



# **UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**Dipartimento di Pediatria**

**Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale**

**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN  
MEDICINA DELLO SVILUPPO E SCIENZE DELLA PROGRAMMAZIONE  
INDIRIZZO: MALATTIE RARE  
XXI CICLO**

***RUOLO DEL SISTEMA IMMUNITARIO E DEI PROGENITORI  
ENDOTELIALI NELLA PATOGENESI DELLA SCLERODERMIA  
LOCALIZZATA GIOVANILE***

**Direttore: Ch.mo Prof. GIUSEPPE BASSO**

**Supervisore: Dott. FRANCESCO ZULIAN**

**Dottoranda: Dott.ssa BARBARA MONTINI**

**2 Febbraio 2009**

# INDICE

<b>Abbreviazioni</b> .....	pag.5
<b>Riassunto</b> .....	pag.7
<b>Abstract</b> .....	pag.9
<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	pag.11
<b>1.1 La Sclerodermia</b> .....	pag.11
1.1.1 Classificazione.....	pag.11
1.1.2 Epidemiologia.....	pag.12
1.1.3 Eziopatogenesi.....	pag.12
Fattori genetici e immunogenetici.....	pag.13
Agenti virali.....	pag.14
Microchimerismo.....	pag.15
Stress ossidativo.....	pag.16
1.1.4 Patogenesi.....	pag.17
Alterazioni del sistema immunitario umorale.....	pag.17
Alterazioni del sistema immunitario cellulare.....	pag.18
Ruolo delle citochine e chemiochine.....	pag.19
Anomalie vascolari.....	pag.22
Fibrogenesi.....	pag.24
Via di trasduzione del segnale di TGF $\beta$ .....	pag.25
La via di Smad è alterata nella SS.....	pag.27
Miofibroblasti.....	pag.28
1.1.5 Trattamento.....	pag.29
<b>1.2 Linfociti Natural Killer</b> .....	pag.30
1.2.1 Caratteristiche morfologiche.....	pag.30
1.2.2 Caratteristiche funzionali.....	pag.32
1.2.3 I recettori umani delle cellule NK (NKR).....	pag.34
KIR.....	pag.35
KLR.....	pag.36
NCR.....	pag.38

Co-recettori.....	pag.38
1.2.4 NKR e autoimmunità.....	pag.39
<b>1.3 Progenitori endoteliali (EPC).....</b>	<b>pag.42</b>
1.3.1 Rigenerazione dell'endotelio vascolare.....	pag.43
1.3.2 Caratterizzazione.....	pag.43
1.3.3 Origine.....	pag.44
1.3.4 Isolamento e metodi di valutazione.....	pag.46
1.3.5 Fattori che influenzano numero e funzione in vivo.....	pag.47
1.3.6 EPC nella Sclerodermia.....	pag.48
<b>2.SCOPO DELLA TESI.....</b>	<b>pag.51</b>
<b>3. MATERIALI E METODI.....</b>	<b>pag.53</b>
3.1 Trial clinico.....	pag.53
3.2 Pazienti.....	pag.54
3.3 Analisi citofluorimetrica.....	pag.56
3.4 Analisi immunofenotipica.....	pag.58
3.4.1 Tipizzazione delle sottopopolazioni cellulari del sangue.....	pag.59
3.4.2 Analisi dell'espressione dei NKR.....	pag.60
3.4.3 Analisi fenotipica delle EPC.....	pag.61
3.5 Test di citotossicità delle cellule NK.....	pag.62
3.5.1 Separazione Ficoll/Hipaque.....	pag.62
3.5.2 Cellule <i>target</i> .....	pag.63
3.5.3 Test di rilascio del <sup>51</sup> Cr.....	pag.63
3.6 Analisi IC.....	pag.64
3.7 Analisi statistica.....	pag.65
<b>4. RISULTATI.....</b>	<b>pag.67</b>
<b>5. DISCUSSIONE.....</b>	<b>pag.93</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>pag.101</b>



## *Abbreviazioni*

AcMo	Anticorpo monoclonale
Ag	Antigene
APC	Cellula presentante l'antigene
AR	Artrite reumatoide
$\alpha$ -SMA	Actina del muscolo scheletrico
BAL	Lavaggio bronco alveolare
bFGF	Fattore di crescita basale dei fibroblasti
CD	Gruppi di differenziazione
CTGF	Fattore di crescita del tessuto connettivo
DC	Cellule dendritiche
EC	Cellule endoteliali
ECDS	En coup de sabre
ECM	Matrice extracellulare
EPC	Precursori delle cellule endoteliali
FITC	Fluoresceina isotiocianato
GM-CSF	Fattore stimolante le colonie di monociti granulati
GVHD	Graft versus Host Disease
HAT	Iston acetil transferasi
HCMV	Citomegalovirus umano
HDAC	Iston deacetilasi
HLA	Antigene di istocompatibilità
HSC	Cellule staminali ematopoietiche
Ig	Immunoglobulina
IL	Interleuchina
JLS	Sclerodermia Localizzata Giovanile
LGL	Grandi linfociti granulati
MCP-1	Proteina chemio tattica dei monociti
MHC	Complesso maggiore di istocompatibilità
MIP-1 $\alpha$	Proteina macrofagica infiammatoria 1 $\alpha$
MMP	Metalloproteasi della matrice extracellulare
MSC	Cellule mesenchimali staminali

MO	Midollo osseo
NK	Linfociti natural killer
NKR	Recettori delle cellule NK
PBMC	Cellule mononucleate isolate dal sangue periferico
PDGF	Fattore di crescita derivato dalle piastrine
PE	Ficoeritrina
SI	Sistema Immunitario
SL	Sclerodermia Localizzata
SNP	Polimorfismo di un singolo nucleotide
SS	Sclerodermia sistemica
Tc	Linfociti T citotossici
TGF $\beta$	Fattore di crescita trasformante $\beta$
Th	Linfociti T helper
TIMP	Inibitore tissutale delle metallo proteasi
TNF $\alpha$	Fattore di necrosi tumorale $\alpha$
VEGF	Fattore di crescita dell'endotelio vascolare

## ***Riassunto***

**Introduzione:** La Sclerodermia Localizzata Giovanile (JLS) è una malattia infiammatoria cronica di origine sconosciuta. Rispetto alla Sclerodermia Sistemica (SS) questa forma è più comune nei bambini e le lesioni fibrotiche che la caratterizzano sono limitate alla pelle e ai tessuti sottocutanei. La fibrosi è dovuta ad un'eccessiva deposizione di collagene da parte dei fibroblasti ed è la caratteristica più evidente della patologia, tuttavia altri eventi quali le alterazioni del Sistema Immunitario (SI) e della microvascolatura sono cruciali e sembrano precedere la fibrosi.

Le cellule NK sono importanti esecutori del SI adattativo ed uccidono selettivamente cellule infettate da virus o cancerose senza una precedente immunizzazione, la loro attività è regolata da recettori inibitori ed attivatori presenti sulla superficie.

La sclerodermia è caratterizzata da ischemia tissutale e da difetti nei processi di angiogenesi e vasculogenesi probabilmente dovuti ad una diminuita mobilitazione dal MO dei progenitori endoteliali (EPC) che hanno un ruolo cruciale in essi.

**Scopo dello studio:** In questo studio si è indagato il ruolo del SI nella patogenesi della JLS analizzando la distribuzione delle sottopopolazioni cellulari del sangue periferico e l'espressione dei recettori delle cellule NK (NKR) e caratterizzando l'infiltrato infiammatorio delle lesioni cutanee. Inoltre, sono state quantificate le EPC nel sangue periferico dei pazienti affetti da JLS.

**Materiali e metodi:** Questo studio fa parte di un *trial* multicentrico *randomizzato* in doppio cieco per valutare l'efficacia terapeutica del farmaco immunomodulatore metotrexate (MTX). Sono stati arruolati 42 pazienti con diagnosi di JLS e 39 bambini sani come controlli. Dopo l'arruolamento i pazienti sono stati suddivisi in maniera casuale in due gruppi: ad un gruppo è stato somministrato MTX associato a prednisone (PDN) per 3 mesi seguiti da solo MTX per altri 9 mesi; all'altro un farmaco placebo associato a PDN per i primi 3 mesi dopo i quali il PDN è stato tolto. Lo scopo è stato quello di valutare se il MTX inducesse un miglioramento della malattia. Nel sangue periferico dei pazienti si è analizzata la distribuzione di alcune sottopopolazioni cellulari utilizzando un pannello di AcMo comprendenti CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, C56, CD57, TCRgd, HLA-DR; è stata valutata l'espressione dei NKR utilizzando un pannello di AcMo comprendente EB6, GL183, DEC, ZIN, BAT221, KP43, Z199, P25, AZ20, BAB281, AZ20, Z231, MA152, PP35, QA79; sono stati condotti test di rilascio del <sup>51</sup>Cr per valutare l'attività citotossica

delle cellule NK dei pazienti affetti da JLS e sono state quantificate le EPC usando gli AcMo CD34, CD133, KDR. Inoltre è stata eseguita un'analisi immunohistochimica (IC) sulle biopsie ottenute dalle lesioni cutanee dei pazienti per identificare le popolazioni presenti nell'infiltrato infiammatorio usando gli AcMo CD45, CD3 e CD20.

**Risultati:** Dall'analisi dei NKR è emerso un aumento significativo dell'espressione del recettore di citotossicità BAB281/NKp46 ( $8\pm 0.7\%$  vs  $5\pm 0.8\%$ ,  $p<0.05$ ) e del recettore inibitore DEC/KIR3DL2 ( $11\pm 5.2\%$  vs  $0\pm 0.2\%$ ,  $p<0.05$ ) nei pazienti rispetto ai controlli. Quest'ultimo marcatore aveva un'alta variabilità d'espressione tra i pazienti. A 3 mesi, l'espressione di NKp46 era ridotta dal trattamento con MTX ( $4\pm 0.8\%$  vs  $8\pm 0.7\%$ ,  $p<0.05$ ) così come quelle di AZ20/NKp30 ( $3\pm 0.8\%$  vs  $6\pm 0.7\%$ ), MA152/NKp80 ( $7\pm 1.1\%$  vs  $12\pm 0.8\%$ ), PP35/2B4 ( $16\pm 1.7\%$  vs  $26\pm 1.3\%$ ) e QA79/P75 ( $6\pm 0.8\%$  vs  $11\pm 0.7\%$ ), ma non dal trattamento con il farmaco placebo. Tuttavia, tale effetto non si è mantenuto dopo 12 mesi di trattamento indicando che era più probabilmente dovuto all'associazione del MTX con il PDN. Dai saggi di citotossicità è emerso che l'attività citotossica delle cellule NK dei pazienti era mediamente aumentata rispetto ai *range* di normalità dell'adulto e dopo 12 mesi di trattamento con MTX si manteneva tale. Infine, il numero delle EPC era significativamente ridotto nel sangue periferico dei pazienti affetti da JLS rispetto ai bambini sani ( $1.4\pm 0.3$  vs  $4.7\pm 1.2$  cellule,  $p<0.05$ ) così come quello delle cellule CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> ( $45\pm 9.3$  vs  $91\pm 21.0$  cellule) e quello delle cellule CD34<sup>+</sup> ( $440\pm 29.9$  vs  $542\pm 46.3$  cellule). L'analisi IC delle biopsie cutanee ha evidenziato un infiltrato infiammatorio caratterizzato soprattutto dalla presenza di linfociti T CD3<sup>+</sup>, ma anche di linfociti B CD20<sup>+</sup>. Dopo 12 mesi di trattamento con MTX i linfociti T regredivano più del 50% mentre i linfociti B scomparivano.

