sinoviale è più robusta nelle SpA che nell'AR [17], e che precedenti studi hanno dimostrato una riduzione dei macrofagi e PMNs in risposta agli anti-TNF $\alpha$ , l'istopatologia sinoviale può essere proposta come un marcatore surrogato nella valutazione di nuove terapie mirate per le SpA.

## Scopo del lavoro

Lo scopo del nostro studio è stabilire se nelle SpA siano riconoscibili caratteristiche immuno-istologiche specifiche che differenziano questo gruppo di artriti infiammatorie dall'AR e se, nell'ambito delle SpA, esistano parametri sinoviali in grado di distinguere i diversi sottogruppi diagnostici. Sono state inoltre indagate le possibili ripercussioni sistemiche dei diversi tipi di sinovite, alla ricerca di biomarcatori capaci di riflettere l'intensità e la composizione dell'infiltrato infiammatorio sinoviale.

## Materiali e metodi

### *Pazienti*

Per lo studio sono stati selezionati 39 pazienti (Tabella 1), di cui 22 affetti da PsA e 17 affetti da SpA periferica non psoriasica (1 AS + 16 uSpA). I pazienti sono stati classificati secondo i criteri CASPAR per la diagnosi di PsA [18]. Di questi, 17 erano maschi, 22 femmine, con un'età media di 47.2 (compresa tra 17 e 82 anni). Il *range* di durata della malattia dei pazienti era compreso tra 2 e 300 mesi (25 anni), con una durata mediana di 36 mesi. Al momento del prelievo di tessuto sinoviale, i pazienti erano in trattamento con FANS, steroidi e/o uno o più DMARDs, tra i quali methotrexate, sulfasalazina e idrossiclorochina. Al momento del prelievo, sono stati raccolti i principali parametri di malattia clinimetrici, clinici, radiografici e di laboratorio.

Ci si è avvalsi come confronto di una coorte storica costituita da 59 pazienti affetti da AR (Tabella 2), secondo i criteri dell'*American College of Rheumatology* del 1987 [19], di cui 17 maschi e 42 femmine, con età mediana di 61 anni. Il *range* di durata della malattia dei pazienti era compreso tra 2 e 300 mesi, con una durata mediana di 41 mesi. Al momento del prelievo di tessuto sinoviale, i pazienti erano in trattamento con FANS, steroidi e/o uno o più DMARDs, tra i quali methotrexate, sulfasalazina, idrossiclorochina e leflunomide. Cinque pazienti erano in trattamento con farmaci biologici (infliximab, etanercept e abatacept).

### **Immunoistochimica**

I campioni di tessuto sinoviale sono stati raccolti durante interventi di biopsia sinoviale ecoguidata o artroscopica e sinoviectomia artroscopica o chirurgica. Mediante campionamento casuale si sono ottenuti 39 campioni di membrana sinoviale, di cui 35 prelevati dal ginocchio, 2 dalle MCF e 2 dalle IFP. Gli interventi sono stati effettuati a fini diagnostici o terapeutici previo consenso informato da parte del paziente, con l'approvazione del comitato etico.

Tutti i tessuti sono stati fissati in formalina per 24 ore, deidratati mediante etanolo a concentrazioni crescenti ed inclusi in blocchetti indipendenti di paraffina. I tessuti tonsillari infiammati, necessari come controllo positivo per le analisi immunoistochimiche, sono stati ottenuti da pazienti sottoposti a tonsillectomia, successivamente fissati in formalina ed inclusi in blocchetti indipendenti di paraffina.

Tramite il taglio al microtomo si sono ottenute sezioni sequenziali di 4-5 µm di spessore, che sono state raccolte su vetrini silanati Superfrost Plus (BDH, Poole, UK) e lasciate essiccare per 48 ore circa a temperatura ambiente oppure in stufa a 37° per 12 ore. Una sezione di ogni tessuto è stata subito contro-colorata in ematossilina ed eosina (EE) ed utilizzata per le valutazioni istologiche.

Le sezioni sequenziali sono state marcate utilizzando i seguenti anticorpi primari (Dako, Cambridge, UK), al fine di identificare le differenti cellule immuni: le cellule dendritiche follicolari con Monoclonal Mouse Anti-Human CD21 (IgG1k, clone 1F8; diluizione 1:100), le cellule B con Monoclonal Mouse Anti-Human CD20 (IgG2b, clone L26; diluizione 1:100), i macrofagi con Monoclonal Mouse Anti-Human CD68 (IgG3; diluizione 1:150) e le cellule T con Polyclonal Rabbit Anti-Human CD3 (A0452; diluizione 1:50). Gli anticorpi primari sono stati sviluppati per il CD20, il CD21 e il CD68 con appropriati anticorpi secondari F(ab')<sub>2</sub> di *rabbit anti-mouse* biotinilati (Dako, diluizione 1:200), incubati con fosfatasi alcalina coniugata con streptavidina (ABC, Vector Laboratories, Burlingame, California, USA, AK-5000). Per il CD3 sono stati utilizzate immunoglobuline (Ig) di *swine anti-rabbit* (Dako, diluizione 1:50), incubate con perossidasi biotinilata coniugata con streptavidina (Dako K0377).

La valutazione istologica è stata effettuata su sezioni contro-colorate in EE da due osservatori in maniera indipendente, ritenendo accettabile una variabilità inferiore al 5%. L'analisi è stata effettuata mediante l'osservazione dell'intera area di *sublining* del tessuto in esame a un solo livello di taglio e in un solo campione di membrana sinoviale per ogni paziente.

I campioni sinoviali sono stati analizzati in base alla dimensione degli aggregati di cellule mononucleate. Ogni tessuto è contraddistinto da uno *score*, che consente di assegnare ad ogni campione un punteggio semiquantitativo da 0 a 3 [20]. Gli aggregati sono stati suddivisi in 3 gruppi in base alla conta radiale del numero di cellule a partire dal vaso più centrale fino al punto più periferico dell'aggregato stesso. La determinazione è stata fatta nel punto di maggiore infiltrazione. Aggregati cellulari con una conta radiale fino a 5 cellule sono stati definiti di grado 1; i gradi 2 presentavano una conta radiale da 6 a 10 cellule, mentre i gradi 3 avevano più di 10 cellule (Figura 2). Gli aggregati con una conta globale inferiore a 15 cellule non sono stati considerati.

Sono state valutate mediante immuno-marcatura specifica le singole cellule immuni dell'infiltrato infiammatorio: linfociti T CD3+, linfociti B CD20+, macrofagi CD68+ e cellule follicolari dendritiche CD21+. Per il CD20 è stato adottato uno *score* analogo a quello utilizzato per l'analisi istologica, in base alla dimensione degli aggregati di cellule mononucleate. In base al numero di aggregati nel tessu-

to, i campioni sono stati poi definiti a basso (<3 aggregati) o alto grado ( $\geq 3$ ). Per il CD3 e il CD68 è stato adottato uno *score* semiquantitativo da 0 a 3, in base all'entità dell'infiltrato. Si è considerato grado 0 un tessuto non infiltrato; grado 1 un tessuto scarsamente infiltrato; grado 2 mediamente infiltrato e grado 3 molto infiltrato, con organizzazione aggregazionale. Gli aggregati sono stati definiti positivi per CD21 se almeno una cellula era positiva all'interno dell'aggregato.

### ***Analisi statistica***

Le caratteristiche cliniche dei pazienti considerati sono state descritte tramite media e deviazione standard (DS) per variabili continue con distribuzione normale secondo il test di D'Agostino-Pearson o come mediana e *range* interquartile (RI) per variabili non distribuite normalmente. Le differenze tra i gruppi sono state valutate attraverso test t di student o Mann-Whitney test, in base alla distribuzione delle variabili in esame. Differenze tra frequenze sono state valutate utilizzando il test  $\chi^2$ . Le associazioni tra variabili ordinali sono state valutate attraverso il calcolo del coefficiente di correlazione per ranghi di Spearman, mentre per variabili continue è stata utilizzata l'analisi di regressione lineare. L'associazione di multiple variabili indipendenti con variabili dicotomiche (oligoarticolare/poliartricolare, negatività/positività per FR, ecc.) è stata calcolata mediante analisi di regressione logistica. Sono state considerate statisticamente significative differenze con  $p < 0.05$ .

## **Risultati**

### ***Caratteristiche istopatologiche sinoviali e correlati clinici nel gruppo delle spondiloartriti rispetto all'artrite reumatoide***

Lo studio istopatologico preliminare è stato rivolto all'analisi comparativa delle caratteristiche infiammatorie della membrana sinoviale nelle SpA rispetto all'AR.

Complessivamente non emergevano differenze significative nel grado di infiltrazione del *sublining* da parte di linfociti T CD3-positivi e macrofagi CD68-positivi. Lo *score* T linfocitario mediano era infatti pari a 2 (RI 1-2) nel gruppo delle SpA e 2 (RI 1-2) nelle AR ( $p=0.4$ ). Analogamente, lo *score* macrofagico mediano era 1.5 (1-2.5) nelle SpA e 2 (1-3) nell'AR ( $p=0.6$ ).

L'entità di infiltrazione ed aggregazione B linfocitaria CD20-positiva, benché non statisticamente significativa, appariva leggermente inferiore nelle SpA (mediana 1.5, RI 0.5-2.5) rispetto all'AR (mediana 2.3, RI 1.5-2.5) ( $p=0.2$ ). Aggregati B linfocitari di grado 3 (*score* CD20  $\geq 2.5$ ) si riscontravano in 14/39 (35.9%) campioni di SpA ed in 29/59 (49.2%) campioni di AR ( $p=0.3$ ). *Networks* di cellule follicolari dendritiche CD21-positive, espressione di centri germinativi istologici, si riscontravano in 8 su 35 campioni valutabili di SpA (22.9%) ed in 15 su 55 campioni valutabili di AR (27.3%), senza differenze significative. Nella tabella 3 sono riassunte le caratteristiche istopatologiche complessive nel gruppo delle SpA e nell'AR.