**Conclusioni:** Nel loro insieme questi dati suggeriscono che i pazienti affetti da JLS analizzati erano caratterizzati da un quadro di aumentata attività citotossica delle cellule NK conseguente probabilmente all'aumento dell'espressione del recettore di citotossicità NKp46. Anche i recettori KIR sembravano avere un ruolo nei meccanismi di autoimmunità caratteristici di questa patologia. Le anomalie della neoangiogenesi riscontrate in questi pazienti potrebbero essere dovute alla deplezione del numero delle EPC nel sangue periferico. In generale, il MTX sembra avere un importante effetto locale cutaneo dove induce una consistente riduzione dell'infiltrato infiammatorio mentre non sembra influenzare l'assetto immunologico nel sangue periferico.

## *Abstract*

**Background:** Juvenile Localized Scleroderma (JLS) is a chronic inflammatory disease of unknown aetiology. It is more common in children with respect to the Systemic one (SS) and it is characterized by fibrotic lesions limited to the skin and subcutaneous tissues due to an abnormal deposition of collagen by the fibroblasts. Abnormalities in the Immune System (IS) and in the microvasculature are important and seem to precede fibrosis.

NK cells are the most important cells of the innate IS; they can kill target cells without an antigen presentation and their activity is strictly regulated by both inhibitory and activating receptors expressed on their surface. JLS patients have tissue ischaemia and defective angiogenesis and vasculogenesis probably due to a reduced mobilization of endothelial progenitor cells (EPCs) from the bone marrow.

**Aim of the study:** To explore how the IS can contribute to the pathogenesis of the disease by analyzing lymphocyte distribution and NK cell receptors (NKR) expression, by quantifying EPCs in the peripheral blood from the patients and by evaluating the inflammatory infiltrate in the skin lesions from the biopsies.

**Methods:** This study is part of a randomized double blinded clinical trial for evaluating metotrexate efficacy as therapeutic treatment. Forty two consecutive untreated JLS patients and 39 healthy controls entered the study. Patients were analyzed at the beginning of the study and then randomized into two subgroups: one group was treated with MTX in association with prednisone (PDN) for 3 months followed by the treatment with just MTX for 9 more months; the other group was treated with placebo in association with PDN, followed by just placebo for 9 more months. Peripheral blood samples were evaluated by flow cytometric analysis for the expression of CD3, CD4, CD8, CD19, CD56, CD57, TCR $\gamma\delta$  and HLA-DR. NKR were evaluated by determining EB6, GL183, DEC, ZIN, BAT221, KP43, Z199, P25, BAB281, AZ20, Z231, MA152, PP35, QA79 positivity. EPCs were characterized by the co-expression of CD34, CD133 and KDR. Immunohistochemical analysis of the skin biopsies was performed by quantification of CD45<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> and CD20<sup>+</sup> cells.

**Results:** NK cells from JLS patients showed an increased expression of the cytotoxic receptor BAB281/NKp46 ( $8\pm 0.7\%$  vs  $5\pm 0.8\%$ ,  $p < 0.05$ ) and reduced expression

of the inhibitory one DEC/KIR3DL2 ( $11\pm 5.2\%$  vs  $0\pm 0.2\%$ ,  $p<0.05$ ). However, DEC was found to have very variable values in JLS patients. The expression of BAB281 was reduced after 3 months of treatment with MTX ( $4\pm 0.8\%$  vs  $8\pm 0.7\%$ ,  $p<0.05$ ) the same happened for the expression of other activatory receptors like AZ20/NKp30 ( $3\pm 0.8\%$  vs  $6\pm 0.7\%$ ), MA152 ( $7\pm 1.1\%$  vs  $12\pm 0.8\%$ ), PP35 ( $16\pm 1.7\%$  vs  $26\pm 1.3\%$ ) and QA79 ( $6\pm 0.8\%$  vs  $11\pm 0.7\%$ ). All these effects were not kept out until the end of the 12 month follow up, suggesting that were probably due to the association of MTX with PDN rather than to MTX itself. Concerning EPC, JLS patients showed lower circulating levels of CD34<sup>+</sup> ( $440\pm 29.9$  vs  $542\pm 46.3$  cellule), CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> ( $45\pm 9.3$  vs  $91\pm 21.0$  cellule) and CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> ( $1.4\pm 0.3$  vs  $4.7\pm 1.2$  cellule). Finally, the inflammatory infiltrate in the affected skin tissue was rich in CD3<sup>+</sup> cells and in B lymphocytes. All these cells decreased significantly after MTX treatment, the B-cell component disappeared.

**Conclusions:** JLS patients present an enhanced expression of the NK cell activity probably related to the enhanced expression of the cytotoxic receptor NKp46. Abnormal neo angiogenesis, found in these patients, could be related to a decreased number of circulating EPCs. MTX affects the disease locally, at skin level, by a consistent reduction of the inflammatory infiltrate while does not influence the immunological pattern in the peripheral blood.

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 La Sclerodermia

### 1.1.1 Classificazione

La Sclerodermia è una malattia cronica che colpisce principalmente la cute, ma può interessare anche articolazioni, vasi sanguigni ed organi interni. Esistono due forme di malattia: la Sclerodermia Localizzata (SL) e la Sclerosi Sistemica (SS) e da molti anni queste due malattie sono considerate come entità separate. Nella SL le lesioni fibrotiche sono, di solito, limitate alla pelle e ai tessuti sottocutanei come il tessuto adiposo, il muscolo e qualche volta l'osso<sup>1</sup>. Diversamente dalla forma sistemica, non è accompagnata dal fenomeno di Raynaud e da acrosclerosi e non c'è coinvolgimento degli organi interni e la prognosi è, in genere, buona. Alcune forme di SL sono relativamente miti e autolimitanti, altre possono avere un'evoluzione severa ed essere difficili da gestire. Esistono diverse forme cliniche e il fattore unificante è la presenza di un ispessimento cutaneo<sup>2</sup>.

Negli ultimi anni molti autori hanno tentato di classificare la SL, ma spesso le proposte sono risultate poco chiare poiché c'erano molte differenze tra le varie classificazioni, soprattutto nella terminologia. Questo ha condotto ad un'inevitabile confusione e ad una difficoltà nel paragonare diverse forme cliniche ed osservazioni scientifiche. Dal momento che nessuna di queste classificazioni è stata validata, in questo studio si è fatto riferimento alla classificazione proposta da Peterson nel 1995<sup>3</sup>. In base alla morfologia la SL è classificata in tre varianti:

1. morfea a placche: caratterizzata da una o poche placche ovali discrete con un centro di colore avorio ed un bordo violaceo;
2. sclerodermia lineare: caratterizzata da lesioni lineari che interessano soprattutto gli arti e possono coinvolgere il muscolo sottostante. Quando le lesioni interessano il volto viene detta *en coup de sabre* (ECDS);
3. morfea generalizzata: è una forma severa di SL caratterizzata da lesioni diffuse con frequente coinvolgimento muscolare.

### **1.1.2 Epidemiologia**

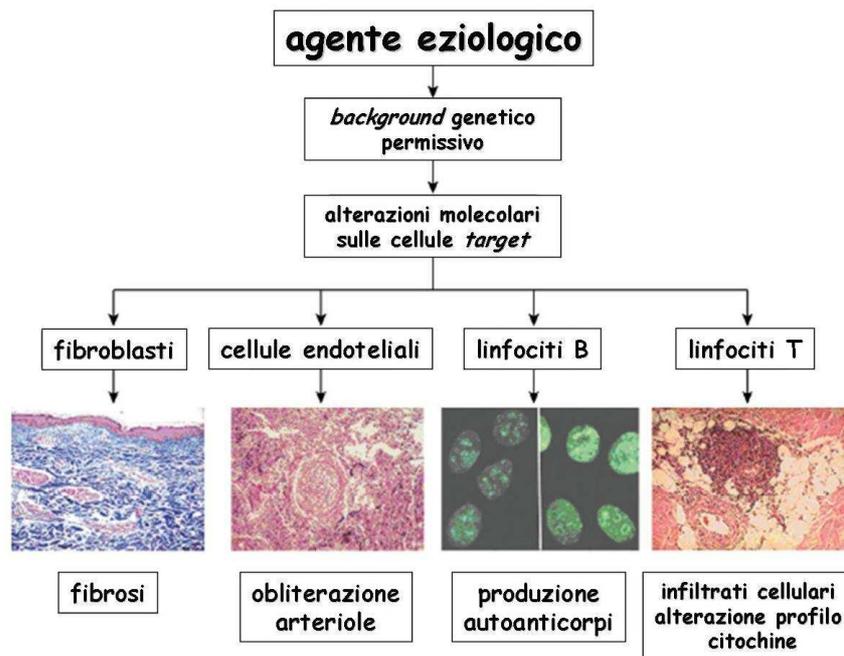
Sebbene la SL sia una malattia rara, nell'infanzia è molto più frequente della SS. La prevalenza della malattia è sottostimata; è riportata un'incidenza di 2,7 casi ogni 100.000 bambini/anno. La malattia è nettamente prevalente nel sesso femminile, con un rapporto F:M=2-4:1 e interessa soprattutto una popolazione di pazienti con età inferiore a 16 anni<sup>3,4</sup>.

### **1.1.3 Eziopatogenesi**

A tutt'oggi la ricerca rivolta specificatamente alla SL è piuttosto limitata. La maggior parte degli studi si è focalizzata sulla SS con la supposizione che la SL presenti danni tissutali simili a quelli della SS, ma alcuni elementi suggeriscono che le due malattie rappresentino quadri patologici distinti<sup>1</sup>. La SL e la SS vengono distinte in base alla distribuzione e alla densità dell'infiltrato infiammatorio e al coinvolgimento del derma papillare, infatti i fenomeni infiammatori sono più evidenti nella SL e la sclerosi del derma papillare che è frequente nella SL, è assente nella SS. Studi anatomo-patologici condotti su cute e tessuti sottocutanei in pazienti con SL, hanno dimostrato che nelle fasi iniziali sono presenti edema ed ipervascolarizzazione, successivamente compaiono la sclerosi, un abnorme deposito di collagene e la perdita degli annessi cutanei con atrofia finale.

A livello molecolare, la sclerodermia è caratterizzata da anomalie in diversi tipi cellulari: le cellule endoteliali, le cellule muscolari lisce, le cellule del SI (linfociti B, linfociti T, macrofagi, neutrofili), le cellule di origine mesenchimale. Sebbene la fibrosi del tessuto connettivo sia la caratteristica più evidente della malattia, la sua origine risiede, probabilmente, nelle alterazioni della microvascolatura e del SI (Figura 1).

L'eziologia della sclerodermia non è nota ma, si ritiene che essa insorga in soggetti geneticamente predisposti in seguito ad uno stimolo ambientale ignoto. Fattori quali gli agenti infettivi, lo stress ossidativo, l'esposizione a solventi organici e tossine e la presenza di microchimerismo sono stati proposti come probabili agenti eziologici<sup>5,6</sup> (Figura 1).