### ***Caratteristiche istopatologiche sinoviali nei diversi subsets clinici delle spondiloartriti: spondiloartriti psoriasiche vs spondiloartriti non psoriasiche***

Le differenze istopatologiche sinoviali tra SpA psoriasiche (n. 22) e SpA non psoriasiche (n. 17) sono riassunte nella tabella 4. Né l'entità dell'infiltrato macrofagico CD68-positivo nel *sublining* né il grado di infiltrazione T linfocitaria CD3-positiva apparivano significativamente diversi tra i due gruppi.

Analogamente, lo *score* semi-quantitativo dei linfociti B CD20-positivi mostrava valori mediani sovrapponibili: *score* 2 (0.5-2.5) nei campioni sinoviali dei pazienti con SpA psoriasica e *score* 1.25 (0.25-2.5) nelle SpA non psoriasiche ( $p=0.5$ ). La frequenza di aggregati B linfocitari  $\geq$  grado 2, benché lievemente aumentata nelle SpA psoriasiche rispetto alle SpA non psoriasiche (68.2% vs 47.1%), non appariva statisticamente diversa ( $p=0.3$ ). La prevalenza di campioni con aggregati B linfocitari di grado 3 mostrava un comportamento analogo. Centri germinativi istologici CD21-positivi erano presenti in 4 dei 19 campioni (21.1%) valutabili di pazienti con SpA psoriasica e in 4 dei 16 campioni (25%) valutabili di pazienti con SpA non psoriasica.

Se confrontato con la popolazione di riferimento di AR, il gruppo delle SpA psoriasiche non mostrava differenze significative per nessuna delle caratteristiche istopatologiche analizzate (Tabella 4). In particolare, sia lo *score* di linfociti B CD20-positivi che la prevalenza di aggregati B linfocitari di grado  $\geq 2$  o di grado 3 risultavano sovrapponibili. Il gruppo delle SpA non psoriasiche, invece, appariva caratterizzato da una frequenza significativamente inferiore di aggregati B linfocitari di grado  $\geq 2$  rispetto all'AR (47.1% vs 78%,  $p=0.03$ ). Se l'analisi veniva ristretta alla presenza di aggregati B linfocitari di grado 3, la differenza, seppur marcata (29.4% nelle SpA non psoriasiche e 49.2% nell'AR), non era statisticamente significativa ( $p=0.2$ ). Il grado di infiltrazione macrofagica e T linfocitaria erano invece sostanzialmente sovrapponibili a quelli osservati nell'AR.

#### ***Caratteristiche istopatologiche sinoviali nei diversi subsets clinici delle spondiloartriti: spondiloartriti ad interessamento oligoarticolare vs spondiloartriti ad interessamento poliarticolare***

Le differenze istopatologiche sinoviali tra SpA ad interessamento oligoarticolare (n. 23) e SpA ad interessamento poliarticolare (n. 16) sono riassunte nella tabella 5.

La classificazione sulla base del *pattern* di interessamento articolare periferico, indipendentemente dalla diagnosi, permetteva di evidenziare differenze istopatologiche significative nel gruppo delle SpA. Nonostante il grado di infiammazione globale, espresso dalla densità di macrofagi CD68-positivi nel *sublining*, fosse del tutto analogo, i pazienti con SpA ad interessamento oligoarticolare mostravano livelli di infiltrazione sinoviale di linfociti T CD3-positivi e B CD20-positivi significativamente inferiori rispetto ai pazienti con SpA poliarticolare. Lo *score* mediano di linfociti T era infatti pari a 1 (0-2) in caso di interessamento oligoarticolare e 2 (1-3) in caso di interessamento poliarticolare ( $p=0.03$ ). Analogamente, lo *score* B linfocitario era 1 (0-2.125) nelle forme oligoarticolari e 2.25 (1.5-2.5) nelle forme poliarticolari ( $p=0.04$ ). L'analisi della prevalenza di aggregati B linfocitari forniva risultati simili. Aggregati  $\geq$  grado 2 si riscontravano nel 43.5% dei campioni di pazienti caratterizzati da coinvolgimento periferico oligoarticolare e nell'81.3% dei campioni con interessamento periferico poliarticolare ( $p=0.04$ ). La frequenza di aggregati B linfocitari di grado 3, seppur non statisticamente diversa, appariva maggiore nei pazienti con SpA poliarticolare (50% vs 26.1%,  $p=0.23$ ). Non era diversa invece la frequenza di centri germinativi istologici CD21-positivi, presenti in 3 su 13 (23.1%) campioni valutabili di SpA poliarticolare ed in 4 su 20 (20%) campioni valutabili di SpA oligoarticolare.

Sostanziali apparivano anche le differenze rispetto alle AR di controllo.

Il *pattern* di interessamento articolare periferico condizionava infatti il quadro istopatologico generale. I campioni sinoviali ottenuti da pazienti con SpA ad interessamento oligoarticolare rappresentavano complessivamente un sottogruppo diverso, caratterizzato da una minore intensità di infiltrazione T e B linfocitaria ( $p=0.03$  e  $p=0.02$  rispettivamente) e da una minore frequenza di aggregati di linfociti B di grado  $\geq 2$  ( $p=0.0006$ ). La minore frequenza di aggregati di grado 3 appariva *borderline* non significativa ( $p=0.09$ ), verosimilmente a causa della ridotta numerosità campionaria.

Nelle SpA ad interessamento poliarticolare le caratteristiche istopatologiche sinoviali erano invece nel complesso indistinguibili da quelle dell'AR di controllo. In particolare, sovrapponibile risultava l'intensità di infiltrazione sia T linfocitaria [2 (1-3) vs 2 (1-2),  $p=0.5$ ] che B linfocitaria [2.25 (1.5-2.5) vs 2.25 (1.5-2.5),  $p=1$ ]. Aggregati B linfocitari  $\geq$  grado 2 erano presenti nell'81.3% dei campioni di SpA poliarticolare e nel 78% dei campioni di AR ( $p=1$ ), e aggregati di grado 3 nel 50% e 49.2% dei campioni rispettivamente ( $p=0.8$ ).

### **Correlati sierici**

Come nell'AR [21], l'entità di infiltrazione macrofagica nel *sublining* sinoviale correlava in modo significativo con i livelli di VES ( $\rho$  0.48,  $p=0.03$ ) e di PCR ( $\rho$  0.44,  $p=0.04$ ). Il grado di infiltrazione di linfociti T CD3-positivi mostrava una simile anche se meno robusta correlazione con la PCR ( $\rho$  0.37,  $p=0.04$ ). Al contrario, lo *score* di linfociti B CD20-positivi non appariva significativamente associato ai livelli di infiammazione sistemica espressi da VES e PCR. Né la presenza di aggregati B linfocitari di grado  $\geq 2$  (59% dei campioni) né la presenza di aggregati B linfocitari di grado 3 (35.9%) erano associate alla positività del FR e/o degli ACPA.

## **Discussione**

Le spondiloartriti sieronegative (SpA) rappresentano un gruppo eterogeneo di condizioni cliniche caratterizzate da analogie (interessamento dello scheletro assiale, assenza di autoanticorpi tipicamente associati all'artrite reumatoide, presenza di entesite, coinvolgimento infiammatorio extra-articolare [cute, tratto gastroenterico, apparato visivo]) e differenze (coinvolgimento periferico mono-, oligo- o poliarticolare, diversità nel *target* del coinvolgimento extra-articolare, diversità di associazione genetica). Queste caratteristiche hanno posto le SpA al centro di intenso dibattito finalizzato alla loro classificazione e, conseguentemente, alla definizione dell'approccio terapeutico ottimale. In questo contesto, negli ultimi anni sono emersi due principali teorie, che considerano lo spettro delle SpA rispettivamente come un continuo della stessa patologia di base, caratterizzata da eterogeneità fenotipica, o come un insieme di patologie differenti accomunate da similitudini nelle manifestazioni cliniche [3].

Nel contesto di questa problematica, accanto a studi di natura prettamente clinica o genetica, di notevole interesse risulta lo studio istopatologico focalizzato sulla distribuzione e prevalenza della componente stromale ed infiltrativa a livello della membrana sinoviale. La membrana sinoviale rappresenta infatti la sede principale dell'insulto flogistico in corso di artrite cronica. Lo studio delle alterazioni cellulari, istologiche e molecolari della sinovite può quindi risultare di centrale importanza sia per la comprensione eziopatogenetica delle diverse forme di malattia che per lo sviluppo di nuovi strumenti diagnostici e prognostici.

Al fine di evidenziare possibili differenze generali, abbiamo in primo luogo paragonato la distribuzione cellulare, valutata tramite uno *score* semiquantitativo, tra il gruppo delle SpA e AR. In linea con risultati precedenti [11], il nostro studio ha potuto evidenziare una sostanziale similarità tra i due gruppi. Nessuna differenza significativa è, infatti, emersa per quanto riguarda la distribuzione di linfociti T (CD3+), linfociti B (CD20+) e cellule mononucleate CD68+ nel *sublining*. Inoltre, non è stata riscontrata nessuna differenza significativa nel grado di aggregazione B cellulare e nella presenza di cellule dendritiche follicolari CD21+, parametro istologico precedentemente relazionato alla presenza di centri germinativi ectopici [14].

Questi dati supportano, quindi, il concetto di come il processo di infiltrazione linfo-monocitaria nella membrana sinoviale possa essere un fenomeno indipendente dal substrato clinico-patologico specifico. Malgrado questi risultati, è apparso evidente come le analogie generali tra SpA e AR fossero associate ad un alto grado di variabilità in ciascun gruppo e per ciascun parametro analizzato, suggerendo la possibilità di evidenziare differenze attraverso una stratificazione più specifica.

Al fine di definire l'esistenza di potenziali differenze tra sottogruppi diagnostici all'interno delle SpA, abbiamo analizzato il quadro istopatologico stratificando le SpA in SpA psoriasiche e SpA non psoriasiche. Anche tramite questa stratificazione ed in linea con precedenti studi [11], nessuna delle caratteristiche esaminate è apparsa significativamente differente. Nessuna differenza per quanto riguarda la distribuzione delle cellule T, delle cellule B e dei macrofagi CD68+ è stata, inoltre, osservata tra le SpA psoriasiche e l'AR confermando come il quadro infiammatorio sinoviale possa essere conservato in termini qualitativi e quantitativi attraverso lo spettro delle artropatie infiammatorie croniche.