**Figura 1. Ipotesi patogenetiche.**

La sclerodermia insorge per l'azione di un agente eziologico (virale, chimico, stress ossidativo, microchimerismo) su un ambiente genetico predisponente causando modificazioni cellulari e molecolari a livello di molteplici tipi cellulari. Modificata da Jimenez, 2004<sup>7</sup>.

### **Fattori genetici e immunogenetici**

Il contributo dei fattori genetici nell'evoluzione della sclerodermia è messo in evidenza da varie osservazioni: l'esistenza di gruppi famigliari di malattia; l'alta frequenza di disordini autoimmuni oppure la presenza di autoanticorpi nei membri della famiglia dei pazienti; le differenze nella prevalenza e nelle manifestazioni cliniche tra diversi gruppi etnici; la diversa prevalenza di certi alleli HLA tra differenti gruppi etnici e tra pazienti con differenti assetti clinici della malattia o con differenti profili di autoanticorpi<sup>8</sup>.

La concordanza della SS tra gemelli identici è pari al 4.2% e non è significativamente differente dalla concordanza della malattia nei gemelli dizigotici (5.9%), invece la concordanza per la presenza di specifici autoanticorpi è alta. Queste osservazioni indicano che i fattori genetici ereditari sono importanti per lo sviluppo di un determinato profilo di autoanticorpi, ma non sono sufficienti per lo sviluppo della malattia<sup>9</sup>.

La prevalenza della malattia varia a seconda della regione geografica e dell'etnia. Negli USA va da 242 a 286 casi per milione di persone; tuttavia, nei nativi d'America della tribù Choctaw in Oklahoma (uno dei gruppi più studiati per il ruolo dei fattori genetici nella SS) l'incidenza nella popolazione è di 469 casi per milione di persone. L'espressione

della malattia varia molto tra gruppi etnici<sup>10</sup>: gli Afro-Americani sono più portati ad avere anticorpi anti-topoisomerasi I e manifestazioni più gravi a livello degli organi interni, inclusa una più alta frequenza di fibrosi polmonare. Invece, gli anticorpi anti-centromero sono più comuni nelle persone di razza bianca che tendono ad avere anche una forma limitata di malattia con manifestazioni sistemiche meno severe.

Altri fattori genetici possono influenzare l'espressione della malattia: mutazioni o polimorfismi in geni rilevanti possono comportare un aumento della loro espressione. Ad esempio, la regione a monte del gene del collagene COL1A2 contiene numerose ripetizioni dinucleotidiche che possono aumentarne l'attività genica. Alla stessa maniera, nel gene del fattore trasformante  $\beta 1$  (TGF $\beta 1$ ) sono stati trovati 2 singoli polimorfismi nucleotidici (SNP) ed i pazienti che li esprimono sviluppano più frequentemente fibrosi polmonare. Un altro polimorfismo genetico comune nella SS è quello del gene che codifica per la fibrillina-1, una grossa proteina della matrice extracellulare (ECM). Questo polimorfismo è localizzato nella regione a monte del gene, e la sua presenza è fortemente associata con l'insorgenza della SS nei Nativi d'America della tribù Choctaw e nei Giapponesi. Altri SNP sono stati identificati nei geni che codificano per fattori vasomotori (enzima che converte l'angiotensina, endotelina e ossido nitrico sintasi), per marcatori delle cellule B (CD19), per chemiochine e i loro recettori (*monocyte chemoattractant protein-1/MCP-1* e CXCR2), citochine (IL-1 $\alpha$ , IL-4 e TNF $\alpha$ ), per fattori di crescita e i loro recettori (*bone morphogenetic protein type II receptor/BMPRII*, *connective tissue growth factor/CTGF*).

### **Agenti virali**

Alcuni agenti virali quali i retrovirus e il citomegalovirus umano (HCMV) potrebbero essere responsabili dell'eziologia della sclerodermia. L'autoimmunità da parte di questi agenti potrebbe essere stata scatenata da una risposta guidata da un antigene *self* che è stato riconosciuto come non *self* dal SI a causa di somiglianze strutturali con una proteina virale (mimetismo molecolare). In questo modo gli autoanticorpi potrebbero rappresentare l'impronta dell'agente eziologico elusivo. In supporto a questa ipotesi sono state individuate omologie di sequenza tra la proteina retrovirale p30<sup>gag</sup> di vari virus felini e murini e la topoisomerasi-I, il marcatore antigenico sclerodermico riconosciuto dagli anticorpi detti Scl-70 (Sclerodermia-70)<sup>11</sup>. Altre ipotesi suggeriscono che il HCMV, per la sua capacità d'infettare cellule endoteliali, potrebbe essere stato l'agente responsabile del danno vascolare iniziale<sup>12</sup>. L'infezione originaria, avrebbe generato una risposta antivirale autoreattiva nei confronti delle cellule endoteliali *self*. Questa ipotesi è supportata da varie

osservazioni: l'alta presenza di IgG anti-HCMV capaci di legare la proteina virale tardiva UL94 e di indurre apoptosi delle cellule endoteliali nei pazienti con SS<sup>13</sup>; l'aumento di IgA anti-HCMV nei pazienti positivi per gli anticorpi Scl-70<sup>14</sup>; lo sviluppo di gravi cambiamenti vascolari fibroproliferativi in certi casi di infezione da CMV; la comparsa di autoanticorpi nel siero dei pazienti infettati da CMV che riconoscono la ribonucleoproteasi U1 (snRNP U1) primariamente diretti contro una proteina virale di 70kDa.

### **Microchimerismo**

La presenza in un organismo di cellule geneticamente diverse da quelle dell'individuo ospite è detta chimerismo ed è una condizione che si genera spesso dopo un trapianto allogenico di MO. Il microchimerismo è definito dalla presenza in un individuo di bassi livelli di cellule derivate da un altro individuo e il termine è stato coniato per descrivere la sopravvivenza e proliferazione di cellule fetali allogeniche nella circolazione materna senza l'induzione di un GVHD.

La SS presenta delle somiglianze con una forma clinica definita *chronic graft versus host disease* (cGVHD) che insorge come complicanza tardiva del trapianto allogenico di midollo osseo (MO) e che può svilupparsi *ex novo* oppure come conseguenza di un forma acuta di GVHD. La cGVHD è un disordine chimerico che si manifesta quando le cellule T e NK dei tessuti donatori trapiantati reagiscono contro gli antigeni HLA del ricevente. Il suo sviluppo dipende dalla competenza immunologica delle cellule trapiantate di riconoscere l'ospite come *non self* e dall'incapacità dell'ospite di montare un'efficiente risposta immunitaria contro il trapianto. Sia la SS che la cGVHD possono manifestarsi come forme limitate o diffuse a seconda dell'estensione della malattia; possono presentare coinvolgimento di vari organi quali la cute, i polmoni, l'esofago e il cuore; entrambe presentano alterazioni della microvascolatura e disturbi alle articolazioni.

La gravidanza è uno stato di reciproca tolleranza tra la madre e il feto che, per la presenza degli antigeni paterni MHC, equivale ad un allotrapianto e potrebbe rappresentare un *target* potenziale per il sistema immunitario della madre. Il meccanismo attraverso cui il feto evade il sistema immunitario materno rimane una questione irrisolta nell'immunologia. La tolleranza materna dell'allotrapianto fetale, invece, è il risultato dell'integrazione di numerosi meccanismi promossi dalle cellule NK, dalle cellule presentanti l'antigene (APC) e dalle cellule T presenti nella decidua della placenta materna. Le cellule NK uterine esprimono vari recettori che riconoscono molecole MHC-I classiche (HLA-G, E), e non (HLA-C), espresse dai trofoblasti extravillosi. Questa

interazione inibisce la citotossicità delle cellule NK e può contribuire alla tolleranza nei confronti del feto. Le APC della decidua materna sono potenzialmente capaci di promuovere il rigetto dell'allotrapianto fetale inducendo l'attivazione delle cellule T effettrici in seguito al riconoscimento degli MHC paterni. Le cellule T rilasciano varie citochine, quelle di tipo Th1 potrebbero compromettere la gravidanza mentre quelle di tipo Th2, inibendo le risposte di tipo Th1, mediano la sopravvivenza del feto. Anche se circolazione fetale e materna sono separate dai villi trofoblastici della placenta, esiste un traffico di cellule attraverso la placenta. In genere, il trasferimento di cellule dal feto alla madre è più frequente e le cellule fetali ritrovate nella circolazione materna sono trofoblasti, progenitori ematopoietici, eritroblasti nucleati o cellule linfoidi.

La sopravvivenza di cellule fetali nei tessuti materni è definita microchimerismo. La più comune fonte di microchimerismo è la gravidanza, fonti alternative nell'uomo e nella donna che non ha mai avuto una gravidanza, possono derivare da trasfusioni di sangue, da un gemello o dalla madre. La connessione tra microchimerismo e malattie autoimmuni fu individuata per la prima volta nel 1996. Secondo tale ipotesi, le cellule fetali o materne persistono nel sangue e nei tessuti della mamma o del figlio come risultato della compatibilità HLA II (DRB1). E' stato ipotizzato che queste cellule fetali allogene si attivino in seguito ad uno stimolo ambientale e che montino una GVHD nella madre<sup>15</sup>. L'identificazione di sequenze del cromosoma Y nel DNA ottenuto da biopsie di pelle di donne affette da SS, che hanno precedentemente partorito un maschio, supporta questa ipotesi: la questione, tuttavia, è molto controversa perché alcuni studi hanno dimostrato che il DNA fetale del cromosoma Y è presente anche in donne sane<sup>16</sup>, ma si ritiene che potrebbe essere la quantità e non la mera presenza di DNA fetale il fattore cruciale per la patogenesi della SS<sup>17</sup>. In uno studio recente, nel sangue periferico di tre donne sclerodermiche sono stati individuati linfociti CD3 che portavano il cromosoma Y indicando che le cellule microchimeriche nella sclerodermia potrebbero essere linfociti T<sup>18</sup>.

### **Stress ossidativo**

Le specie ossigeno reattive (ROS), generate durante reazioni metaboliche e biochimiche, hanno svariati effetti: danno ossidativo al DNA; danno alle cellule endoteliali con conseguente attivazione delle piastrine e aumento dell'espressione delle molecole d'adesione e della secrezione di citochine infiammatorie; stimolazione, a basse concentrazioni, della proliferazione dei fibroblasti della pelle e della produzione di collagene<sup>19</sup>. In particolare, è stato osservato che nei fibroblasti sclerodermici lo stress

ossidativo stimola la produzione transiente della chemioquina MCP-1/CCL2 suggerendo che i ROS possono avere un ruolo regolatorio nell'infiammazione modulando l'attività chemiotattica dei monociti<sup>20</sup>.

### 1.1.4 Patogenesi

Lo scopo delle ricerche attuali intorno alla sclerodermia è quello di capire come avviene la transizione dagli eventi iniziali (anormalità vascolari, infiammazione, processi autoimmuni e atrofia tissutale) fino allo sviluppo della fibrosi che è la caratteristica più evidente di questa malattia<sup>21</sup>.