Malgrado i sopradescritti risultati, l'ulteriore comparazione tra SpA non psoriasiche e AR ha mostrato come, pur non essendo rilevabili differenze significative nello *score* semiquantitativo delle varie popolazioni cellulari, la percentuale di campioni caratterizzati dalla presenza di aggregati B cellulari di grado 2 e grado 3 era significativamente superiore nelle AR. Dato che il gruppo delle SpA non psoriasiche, compreso nella nostra casistica, era prevalentemente caratterizzato da forme indifferenziate, non è stato possibile formulare un'ipotesi definita circa lo specifico substrato clinico dell'osservata differenza. Questo dato ci ha indotto, quindi, ad approfondire l'analisi tramite una stratificazione più mirata sul fenotipo clinico, indipendentemente dalla categoria diagnostica.

Abbiamo pertanto diviso i pazienti a seconda del numero di articolazioni periferiche coinvolte (>4 per il gruppo delle poliarticolari, in linea con parametri convenzionalmente riconosciuti). Il razionale alla base della classificazione trova inoltre riscontro nella diversa prognosi e nel diverso approccio terapeutico attualmente raccomandato [22]. Questa stratificazione ha potuto evidenziare differenze significative tra i due gruppi SpA, in particolare nel grado di infiltrazione linfocitaria. Mentre nessuna differenza era riscontrabile nel grado di infiltrazione macrofagica, sia lo *score* CD3, che lo *score* CD20 che la distribuzione di aggregati B cellulari di grado 2 e grado 3 risultavano significativamente aumentati nel gruppo della SpA poliarticolari. Di rilevanza considerevole, l'analisi comparativa tra l'AR e i due sottogruppi di SpA ha potuto evidenziare come le stesse differenze evidenziate fossero anche riscontrabili tra la SpA mono-oligoarticolare e l'AR, ma non tra la SpA poliarticolare e l'AR, che presentavano valori sovrapponibili per tutti i parametri studiati. Quindi, mentre la stratificazione su base diagnostica delle SpA (SpA psoriasica vs SpA non psoriasica) non ha potuto evidenziare differenze significative, una stratificazione su base clinico-patologica ha mostrato l'esistenza di variabilità nella componente infiltrativa linfocitaria sia T che B cellulare. In linea con la natura strettamente poliarticolare dell'AR, la SpA poliarticolare e l'AR sono apparse simili dal punto di vista dell'infiltrazione linfocitaria, mostrando un incremento della componente B e T cellulare rispetto alla forma mono-oligoarticolare.

Questi risultati trovano supporto in studi recenti effettuati in contesti patologici differenti. Finnegan *et al.* [23] in uno studio su 42 pazienti con artrite idiopatica giovanile, patologia con grado di eterogeneità clinico-patologica simile alle SpA dell'adulto, hanno potuto infatti dimostrare come le forme poliarticolari o *extended-to-be* oligoarticolari (forme a rapida evoluzione poliarticolare) siano caratterizzate da incremento significativo della componente infiltrativa T e B linfocitaria sinoviale, apportando evidenza della possibile relazione tra il quadro di coinvolgimento articolare periferico e *pattern* istopatologico.

In conclusione, il nostro studio conferma che l'attuale stratificazione diagnostica delle artropatie infiammatorie croniche possa, almeno in parte, non coincidere con una stratificazione clinico-patologica. Nello specifico, tuttavia, evidenzia che la componente infiltrativa linfocitaria sinoviale (aggregazione T-B cellulare) è quantitativamente associata al grado di coinvolgimento articolare periferico essendo incrementata nelle artriti ad interessamento poliarticolare indipendentemente dalla ca-

tegoria diagnostica (AR o SpA). Questo dato è assolutamente originale nelle patologie in questione. È importante sottolineare alcuni limiti dello studio presentato. In prima istanza la relativa scarsità della popolazione nella categoria SpA, dovuta principalmente alla minore affluenza presso il nostro Centro di malati con diagnosi di certezza di SpA candidabili a procedure biotiche. In secondo luogo, il non perfetto appaiamento delle categorie diagnostiche per quanto riguarda il trattamento, dovuto alla diversità degli algoritmi terapeutici in uso per le diverse patologie in esame. Infine, la mancanza di una definizione fisio-patologica e patogenetica dei risultati ottenuti, dovuta al sistema sperimentale utilizzato che non consente studi funzionali. Questo ultimo punto rappresenta, del resto, una importante prospettiva di sviluppo del progetto. Ulteriori approfondimenti finalizzati alla comprensione delle basi biologiche dell'eterogeneità patologica osservata potrebbero, infatti, fornire indicazioni fondamentali sulla patogenesi delle artropatie infiammatorie e, possibilmente, favorire lo sviluppo di nuovi strumenti diagnostici e prognostici.