Nella sclerodermia la funzione endoteliale alterata e la reattività dei vasi del sangue provocano risposte infiammatorie locali prolungate che attivano il reclutamento di diverse componenti cellulari e umorali del sistema immunitario che iniziano i processi di rimodellamento e di riparazione per ristabilire la normale architettura tissutale. L'incapacità di risolvere l'infiammazione e il danno alla microvascolatura fanno sì che i processi di riparazione non vengano conclusi e che ci sia il reclutamento e l'espansione di cellule mesenchimali alterate che persistono nel rimodellamento del tessuto connettivo conducendo alla cicatrizzazione e alla fibrosi (Figura 1). L'acquisizione di nuovi e più definiti modelli di malattia, *in vitro* e *in vivo*, hanno provveduto a migliorare la comprensione dei meccanismi cellulari e molecolari coinvolti. In particolare, i modelli murini sono stati studiati estensivamente e sono risultati utili al fine di capire le basi molecolari della malattia<sup>22</sup>. I modelli murini di sclerodermia possono essere suddivisi in tre tipologie<sup>23,24</sup>:

- modelli associati allo sviluppo spontaneo delle caratteristiche di SS, in cui mutazioni avvenute durante l'allevamento vengono mantenute. Ad esempio il *type 1 tight skin mouse* (Tsk1/+)<sup>25</sup>;
- modelli indotti dall'esposizione ad agenti chimici (bleomicina) o dal trapianto di cellule allogeniche. Ad esempio lo *sclerodermatous graft-versus-host*;
- modelli creati per manipolazione genetica (mutagenesi, modificazione come *Knock out*, espressione differenziale di geni).

#### Alterazioni del sistema immunitario umorale

La sclerodermia è una malattia autoimmune<sup>26</sup>. Nel siero dei pazienti è stata rilevata la presenza di autoanticorpi specifici che non sono direttamente coinvolti nelle manifestazioni cliniche della malattia, ma a causa dell'alta frequenza e specificità per certi

sottotipi clinici, la loro presenza è molto utile per stabilire la diagnosi, la gravità e la progressione della malattia e per predire un probabile quadro degli organi coinvolti.

Anche se la forma sistemica e quella localizzata condividono fibrosi della pelle, le risposte immunitarie sono diverse tra le due malattie: gli anticorpi anti-topoisomerasi I (Scl-70) e anti-centromero (ACA) che si ritrovano nella SS<sup>27</sup>, sono assenti nella LS con poche eccezioni. I principali anticorpi riscontrati nella LS sono gli anticorpi anti-nucleo (ANA), anticorpi anti-DNA a singolo filamento (ssDNA) e il fattore reumatoide (RF)<sup>28,29</sup>. I principali antigeni riconosciuti dagli ANA sono gli istoni nucleari (H1, H2A e H2B)<sup>30,31</sup>. I nucleosomi sono le unità base ripetute della cromatina e sono costituiti da un cuore più interno, istoni H3 e H4, ed una porzione più esterna, istoni H2A e H2B e H1, relativamente più accessibile per il legame da parte degli anticorpi. Perciò è stato ipotizzato che, nella LS, gli anticorpi antiistone siano indotti come immunogeni dai nucleosomi o dalla cromatina stessa<sup>32,33</sup>.

Nei pazienti affetti da LS sono stati riscontrati elevati livelli sierici di varie interleuchine (IL-2, -4, -6, -8 e TGFβ1) compresi i loro recettori nella forma solubile (sIL-2R e sIL-6R)<sup>34,35</sup> e i livelli sierici delle forme solubili di VCAM-1 ed E-selectina che sembrano correlare con il numero delle lesioni sclerotiche ed il numero delle aree coinvolte e possono essere usati come marcatori dell'attivazione endoteliale. Inoltre, sono elevati anche i livelli di anticorpi anti-fosfolipidi come l'anti-cardiolipina (aCL)<sup>36</sup>.

### **Alterazioni del sistema immunitario cellulare**

Il SI innato ed adattativo hanno entrambi un ruolo chiave nella patogenesi della SS. Ciò è confermato dalla presenza di importanti infiltrati infiammatori di cellule mononucleate nelle lesioni sclerotiche di pelle ed organi interni<sup>37,38</sup>. Le cellule mononucleate presenti negli infiltrati sono soprattutto linfociti CD4 T *helper* che esprimono i marcatori di attivazione (MHC-DR), macrofagi e mastioci. L'espansione dei linfociti T nel tessuto sembra essere oligoclonale suggerendo una risposta guidata dall'antigene (Ag), anche se esso rimane ignoto<sup>39</sup>. La popolazione espansa di cellule infiammatorie nei tessuti danneggiati è responsabile del rilascio di citochine e fattori di crescita che iniziano o perpetuano il processo fibrotico. I macrofagi attivati, che sono tra le prime cellule ad aumentare nei primi stadi di fibrosi, rilasciano mediatori proinfiammatori e fibrogenici come il TGFβ e il fattore di crescita derivante dalle piastrine (PDGF). Anche i mastioci aumentano nella pelle danneggiata durante le prime fasi di malattia e producono citochine, fattori di crescita e mediatori inclusi l'istamina, le triptasi, TGFβ, il

fattore di crescita basale dei fibroblasti (bFGF), IL-4 e PDGF capaci di attivare i fibroblasti o le cellule endoteliali.

Nei tessuti danneggiati è stata osservata l'espansione di una sottopopolazione di cellule T CD4<sup>+</sup> che co-esprimono il recettore per l'IL-2 (IL-2R/CD25) ed i fattori di trascrizione Foxp3. Queste cellule hanno funzione soppressoria e controllano le risposte autoreattive mediate dalle cellule T prevenendo i fenomeni di autoimmunità<sup>40</sup>.

Infine, recenti studi si sono focalizzati sul ruolo dei linfociti B nell'autoimmunità presente nella sclerodermia e nei modelli murini Tsk1/+ e l'impatto potenziale che la funzione alterata delle cellule B potrebbe avere sulla fibrosi tissutale. Questi studi hanno identificato l'antigene di superficie dei linfociti B CD19 e la via di trasduzione del segnale attivata dal recettore CD21R come componenti in grado di mediare l'espansione clonale delle cellule B e l'immunità umorale<sup>42</sup>. Sembra che CD19 funzioni come regolatore del segnale indotto dal recettore per l'antigene dei linfociti B (BCR), modulando il differenziamento e la produzione di anticorpi diretti contro Ag esogeni e *self*. Inoltre, le cellule B alterate producono IL-6 e IL-10 che inducono una risposta di tipo Th2; la produzione aumentata di IL-6 da parte delle cellule B attivate può promuovere direttamente la fibrosi tissutale nei pazienti affetti da SS<sup>41</sup>.

### **Ruolo delle citochine e chemiochine**

Le citochine sono proteine di piccole dimensioni (8-80kDa) che possono agire in maniera autocrina o paracrina legandosi a recettori specifici sulle cellule bersaglio: il legame innesca una cascata di trasduzione del segnale che attiva la trascrizione di determinati geni bersaglio nel nucleo. A questa grande famiglia appartengono varie tipologie di molecole:

- interleuchine (IL)
- interferoni (INF)
- fattori stimolanti le colonie (CSF)
- fattori di necrosi tumorale (TNF)
- fattori di crescita (GF)
- chemiochine

Nell'ambito dei linfociti Th esistono due sottopopolazioni Th1 e Th2 che rilasciano differenti profili di citochine. Le citochine umane secrete dalle cellule Th1 (principali cellule effettrici delle reazioni infiammatorie cellulo-mediate) comprendono INF $\gamma$ , TNF $\beta$  e IL-2 che attivano reazioni citotossiche, infiammatorie e di ipersensibilità ritardata. Le

cellule Th2, per contro, producono IL-4, -5, -6, -9, -10, e -13 e sono associate a risposte anticorpali e allergiche. A seconda del profilo citochinico rilasciato esistono risposte immunitarie di tipo Th1 e di tipo Th2.

L'azione di queste citochine sui fibroblasti umani *in vitro* è opposta: IL-4, IL-6 e IL-13 stimolano la sintesi di collagene al contrario INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  sopprimono la produzione di collagene. Lo spostamento della risposta verso il tipo Th2 può indurre fibrosi del tessuto e produzione di anticorpi e nella SS esiste uno sbilanciamento nella produzione delle citochine a favore di quelle di tipo Th2<sup>21</sup>. Le cellule T di memoria attivate e i mastociti rilasciano IL-4 che promuove la proliferazione dei fibroblasti, la sintesi di proteine della ECM come il collagene e la tenascina e la sintesi dell'inibitore delle metalloproteinasi di tipo 2 (TIMP-2) attraverso la via della MAP chinasi p38 (Tabella 1). L'IL-13 è una citochina pleiotropica che ha la capacità di sopprimere la produzione di citochine proinfiammatorie nei monociti e nei macrofagi, di aumentare la crescita ed il differenziamento dei linfociti B e di promuovere la sintesi delle Ig. Studi *in vitro* dimostrano che IL-13 è un potente stimolatore della proliferazione dei fibroblasti e della produzione di collagene sia in maniera diretta che indiretta attraverso TGF $\beta$  (Tabella 1).

Le chemiochine sono una famiglia di piccole proteine (6-14kDa) con omologia strutturale del 20-70% che hanno un ruolo importante nella migrazione delle cellule circolanti all'interno dei tessuti (chemiotassi). Sono state caratterizzate più di 50 chemiochine e la maggior parte di queste presenta quattro caratteristiche cisteine (Cys). A seconda del motivo espresso dalle prime due Cys sono classificate come:

- CXC o alfa che hanno 1aa tra le prime due Cys;
- CC o beta che hanno i primi due residui di Cys adiacenti;
- C o gamma che hanno solo due Cys nella proteina matura;
- CX<sub>3</sub>C o delta che hanno 3aa che separano le prime due Cys.

Le chemiochine esercitano i loro effetti attraverso il legame a recettori accoppiati a proteine G che si trovano sulla superficie delle cellule del SI. Parecchi recettori chemiochinici si legano a differenti chemiochine e varie chemiochine si legano a più di uno specifico recettore. Finora sono stati identificati 4 recettori CXC umani (CXCR1-4), 8 recettori CC (CCR1-CCR8), 1 recettore CX<sub>3</sub>CR. Alcuni recettori sono ristretti ad alcuni tipi cellulari: ad esempio CXCR1 è limitato ai neutrofili, mentre CCR2 è espresso in monociti, cellule T, cellule NK, cellule dendritiche e basofili. Alcuni recettori sono costitutivamente espressi in alcune cellule mentre sono inducibili in altre: per esempio CCR1 e CCR2 sono costitutivamente espressi nei monociti, ma sono espressi nei linfociti

solo dopo stimolazione con IL-2. Inoltre, l'espressione di certi recettori chemiochinici è ristretta allo stato di attivazione e differenziamento della cellula: infatti, CXCR3 è espresso sui linfociti T attivati con fenotipo Th1, mentre CCR3, oltre ad essere espresso su eosinofili e basofili, è preferenzialmente espresso sui linfociti attivati con fenotipo Th2. Alcuni recettori chemiochinici sono anche espressi in cellule non ematopoietiche inclusi neuroni, astrociti, cellule epiteliali ed endoteliali indicando che il sistema delle chemiochine è implicato in altri meccanismi oltre alla chemiotassi dei leucociti. I recettori CC legano solo chemiochine CC e i recettori CXC legano solo chemiochine CXC. Questa restrizione ligando-recettore può essere correlata alle differenze strutturali tra chemiochine CC e CXC che hanno strutture primarie, secondarie e terziarie simili, ma diverse strutture quaternarie. Funzionalmente le chemiochine possono essere suddivise in:

- chemiochine infiammatorie: espresse nei tessuti infiammati dalle cellule residenti e da quelle infiltrate dopo stimolazione dalle citochine proinfiammatorie o durante il contatto con agenti microbici;
- chemiochine omeostatiche: prodotte costitutivamente nei tessuti linfoidei o non linfoidei come la pelle e le mucose e coinvolte nel mantenimento del traffico fisiologico e nel posizionamento di cellule che appartengono principalmente al sistema immunitario specifico;
- chemiochine angiogeniche/angiostatiche: coinvolte nella formazione di nuovi vasi da quelli preesistenti facilitando in questo modo la migrazione delle cellule endoteliali.