## Tabelle e figure

**Tabella 1. Caratteristiche della popolazione studiata.**

<b>Caratteristiche demografiche</b>	
<i>Età, media (DS)</i>	47.2 (+/-16.8)
<i>Rapporto F/M (%)</i>	22/17 (56%)
<b>Caratteristiche cliniche</b>	
<i>Durata di malattia in mesi, mediana (RI)</i>	36 (6.8-102)
<i>Numero articolazioni tumefatte, mediana (RI)</i>	3 (2-7.3)
<i>Numero articolazioni dolenti, mediana (RI)</i>	1 (0-3)
<i>DAS, media (DS)</i>	2.4 (+/-1.1)
<i>Interessamento oligoarticolare/poliarticolare</i>	23/16
<i>FANS, numero casi/totale (%)</i>	28/39 (72%)
<i>Corticosteroidi, numero casi/totale (%)</i>	9/39 (23%)
<i>DMARDS, numero casi/totale (%)</i>	15/39 (38%)
<b>Caratteristiche sierologiche</b>	
<i>VES mm/1h, mediana (RI)</i>	23.0 (12-31.8)
<i>PCR mg/dl, mediana (RI)</i>	0.6 (0.3-2.3)
<i>FR, numero casi/totale (%)</i>	4/37 (11%)
<i>ACPA, numero casi/totale (%)</i>	2/36 (6%)

**Tabella 2. Caratteristiche della coorte di artriti reumatoidi di confronto.**

<b>Caratteristiche demografiche</b>	
<i>Età, media (DS)</i>	61 (54.3-64)
<i>Rapporto F/M (%)</i>	42/17 (71%)
<b>Caratteristiche cliniche</b>	
<i>Durata di malattia in mesi, mediana (RI)</i>	41 (9.5-105)
<i>Numero articolazioni tumefatte, mediana (RI)</i>	12 (+/- 8.2)
<i>Numero articolazioni dolenti, mediana (RI)</i>	6 (1,8-9.8)
<i>DAS, media (DS)</i>	3.3 (+/-1.2)
<i>RAI, mediana (RI)</i>	4 (1.5-8)
<i>GH, media (DS)</i>	59,4 (+/- 22,1)
<i>VAS dolore, media (DS)</i>	55.8 (+/- 26.8)
<i>HAQ, media (DS)</i>	1.1 (+/- 0.8)
<i>FANS, numero casi/totale (%)</i>	30/41 (73%)
<i>Corticosteroidi, numero casi/totale (%)</i>	38/57 (67%)
<i>DMARDS, numero casi/totale (%)</i>	35/58 (60%)
<i>Biologici, numero casi/totale (%)</i>	5/57 (9%)
<b>Caratteristiche sierologiche</b>	
<i>VES mm/1h, mediana (RI)</i>	32 (21.0-54.5)
<i>PCR mg/dl, mediana (RI)</i>	1.1 (0.6-3.9)
<i>FR, numero casi/totale (%)</i>	29/55 (53%)
<i>ACPA, numero casi/totale (%)</i>	22/52 (42%)

**Tabella 3. Caratteristiche istopatologiche sinoviali nelle spondiloartriti rispetto all'artrite reumatoide.**

<b>Marcatore</b>	<b>SpA (n. 39)</b>	<b>AR (n. 59)</b>	<b>p</b>
<i>Macrofagi CD68 nel sublining, score 0-3, mediana (RI)</i>	1.5 (1-2.5)	2 (1-3)	0.55
<i>Linfociti T CD3, score 0-3, mediana (RI)</i>	2 (1-2)	2 (1-2)	0.38
<i>Linfociti B CD20, score 0-3, mediana (RI)</i>	1.5 (0.5-2.5)	2.25 (1.5-2.5)	0.18
<i>Aggregati B linfocitari ≥ grado 2 (+/-) (%)</i>	23/16 (59)	46/13 (78)	0.07
<i>Aggregati B linfocitari grado 3 (+/-) (%)</i>	14/25 (35.9)	29/30 (49.2)	0.3
<i>Centri germinativi CD21 (+/-) (%)</i>	8/27 (22.9)	11/44 (27.3)	0.83

**Tabella 4. Caratteristiche istopatologiche della popolazione in base alla classificazione diagnostica (Abbreviazioni: \*p tra SpA psoriasica vs SpA non psoriasica, \*\*p tra SpA psoriasica e AR, \*\*\*p tra SpA non psoriasica e AR).**

	<i>SpA psoriasica</i>	<i>SpA non psoriasica</i>	<i>AR</i>	<i>p*</i>	<i>p**</i>	<i>p***</i>
<i>Numero di pazienti</i>	22	17	59			
<i>Macrofagi CD68 nel sublining, score 0-3, mediana (RI)</i>	1.5 (0-2)	1.5 (1-3)	2 (1-3)	0.16	0.11	0.83
<i>Linfociti T CD3, score 0-3, mediana (RI)</i>	2 (1-2.5)	1.5 (1-2)	2 (1-2)	0.61	0.72	0.28
<i>Linfociti T CD20, score 0-3, mediana (RI)</i>	2 (0.5-2.5)	1.25 (0.25-2.5)	2.25 (1.5-2.5)	0.47	0.46	0.15
<i>Aggregati B linfocitari ≥ grado 2 (+/-) (%)</i>	15/7 (68.2)	8/9 (47.1)	46/13 (78)	0.32	0.54	0.03
<i>Aggregati B linfocitari grado 3 (+/-) (%)</i>	9/13 (40.9)	5/12 (29.4)	29/30 (49.2)	0.68	0.68	0.24
<i>Centri germinativi CD21 (+/-) (%)</i>	4/15 (21.1)	4/12 (25)	11/44 (27.3)	0.90	0.82	0.89

**Tabella 5. Caratteristiche istopatologiche della popolazione sulla base del tipo di interessamento articolare (Abbreviazioni: \*p tra SpA oligoarticolare vs SpA poliarticolare, \*\*p tra SpA oligoarticolare e AR, \*\*\*p tra SpA poliarticolare e AR).**

	<i>SpA oligoarticolare</i>	<i>SpA poliarticolare</i>	<i>AR</i>	<i>p*</i>	<i>p**</i>	<i>p***</i>
<i>Numero di pazienti</i>	23	16	59			
<i>Macrofagi CD68 nel sublining, score 0-3, mediana (RI)</i>	1 (0.75-3)	2 (0.75-2.25)	2 (1-3)	0.73	0.33	0.64
<i>Linfociti T CD3, score 0-3, mediana (RI)</i>	1 (0-2)	2 (1-3)	2 (1-2)	0.03	0.03	0.51
<i>Linfociti T CD20, score 0-3, mediana (RI)</i>	1 (0-2.125)	2.25 (1.5-2.5)	2.25 (1.5-2.5)	0.04	0.02	0.98
<i>Aggregati B linfocitari ≥ grado 2 (+/-) (%)</i>	10/13 (43.5)	13/3 (81.3)	46/13 (78)	0.04	0.006	0.95
<i>Aggregati B linfocitari grado 3 (+/-) (%)</i>	6/17 (26.1)	8/8 (50)	29/30 (49.2)	0.23	0.09	0.82
<i>Centri germinativi CD21 (+/-) (%)</i>	4/16 (20)	3/10 (23.1)	11/44 (27.3)	0.82	0.73	0.97

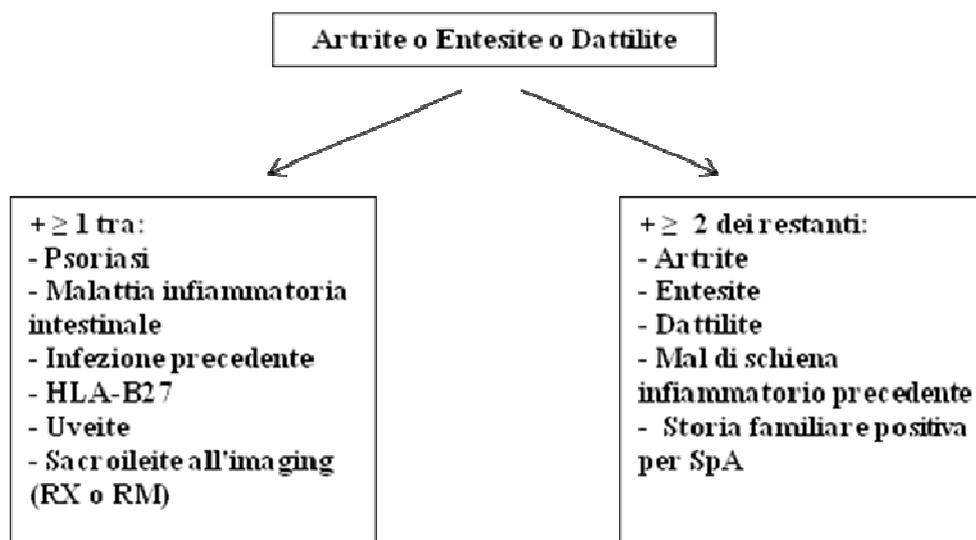


Figura 1. Criteri classificativi ASAS per le spondiloartriti periferiche [24].

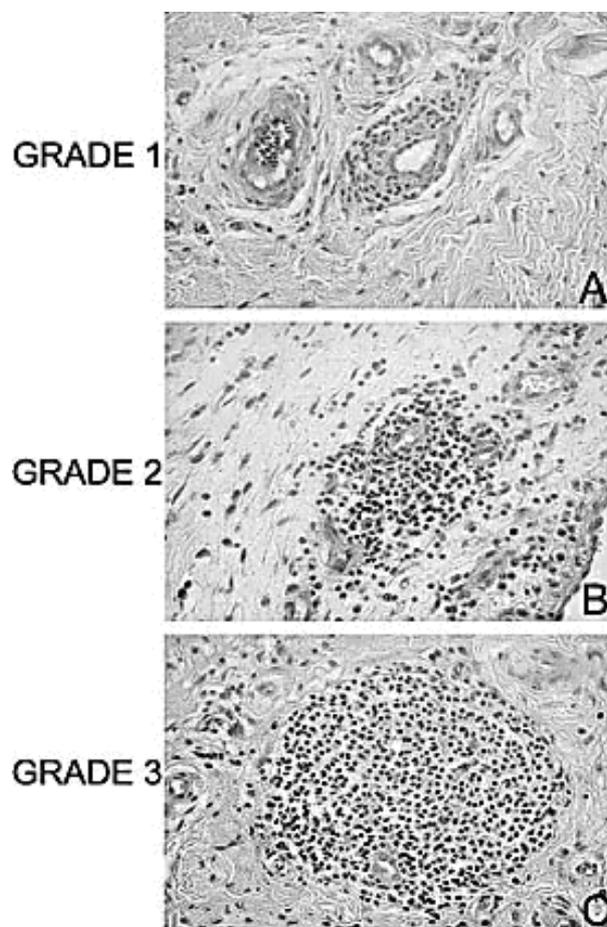


Figura 2. *Grading* istologico. La colorazione in ematossilina-eosina mostra degli esempi rappresentativi di aggregati di grado 1 (A), grado 2 (B) e grado 3 (C) nella sinovia reumatoide [20].