Nella SS MCP-1/CCL2 è il principale chemioattrattore per i monociti ed attivatore delle cellule mononucleate e può agire anche sui fibroblasti stimolandone la produzione di collagene. In parte questo effetto è mediato dalla stimolazione dei fibroblasti a produrre TGF $\beta$ , che poi agisce in maniera autocrina per stimolare la formazione di ECM. L'm-RNA e la proteina sono altamente espressi nelle lesioni sclerotiche di pelle e polmoni. Nella pelle può essere espressa da fibroblasti, cheratinociti, cellule mononucleate dell'infiltrato infiammatorio e cellule endoteliali; nel polmone, nelle cellule dei lavaggi broncoalveolari (BAL) dei pazienti con coinvolgimento polmonare (Tabella 1).

Le vie profibrotiche mediate dall'asse CCL2-CCR2 nella SS sono molteplici. I fibroblasti sclerodermici producono aumentate quantità di *stem cell factor* (SCF) che stimola i mastioci ad aumentare la produzione di MCP-1 che a sua volta stimola i fibroblasti a produrre più collagene inoltre, nel polmone, MCP-1 inibisce la sintesi della prostaglandina epiteliale E2 di origine cellulare; la diminuzione nella produzione di prostaglandina E2 da

parte delle cellule epiteliali alveolari risulta in un'umentata proliferazione dei fibroblasti<sup>43</sup>. Altre chemiochine i cui livelli sono aumentati nei BAL di pazienti affetti da SS sono RANTES e la proteina macrofagica infiammatoria (MIP-1 $\alpha$ ) (Tabella 1). Infine, l'IL-8 , una chemiochina CXC con potere chemioattrattore per i neutrofili i cui livelli sono aumentati nella pelle e nei BAL dei pazienti affetti da SS <sup>44</sup>(Tabella 1).

**Tabella 1. Citochine e fattori di crescita implicati nella sclerodermia.**

BAL: lavaggio broncoalveolare; TGF $\beta$ : fattore di crescita trasformante; MCP-1: proteina chemioattrattrice dei monociti; TNF $\alpha$ : fattore di necrosi tumorale alfa.

<b>Citochina</b>	<b>mRNA/proteine aumentate in</b>	<b>Contributo alla fibrosi</b>
TGF- $\beta$	pelle, BAL, siero, fibroblasti in coltura	aumento della sintesi di collagene e proliferazione dei fibroblasti, riduzione della sintesi di collagenasi
MCP-1	pelle, BAL, siero, fibroblasti in coltura	stimola la produzione di collagene, in parte attraverso TGF- $\beta$ autocrino
IL-4	pelle, siero, fibroblasti in coltura	stimola la produzione di collagene e delle proteine della ECM e la proliferazione dei fibroblasti
IL-13	pelle, siero, fibroblasti in coltura	stimola la proliferazione dei fibroblasti e la produzione del collagene, in parte attraverso TGF- $\beta$
TNF- $\alpha$	pelle, siero	riduzione della sintesi del collagene, induzione della collagenasi
MIP-1 $\alpha$	BAL	reclutamento di cellule infiammatorie
IL-8	pelle, BAL, fibroblasti in coltura	reclutamento di cellule infiammatorie
RANTES	BAL	reclutamento di cellule infiammatorie

**Anomalie vascolari**

La SS è caratterizzata da uno squilibrio della regolazione vasomotoria tra vasocostrizione e vasodilatazione che origina da una produzione alterata di vasodilatatori (ossido nitrico) e vasocostrittori (endoteline) e da una iper-responsività ad essi. Questo ambiente patologico potrebbe precedere il danno vascolare o esserne una conseguenza, ma in ogni caso porta a cambiamenti morfologici e funzionali nella circolazione ossia ad un aumento della permeabilità dei microvasi, ad un aumento della migrazione leucocitaria trans-endoteliale nonché all'attivazione delle cascate coagulativa e fibrinolitica che culminano nei fenomeni trombotici. La vasculopatia colpisce capillari ed arteriole (sebbene ci siano crescenti evidenze di un coinvolgimento anche dei grandi vasi) ostacolando severamente il flusso sanguigno e riducendo l'ossigenazione tissutale. Nel sangue dei pazienti affetti da SS ci sono livelli elevati di vari marcatori di attivazione e di apoptosi delle cellule endoteliali (EC) come l'endotelina-1, la molecola di adesione intercellulare 1

nella forma solubile (sICAM-1), la molecola di adesione vascolare 1 nella forma solubile (sVCAM-1), la trombomodulina ed il fattore di Von Willebrand e l'apoptosi endoteliale anticorpo mediata e FAS mediata inducono l'attivazione dei periciti microvascolari e la proliferazione dell'intima causando l'occlusione dei vasi sanguigni e la riduzione della densità capillare<sup>45</sup>.

L'ipossia rappresenta lo stimolo principale per l'induzione dell'angiogenesi. Il termine angiogenesi descrive la formazione di nuovi vasi sanguigni da parte di cellule EC differenziate provenienti dai vasi preesistenti. Nella sclerodermia il fenomeno angiogenico è insufficiente nonostante la grave ipossia. Il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF) è un fattore regolatorio per la formazione di nuovi vasi: esso aumenta la permeabilità vascolare, stimola la migrazione e proliferazione delle EC ed induce formazione di strutture tubulari *in vitro*. Considerando che i pazienti affetti da SS hanno un'insufficiente angiogenesi ci si aspetterebbe di trovare uno stato di *down*-regolazione dei fattori angiogenici ed una sovrapproduzione di fattori angiostatici. Invece, nelle zone ischemiche le molecole angiostatiche non sono particolarmente aumentate e, sorprendentemente, c'è un'overespressione di VEGF. Anche i livelli sierologici di VEGF sono significativamente aumentati nelle diverse fasi della malattia e correlano con lo sviluppo di ulcere alle dita<sup>46</sup>.

Alterazioni nel processamento del plasminogeno possono avere profondi effetti nell'omeostasi angiogenica. Il plasminogeno è il precursore della plasmina, una proteasi pro-angiogenica, e dell'angiostatina anti-angiogenica. Quando è tagliato nel dominio carbossi-terminale dall'attivatore del plasminogeno viene prodotta la plasmina. La sua attività proteolitica attiva molti fattori pro-angiogenici come il VEGF, il TGF $\beta$  e metalloproteinasi della matrice (MMP). Il plasminogeno viene tagliato nel suo dominio amino-terminale da parecchie proteasi generando angiostatine di varie misure che posseggono attività anti-angiogeniche. Nella SS l'attività della plasmina è ridotta mentre la quantità di angiostatine circolanti nel plasma è aumentata. La via dell'attivatore del plasminogeno è stata esaminata in studi che hanno valutato l'importanza del recettore dell'attivatore della plasminogeno urochinasi (uPAR) nelle cellule endoteliali isolate da biopsie di pelle di pazienti affetti da SS<sup>47,48</sup>. Il sistema uPA-uPAR modula la degradazione della ECM e l'adesione delle cellule endoteliali ad essa durante l'angiogenesi. L'attività proteolitica di MMP-12 taglia uPAR producendo una perdita di motilità cellulare poiché induce la perdita della connessione integrina-mediata di uPAR con l'actina del

citoscheletro. Le cellule endoteliali della microvascolatura provenienti da pazienti affetti da SS hanno elevati livelli di MMP-12 e di uPAR tagliata.

In contrasto all'angiogenesi, la vasculogenesi descrive la formazione di nuovi vasi del sangue da parte dei progenitori endoteliali circolanti (EPC) indipendentemente dai vasi preesistenti. Il rilascio di queste cellule dal MO può essere stimolato da citochine e fattori di crescita angiogenici come il fattore stimolante la crescita delle colonie di monociti granulati (GM-CSF) o il VEGF. Nonostante le gravi condizioni ischemiche nella SS, il processo di rivascolarizzazione che normalmente ristabilisce il flusso del sangue ai tessuti ischemici appare fallire, possibilmente come risultato di una funzione alterata delle EPC<sup>49</sup>.

### **Fibrogenesi**

La riparazione delle ferite è un processo coordinato e complesso che vede la partecipazione di molti meccanismi biochimici e molecolari coinvolti nella crescita e nel differenziamento cellulari. Una volta terminate le fasi iniziali, emostatica ed infiammatoria acuta, la storia naturale della ferita è dettata dall'infiltrato infiammatorio cronico, dalla deposizione di ECM e dall'angiogenesi e queste fasi tardive hanno la loro origine nell'insieme di mediatori prodotti localmente durante la formazione del coagulo. Le piastrine del coagulo contengono granuli secretori in cui sono accumulati numerosi agenti in grado di stimolare o modulare l'infiammazione (serotonina, istamina, eparina, adrenalina e nucleotidi) nonché fattori di crescita (PDGF e TGF $\beta$ ). L'attivazione piastrinica nel coagulo porta ad un rilascio localizzato di questi mediatori che, oltre alla loro ben nota attività sul tono e sulla permeabilità vascolari, stimolano il reclutamento e l'attivazione in successione di neutrofili, fibroblasti, monociti/macrofagi e cellule dendritiche. Questo infiltrato, in sede di riparazione tissutale, diviene un'importantissima fonte non solo di mediatori chimici preformati o di neosintesi, ma anche di fattori di crescita e di enzimi in grado di degradare la ECM. I neutrofili, che popolano l'infiltrato per primi, producono oltre ad enzimi ad attività degradativa (elastasi, collagenasi, e gelatinasi), TNF $\alpha$ , l'IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , MCP-1 e MCP-2, MIP-1 $\alpha$ . La fase riparativa è ulteriormente potenziata dall'arrivo dei macrofagi che sono una fonte di fattori di crescita ancora più importante dei neutrofili. In particolare, oltre ad IL-1 e TNF- $\alpha$ , essi producono TGF- $\beta$ , PDGF, fattore di crescita insulino simile (IGF). Tra di essi, TGF- $\beta$  è probabilmente il fattore più importante nel processo di riparazione e formazione del tessuto di granulazione per i suoi potenti effetti su quasi tutte le cellule coinvolte nel processo riparativo e non solo sui fibroblasti. I macrofagi sono anche una delle sorgenti principali di uPA, il fattore

responsabile dell'attivazione del plasminogeno, che a sua volta è il precursore ubiquitario della plasmina, il più importante enzima fibrinolitico. Con la secrezione di uPA comincia il processo di degradazione del coagulo ed inizia la fase di formazione del tessuto di granulazione. La plasmina provoca l'attivazione proteolitica dei precursori delle metalloproteasi (proMMP), un insieme di enzimi degradanti il tessuto connettivo. Nel corso del processo di riparazione delle ferite questi enzimi sono sottoposti ad un processo di attivazione/disattivazione; infatti, una volta attivate, le MMP vengono rapidamente inibite dagli inibitori tissutali delle proteasi (TIMP) per permettere il rimodellamento del tessuto neoformato e la formazione della cicatrice. Vari fattori di crescita, citochine e ormoni ne stimolano (PDGF, IL-1, TNF $\alpha$ ) o ne inibiscono (TGF $\beta$ , corticosteroidi) la sintesi modulandone l'espressione genica.

Il processo fibrotico nella sclerodermia può essere pensato come un processo di riparazione delle ferite fuori controllo in cui viene perso l'equilibrio tra stimolazione e inibizione di sintesi della ECM poiché i fibroblasti, attivati da un danno non noto, continuano a produrre componenti della matrice, citochine profibrotiche, TIMP e inibitore 1 dell'attivatore del plasminogeno (PAI-1), mentre la produzione di collagenasi 1 è inibita. Il meccanismo responsabile per il fenotipo attivato dei fibroblasti sclerodermici rimane sconosciuto, ma sembra che TGF $\beta$  sia un elemento cruciale. La sua espressione è elevata nei fibroblasti sclerodermici così come nei monociti/macrofagi e in altre cellule infiammatorie che infiltrano il tessuto prima ancora che compaia fibrosi. Anche i livelli del recettore TGF $\beta$ RI e II sono elevati. Nei fibroblasti TGF $\beta$  stimola la produzione di collagene e induce la sua propria sintesi (autoinduzione) così come quella del fattore di crescita del tessuto connettivo (CTGF). Vari approcci terapeutici sono rivolti alla neutralizzazione dell'azione di questa citochina, ma, considerata la sua azione pleiotropica, vengono preferite strategie terapeutiche alternative che abbiano come *target* le vie del segnale a valle di TGF $\beta$ .

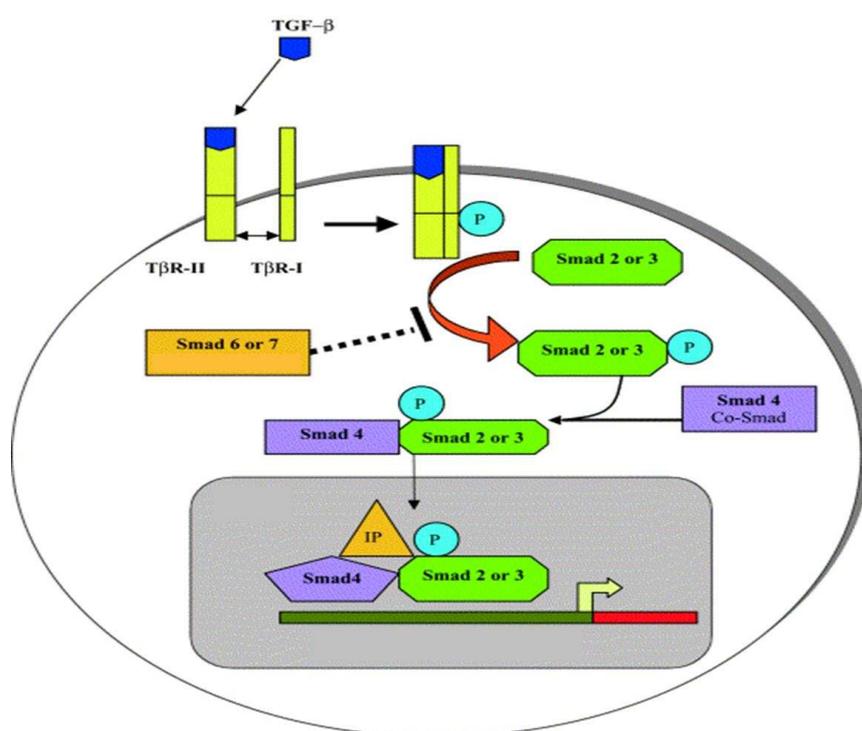
### **La via di trasduzione del segnale mediata da TGF $\beta$**

Il segnale mediato dal TGF $\beta$  viene propagato attraverso la via delle proteine Smad<sup>50</sup>. Le proteine della famiglia Smad appartengono a 3 gruppi funzionalmente e strutturalmente distinti:

- Smad attivate dal recettore (R-Smads: Smad1, 5, 8 specifiche per la *bone morphogenetic protein* BMP; Smad2, 3 specifiche per il TGF $\beta$ /attivina)
- Smad co-attivatorie (Smad4)

- Smad inibitorie (Smad6, 7)

In seguito al legame di TGF $\beta$  con la componente II del suo recettore (TGF $\beta$ RII), la componente I del recettore (TGF $\beta$ RI) viene attivata e fosforila le proteine R-Smad che formano omo-oligomeri che si convertono velocemente in etero-oligomeri contenenti Smad4. Il segnale attivato dal TGF $\beta$  viene modulato dalla Smad7 endogena (Figura 2). Questa Smad inibitoria si lega stabilmente al recettore I a livello della membrana cellulare e compete con le Smad2, 3 per l'attivazione del recettore prevenendo la loro fosforilazione e bloccando la trasduzione del segnale.



**Figura 2: Via di trasduzione del segnale mediata da TGF $\beta$ .** TGF $\beta$  si lega al recettore II (T $\beta$ R II) che dimerizza con il recettore I (T $\beta$ R I) che attiva le Smad2/3 fosforilandole. Nella forma attivata Smad2/3 si legano alla co-Smad ( Smad4) e migrano nel nucleo per attivare la trascrizione dei geni del collagene. La via è controllata dalle Smad inibitorie Smad 6/7. Modificata da Derk, 2003<sup>21</sup>

Smad7 può antagonizzare il segnale di TGF $\beta$  anche reclutando l'ubiquitina ligasi E3 al recettore favorendone l'ubiquitinazione e la successiva degradazione proteasoma-dipendente oppure reclutando le istondeacetilasi (HDAC) ai geni *target* riducendo l'acetilazione istonica e reprimendone in questo modo la trascrizione. Alla luce della sua importanza come regolatore negativo endogeno della via non sorprende che, oltre ai membri della famiglia TGF $\beta$ , anche altri segnali extracellulari possano regolarne l'espressione (TNF $\alpha$ , INF $\gamma$ , UV e norepinefrina).

Le proteine R-Smad e Smad4 nelle cellule normali sono ubiquitarie e risiedono principalmente nel citoplasma, ma dopo stimolazione con TGF $\beta$  sono rapidamente importate nel nucleo dove attivano la trascrizione di geni specifici. Nei fibroblasti umani, sono stati caratterizzati numerosi elementi e fattori di trascrizione implicati nella regolazione dei geni del collagene I che è il più abbondante collagene dei mammiferi e consiste di due catene,  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$ , che sono espresse in coordinazione. Studi sulla regione promotrice del collagene  $\alpha 2$  hanno indicato che la stimolazione da parte di TGF $\beta$  di tale promotore è mediata dal legame di Smad3/Smad4 ad una sequenza del DNA di 5-bp, CAGAC, chiamata *Smad binding element* che è presente nei promotori di molti geni TGF $\beta$  regolati<sup>51</sup>. Poiché l'affinità di legame a queste sequenze da parte di Smad3 è bassa, l'attivazione trascrizionale richiede l'assemblaggio di un complesso con fattori trascrizionali legati a siti adiacenti. La lista dei *partner* trascrizionali delle Smad include: fos-jun, Sp1, FAST-1, TFE-3, ATF-2 e GATA-3. Smad3 interagisce fisicamente con i coattivatori p300 e CBP che hanno attività istonacetiltrasferasica intrinseca (HAT). L'acetilazione enzimatica HAT-mediata del *core* istonico induce lo scioglimento della cromatina aumentando l'accessibilità dei fattori trascrizionali al DNA e stimolando la trascrizione dei geni *target*. Alternativamente le Smad legate al DNA reclutano repressori trascrizionali, uno di questi è una proteina chiamata *TGF $\beta$  interacting factor* (TGIF) che, a sua volta, interagisce fisicamente con le HDAC. Il reclutamento di una HDAC da parte del TGIF ai geni *target* specifici risulta in una compattazione della struttura del nucleosoma che limita l'accesso dei fattori trascrizionali al DNA e risulta in una repressione della trascrizione del gene *target*.

In ogni caso, non tutte le risposte TGF $\beta$  legate alla fibrosi sono Smad mediate, per esempio la stimolazione di fibronectina coinvolge la via di traduzione del segnale JNK; inoltre mentre l'induzione di CTGF nei fibroblasti normali è mediata da Smad3, l'upregolazione di CTGF nei fibroblasti sclerodermici è indipendente dalle Smad<sup>52,53</sup>.

### **La via di Smad è alterata nella SS**

La via delle Smad è costitutivamente attivata nei disordini fibrotici e vari meccanismi sono stati proposti per spiegare tale fenomeno<sup>54</sup>. Il primo consiste in un difetto nella modulazione della via da parte della proteina inibitoria Smad7 la cui espressione è spesso elevata nelle malattie infiammatorie dell'intestino ed associata ad una ridotta responsività al TGF $\beta$  e ad un aumento della secrezione di citochine proinfiammatorie. Al contrario, in altri disordini come la sclerodermia, l'espressione ridotta di Smad 7 porta ad

un'iperattivazione della via e ad una risposta abnorme al TGF $\beta$  nei tessuti danneggiati {Dong, 2002 #146}. Un altro potenziale meccanismo è l'attivazione della via del segnale in assenza della citochina TGF $\beta$ . Nei fibroblasti sclerodermici sono state osservate un'aumentata fosforilazione e un accumulo nucleare di Smad2/3 endogene in assenza dello stimolo esogeno e ciò può essere il risultato della stimolazione da parte di TGF $\beta$  prodotto in maniera autocrina. In questi fibroblasti, inoltre, la rete di microtubuli del citoscheletro è distrutta e ciò suggerisce che l'alterazione della tubulina comporti il sequestro e l'accumulo delle Smad da parte del citoscheletro in assenza di stimolo. Un ultimo meccanismo considera l'elevata trascrizione dei geni del collagene causata da un'elevata interazione di Smad 3 costitutivamente fosforilata con i cofattori Sp1 e p300 nei fibroblasti sclerodermici<sup>51</sup>.