## **Bibliografia**

1. Davis JC, Mease PJ. Insights into the pathology and treatment of spondyloarthritis: from the bench to the clinic. *Semin Arthritis Rheum* 2008;38(2):83-100.
2. Reveille JD. The genetic basis of spondyloarthritis. *Curr Rheumatol Rep* 2004;6(2):117-25.
3. Nash P, Mease PJ, Braun J, van der Heijde D. Seronegative spondyloarthropathies: to lump or split? *Ann Rheum Dis* 2005;64(Suppl. 2):ii9-ii13.
4. Dougados M, Baeten D. Spondyloarthritis. *Lancet* 2011;12:2127-2137.
5. de Sande M, Gerlag DM, Lodde BM et al. Evaluating antirheumatic treatments using synovial biopsy: a recommendation for standardisation to be used in clinical trials. *Ann Rheum Dis* 2011;70(3):423-427.
6. Veale D, Yanni G, Rogers S et al. Reduced synovial-membrane macrophage numbers, elam-1 expression, and lining layer hyperplasia in psoriatic-arthritis as compared with rheumatoid-arthritis. *Arthritis Rheum* 1993;36(7):893-900.
7. Reece RJ, Canete JD, Parsons WJ et al. Distinct vascular patterns of early synovitis in psoriatic, reactive, and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999;42(7):1481-1484.
8. van Kuijk AWR, Tak PP. Synovitis in Psoriatic Arthritis: Immunohistochemistry, Comparisons With Rheumatoid Arthritis, and Effects of Therapy. *Curr Rheumatol Rep* 2011;13(4):353-359.
9. Fraser A, Fearon U, Reece R et al. Matrix metalloproteinase 9, apoptosis, and vascular morphology in early arthritis. *Arthritis Rheum* 2001;44(9):2024-2048.
10. van Kuijk AWR, Reinders-Blankert P, Smeets TJM et al. Detailed analysis of the cell infiltrate and the expression of mediators of synovial inflammation and joint destruction in the synovium of patients with psoriatic arthritis: implications for treatment. *Ann Rheum Dis* 2006;65(12):1551-1557.
11. Kruithof E, Baeten D, De Rycke L et al. Synovial histopathology of psoriatic arthritis, both oligo- and polyarticular, resembles spondyloarthropathy more than it does rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2005;7(3):R569-R580.
12. Drayton DL, Liao S, Mounzer RH et al. Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis. *Nat Immunol* 2006;7(4):344-353.
13. Canete JD, Santiago B, Sanmarti R et al. Ectopic lymphoid neogenesis in psoriatic arthritis. *J Invest Dermatol* 2007;127(7):24.
14. Takemura S, Braun A, Crowson C et al. Lymphoid neogenesis in rheumatoid synovitis. *J Immunol* 2001;167(2):1072-1080.
15. Weyand CM, Goronzy JJ. Ectopic germinal center formation in rheumatoid synovitis. *Ann N Y Acad Sci* 2003;987:140-149.
16. Baeten D, Kruithof E, De Rycke L et al. Infiltration of the synovial membrane with macrophage subsets and polymorphonuclear cells reflects global disease activity in spondyloarthropathy. *Arthritis Res Ther* 2005;7(2):R359-R69.
17. Baeten D, Kruithof E, De Rycke L et al. Diagnostic classification of spondylarthropathy and rheumatoid arthritis by synovial histopathology - A prospective study in 154 consecutive patients. *Arthritis Rheum* 2004;50(9):2931-2941.
18. Taylor W, Gladman D, Helliwell P et al. Classification criteria for psoriatic arthritis - Development of new criteria from a large international study. *Arthritis Rheum* 2006;54(8):2665-2673.
19. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA et al. The american-rheumatism-association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid-arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31(3):315-324.
20. Manzo A, Paoletti S, Carulli M et al. Systematic micro anatomical analysis of CXCL13 and CCL21 in situ production and progressive lymphoid organization in rheumatoid synovitis. *Eur J Immunol* 2005;35(5):1347-1359.
21. Greisen SR, Moller HJ, Stengaard-Pedersen K et al. Soluble macrophage-derived CD163 is a marker of disease activity and progression in early rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2011;29(4):689-692.
22. Ritchlin CT, Kavanaugh A, Gladman DD et al. Treatment recommendations for psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis* 2009;68(9):1387-1394.
23. Finnegan S, Clarke S, Gibson D et al. Synovial membrane immunohistology in early juvenile idiopathic arthritis: differences between clinical subgroups. *Ann Rheum Dis* 2011;70(10):1842-1850.
24. Rudwaleit M, van der Heijde D, Landewe R et al. The Assessment of SpondyloArthritis international Society classification criteria for peripheral spondyloarthritis and for spondyloarthritis in general. *Ann Rheum Dis* 2011;70(1):25-31.