### **Miofibroblasti**

Una caratteristica unica dei fibroblasti espianati dalle lesioni di SS è l'acquisizione di un fenotipo anormale, caratterizzato da un aumento della sintesi dell'ECM e dall'espressione di un marcatore dei miofibroblasti, l' $\alpha$ -actina del muscolo liscio ( $\alpha$ -SMA)<sup>55</sup>. I miofibroblasti, in condizioni fisiologiche, si trovano nei polmoni e nello stroma del MO, mentre durante i processi di riparazione tissutale sono la principale popolazione, anche se transiente, del tessuto di granulazione. Nei tessuti infiammati della sclerodermia i miofibroblasti potrebbero provenire da compartimenti cellulari multipli infatti, oltre che dai fibroblasti residenti potrebbero provenire dai progenitori mesenchimali reclutati dal MO o dalla circolazione inoltre, altre popolazioni di cellule residenti, come le cellule epiteliali, potrebbero servire da fonte alternativa di cellule simil-fibroblastiche. La transizione epitelio-mesenchima è un fenomeno ben caratterizzato durante il danno renale. Nella SS TGF $\beta$  è l'unico responsabile di questa transizione<sup>56</sup>. Altri progenitori di fibroblasti nella SS sono i periciti, cellule dei microvasi che mantengono l'integrità e la funzione microvascolare regolando ed essendo regolati dall'endotelio. La transizione dei periciti vascolari in cellule miofibroblastiche non solo contribuisce direttamente alla fibrosi, ma promuove anche l'espansione ed il differenziamento dei fibroblasti residenti immaturi in miofibroblasti<sup>57</sup>.

### 1.1.5 Trattamento

La terapia della SL rappresenta un altro problema tuttora aperto. In letteratura sono state pubblicate molte relazioni di casi, ma pochi *trial* clinici controllati. Gli approcci terapeutici sono mirati a :

- immunomodulazione;
- cambiamento del tono vascolare;
- controllo della fibrosi.

I trattamenti della SS sono stati utilizzati anche nella SL, ma non si ha prova che essi siano effettivamente efficaci. Nell'ultimo studio controllato, l'uso dell'interferone- $\gamma$  non si è rivelato migliore rispetto al placebo, ma si è dimostrato utile nel prevenire la comparsa di nuove lesioni<sup>58</sup>. Sono risultati essere efficaci la D-penicillamina, la sulfasalazina e gli steroidi orali<sup>59</sup>. Sono stati utilizzati i raggi UV, ma la loro reale efficacia non è stata confermata in studi controllati. Sono stati utilizzati in vari casi la vitamina D e i suoi analoghi, per via topica o sistemica, con risultati incoraggianti, ma nell'unico studio controllato non è risultata più efficace del placebo<sup>60</sup>

In tre studi, basse dosi di metotrexate (MTX), per via orale o sottocutanea, sono state associate a corticosteroidi, con risultati incoraggianti<sup>61,62,63</sup>. Il MTX (*4-aminno-N10-methylpteroyl glutamic acid*) è un analogo dell'acido folico ed è già largamente utilizzato per il trattamento di un'altra importante malattia autoimmune che è l'artrite reumatoide (RA)<sup>64</sup>. Molti meccanismi farmacologici dell'azione del MTX sono stati suggeriti inclusa l'inibizione della sintesi delle purine, la promozione del rilascio di adenosine, l'inibizione della produzione di citochine proinfiammatorie, la soppressione della proliferazione dei linfociti, della chemiotassi e dell'aderenza dei neutrofili e la riduzione delle immunoglobuline sieriche, tuttavia il meccanismo per il quale esso a basse dosi modula l'infiammazione nella RA non è ancora noto.

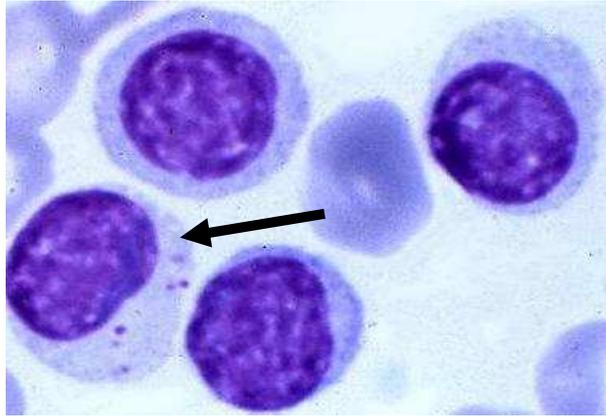
## 1.2 Linfociti Natural Killer (NK)

### 1.2.1 Caratteristiche morfologiche

Il SI innato ed adattativo contribuiscono alla difesa dell'ospite dalle infezioni intracellulari. Un'efficiente risposta immunitaria adattativa dipende dalla presentazione dell'Ag che avviene per mezzo delle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità I (MHC-I). Le MHC-I classiche (HLA-A,-B,-C) sono glicoproteine altamente polimorfiche di 44kDa ancorate alla membrana e associate in maniera non covalente alla  $\beta$ 2-microglobulina. Sono ubiquitariamente espresse in tutte le cellule nucleate e la loro principale funzione è quella di presentare i peptidi endogeni di 8-9aa ai linfociti T specifici che esprimono il recettore  $TCR\alpha\beta$  e il co-recettore CD8. Il riconoscimento di un peptide esogeno (virale, batterico o di altri agenti infettivi) presentato da una cellula presentante l'antigene (APC) per mezzo di un HLA-I, insieme all'ingaggio del co-recettore CD8 e di altri co-recettori, induce la funzione effettrice delle cellule T verso le cellule infettate. Oltre agli antigeni HLA classici, esiste un gruppo di molecole meno polimorfiche chiamate molecole HLA non classiche (HLA-E,-F,-G); anch'esse sono glicoproteine ancorate alla membrana, ma il loro profilo di espressione tissutale è più ristretto: HLA-E e -G sono specificamente espressi nella decidua materna durante la gravidanza dove i classici HLA non sono espressi e vengono riconosciute da alcuni recettori delle cellule NK, mentre poco si sa riguardo ad HLA-F. I processi dell'immunità adattativa appena descritti impiegano un certo tempo per avvenire, perciò è necessaria un'efficiente immunità innata per proteggere l'ospite durante questo periodo.

Le principali componenti della risposta immunitaria innata sono i linfociti NK che sono in grado di uccidere, senza una precedente sensibilizzazione, le cellule autologhe infettate da virus e le cellule tumorali. Essi appartengono alla famiglia dei grandi linfociti granulati (LGL) e rappresentano il 10-15% di tutti i linfociti del sangue periferico; nello stato quiescente hanno un diametro medio di 7-8 $\mu$ m, mentre nello stato attivato di 10-12 $\mu$ m e sono riconoscibili, dopo colorazione con May Grünwald-Giemsa, non solo per il nucleo reniforme, ma anche per la presenza nel citoplasma di granuli azzurrofilari (Figura 3). Poiché molte delle molecole di superficie espresse sulle cellule NK sono presenti anche sulle altre cellule ematopoietiche, quello che distingue le NK dalle altre cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) è la presenza sulla loro superficie di una combinazione unica dei marcatori CD56, CD16 (che riconosce il recettore Fc per le IgG,

FcγRIII) e CD2 e l'assenza dei marcatori CD3, CD14 e delle Ig di superficie. Non tutte le cellule NK esprimono questo fenotipo *consensus* e sono stati individuati dei sottogruppi CD56<sup>+</sup> CD16<sup>-</sup> e CD56<sup>-</sup> CD16<sup>+</sup> che sono funzionalmente diversi tra loro<sup>65</sup>. Altri marcatori di superficie espressi sulle cellule NK includono il recettore per l'IL-2 (IL-2R); altri recettori Fc (FcR); molecole d'adesione (CAM) tra cui le β2-integrine sono importanti per l'attivazione cellulare e per la trasduzione del segnale, mentre le β1-integrine, in particolare VLA-4, VLA-5 (recettori per la fibronectina) e VLA-6 (recettore per la laminina), partecipano all'adesione delle cellule NK alle componenti della ECM e nell'interazione NK-*target*; vari antigeni attivatori come HLA-DR, il recettore per la transferrina (CD71), CD69 e la molecola inducente l'attivazione Leu-23; infine, recettori clonotipici per il legame alle cellule *target*, la cui natura rimane controversa. Tali recettori sono *up*- o *down*-modulati a seconda dello stato d'attivazione cellulare. L'IL-2R è un complesso di tre catene polipeptiche: α (p55), β (p75) e γ (p64) espresse sulla superficie delle cellule linfoidi. Ognuna di queste componenti può legare l'IL-2 indipendentemente dalle altre, ma solo l'interazione di β più γ oppure di α più β più γ porta alla formazione di recettori con alta affinità (da 10<sup>-9</sup> a 10<sup>-11</sup>M). Le cellule NK quiescenti esprimono costitutivamente la catena β e solo un piccolo sottogruppo di cellule NK (CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>) esprime l'IL-2R ad alta attività. Dopo il legame di IL-2 le cellule NK *up*-regolano rapidamente l'espressione della catena β e producono le catene α *de novo* che si staccano rapidamente dalla superficie delle cellule NK (sIL-2R), così che i recettori IL-2R ad intermedia affinità sono individuabili sulle cellule NK stimulate con IL-2 *in vitro* o nei pazienti che ricevono una terapia con IL-2. Mentre la catena β svolge un ruolo importante nell'inizializzazione del segnale, quella γ è essenziale per l'internalizzazione del recettore, per la trasduzione del segnale indotto da IL-2 e per il controllo del tasso di dissociazione di IL-2 dal complesso recettoriale.



**Figura 3. Morfologia delle cellule NK.** Le cellule NK (freccia) sono grandi linfociti granulati (LGL) e rappresentano il 10-15% di tutti i linfociti del sangue periferico. Colorati con May Grünwald-Giemsa sono riconoscibili per il nucleo reniforme e per la presenza di granuli azzurrofilo nel citoplasma.

### 1.2.2 Caratteristiche funzionali

Le cellule NK sono dei *killer* selettivi che non attaccano il *self*, ma eliminano le cellule bersaglio suscettibili senza la necessità del processamento o della presentazione dell'Ag da parte di MHC. Il meccanismo alla base dell'interazione tra cellule NK e *target* è ancora poco conosciuto e prevede:

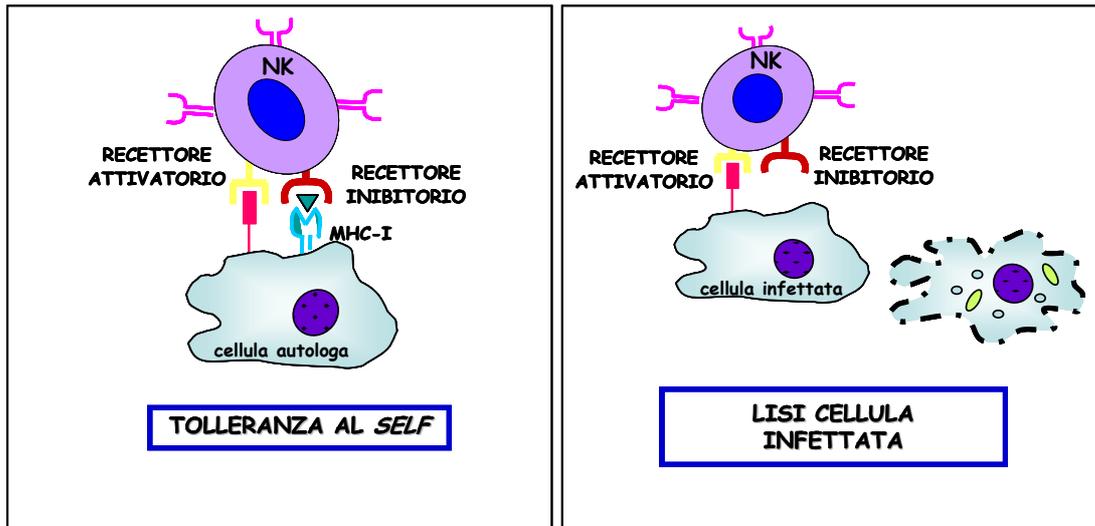
- riconoscimento della cellula *target*;
- legame alla cellula *target* che è mediato da molecole d'adesione (CAM);
- attivazione e degranulazione attraverso il riarrangiamento dei granuli citoplasmatici e rilascio di enzimi proteolitici;
- lisi della cellula *target*.

Sembra che l'espressione di MHC-I sulle cellule *target* conferisca loro protezione contro la lisi, mentre l'assenza o la riduzione di tale espressione induca suscettibilità alla lisi (ipotesi del *missing-self*) (Figura 4). Le cellule NK sono in grado di riconoscere le molecole MHC-I o le molecole MHC-I simili attraverso un'unica classe di recettori che possono inibirne o attivarne la funzione. Tali recettori sono in grado di distinguere le cellule normali autologhe da quelle allogeniche o trasformate che hanno perso o *down-regolata* l'espressione delle molecole MHC-I. In questo contesto, certi virus citopatici hanno sviluppato strategie per sfuggire al controllo delle cellule NK; HCMV, ad esempio, produce diverse proteine dette *unique short proteins* (USP) che in seguito al legame con le HLA-I, ne modificano la struttura tridimensionale così che non siano più in grado di essere riconosciute dai KIR specifici. Di conseguenza, le cellule diventano suscettibili alla lisi<sup>13</sup>.

Per quanto concerne le cellule tumorali, esse esprimono frequentemente HLA-I alterate sulla loro superficie, ad esempio, più dell'85% dei carcinomi metastatici sono caratterizzati da una mancata espressione delle HLA-I e ciò le rende suscettibili alla lisi. Tuttavia, l'inibizione da parte delle MHC-I non è sempre sufficiente per prevenire la citotossicità NK questo perché le cellule NK posseggono altri recettori funzionali di natura prevalentemente attivatoria che operano attraverso un meccanismo MHC-I indipendente: infatti, quando le cellule tumorali o infettate da virus esprimono MHC-I a bassa densità non impegnando a sufficienza i recettori inibitori, i segnali da parte dei recettori attivatori prevalgono e mediano la lisi della cellula infettata (figura 4). Quindi, l'immunosorveglianza dipende dalla capacità delle cellule NK di riconoscere e uccidere i loro *target* e le molecole HLA-I, interagendo con i recettori delle cellule NK (NKR), rappresentano un importante meccanismo di controllo ed è per questo che tutte le cellule NK normali esprimono almeno un recettore inibitorio che riconosce il *self*. Ritroviamo una significativa eccezione nelle prime fasi della maturazione delle cellule NK che avviene nel MO: le cellule NK immature non esprimono i NKR, ma solo i recettori attivanti e un efficiente macchinario citolitico. La ragione per cui non uccidono le cellule del MO di passaggio è l'attivazione di un meccanismo di protezione che sembra coinvolgere il recettore 2B4. 2B4 e NTBA sono membri della famiglia CD2 e hanno una funzione duale, attivatoria e inibitoria, che dipende dalla disponibilità di proteine regolatorie a valle della via di trasduzione del segnale chiamate SAP (proteine associate a molecole che conducono il segnale nei linfociti). Le proteine SAP si legano alla porzione citoplasmatica del recettore 2B4 o NTBA e conducono un segnale che porta all'attivazione delle NK. L'assenza di SAP, un difetto molecolare tipico in una patologia linfoproliferativa legata al cromosoma X (XLP), risulta in un legame della fosfatasi SHP-1 a 2B4<sup>66</sup>. L'attivazione di SHP-1 provoca la defosforilazione di molecole cruciali coinvolte nelle vie d'attivazione, bloccando così la citotossicità mediata dalle cellule NK. 2B4 è espresso nelle NK addirittura nelle prime fasi del loro differenziamento mentre SAP viene espressa solo negli ultimi stadi<sup>67</sup>.

Ci sono altre funzioni delle cellule NK biologicamente e fisiologicamente importanti come ad esempio il fatto che tra i linfociti sono le prime ad attivarsi e ad andare incontro ad espansione in presenza di IL-2. In seguito all'attivazione, le cellule NK sviluppano strutture di membrana chiamate podosomi che facilitano il loro movimento lungo le superfici solide e il loro legame alle proteine della ECM; ciò è associato a cambiamenti nell'espressione dei marcatori di attivazione e delle CAM sulla superficie.

Inoltre, le cellule NK attivate sono in grado di produrre varie citochine sia di tipo Th1 come  $\text{INF}\gamma$ ,  $\text{TNF}\alpha$ , GM-CSF, sia di tipo Th2 come IL-5, 10, 13 nonché  $\text{TGF}\beta$ . Inoltre, *up*-regolano l'espressione di recettori per fattori chemiotattici, citochine, fattori di crescita ed ormoni e sono in grado di produrre enzimi alcuni dei quali rimangono associati alle membrane cellulari e sono coinvolti nelle interazioni cellula-cellula, altri sono intracellulari e vengono rilasciati durante la lisi.



**Figura 4. Meccanismo d'azione delle NK.** Le cellule NK sono dotate di recettori inibitori che riconoscono le MHC-I sulle cellule target autologhe, in questo modo mediano la tolleranza per il *self*. Le cellule tumorali o infettate da virus esprimono MHC a bassa densità non impegnando a sufficienza i recettori inibitori così che i segnali da parte dei recettori attivatori prevalgono e mediano la lisi della cellula infettata.

### 1.2.3 I recettori umani delle cellule NK (NKR)

Ogni cellula NK esprime un repertorio di recettori inibitori ed attivatori e l'attività citotossica è regolata da un equilibrio tra segnali provenienti da questi recettori che interagiscono con le molecole MHC-I e MHC-I simili sulle cellule bersaglio. Sono state descritte tre principali famiglie di NKR:

- *killer immunoglobulin Ig-like receptors* (KIR) che riconoscono le molecole MHC-I classiche;
- la superfamiglia dei *C-type lectine* (KLR) che riconoscono le MHC-I non classiche e le MHC-I simili;
- *natural cytotoxicity receptors* (NCR) i cui ligandi rimangono ancora poco definiti.

Infine, un'altra classe di recettori è costituita dai co-recettori, ma i loro ligandi e la loro significatività rimangono sconosciute.

## **KIR**

I KIR sono la famiglia meglio caratterizzata tra i NKR<sup>68</sup>. Questa famiglia comprende recettori inibitori e attivatori accoppiati che riconoscono in maniera specifica differenti gruppi allelici delle molecole HLA-A,-B,-C (Figura 5). Strutturalmente i KIR sono dotati di domini extracitoplasmatici immunoglobulina-simili (*2Ig-like e 3Ig-like*), responsabili del riconoscimento delle HLA-I e di domini intracitoplasmatici. Sono classificati in *long* e *short* a seconda della lunghezza dei domini intracitoplasmatici (KIR2DL e KIR3DL, KIR2DS e KIR3DS): la coda intracitoplasmatica lunga si associa con un motivo ITIM (motivo inibitorio intracellulare basato su tirosina) e media un segnale di tipo inibitorio, infatti in seguito al riconoscimento di un ligando specifico viene fosforilata sui residui di tirosina presenti nei motivi ITIM reclutando specifiche fosfatasi con omologia Src (SH) 2 (SHP-1, SHP-2), essenziali per la mediazione di segnali inibitori. La coda corta media segnali attivatori in seguito alla sua associazione con un motivo ITAM (motivo attivatorio intracellulare basato su tirosina). Non esiste un KIR specifico per ogni molecola MHC-I, ma ogni gruppo di KIR riconosce determinanti condivisi da un gruppo di molecole MHC-I; inoltre, per molti alleli HLA-A e -B non esistono KIR corrispondenti che li riconoscano indicando che il repertorio dei KIR non è esclusivo per gli allotipi umani classici. HLA-C è l'isotipo di classe I principalmente coinvolto nella regolazione inibitoria delle cellule NK umane.

Un KIR particolare è il KIR2DL4 che riconosce la molecola MHC-I non classica HLA-G dotata di limitato polimorfismo e di una distribuzione tissutale unica, essendo espressa sui trofoblasti fetali extravillosi che invadono la decidua materna durante la gravidanza. A differenza di tutti gli altri KIR che sono clonalmente distribuiti, KIR2DL4 è espresso su tutte le cellule NK; nonostante la sua coda intracitoplasmatica lunga, agisce come un recettore attivatorio mediando la funzione di produrre INF $\gamma$  senza attività litica e questa funzione attivante non dipende dalla sequenza ITIM bensì da un dominio transmembrana intatto. La precisa funzione di questo recettore non è chiara: un'ipotesi è che possa mediare la tolleranza del feto emiallogenico o la vascolarizzazione al sito di impianto tramite secrezione di INF $\gamma$  durante la gravidanza.

Il repertorio dei KIR espressi dalle cellule NK di un individuo non dipende dal suo tipo HLA, ma è determinato dal suo genotipo KIR. I geni che codificano HLA e KIR segregano in maniera indipendente. Sono stati individuati 15 geni KIR localizzati sul cromosoma 19p13.4 nel complesso del recettore dei leucociti (LCR). Esiste un'estesa variabilità aplotipica nel numero e nel contenuto dei geni nonché un'elevato polimorfismo

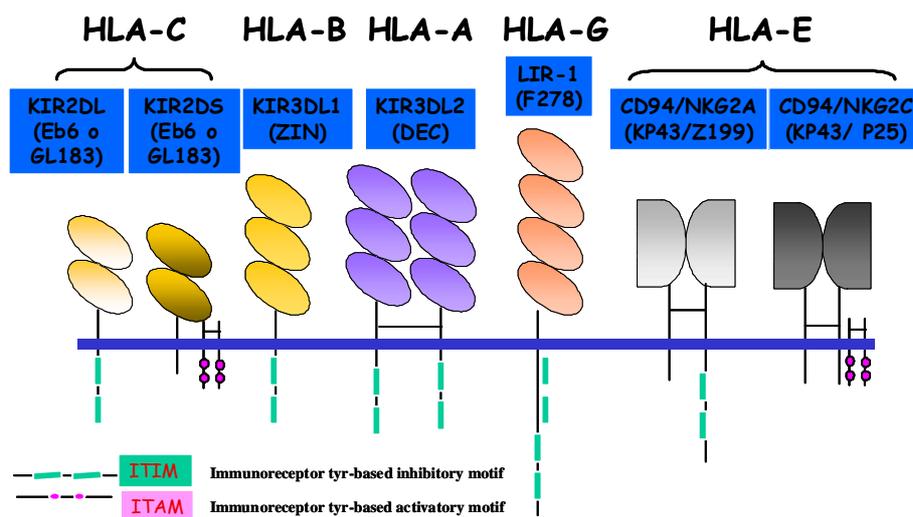
allelico per i geni KIR di un individuo. Sono stati individuati due gruppi principali di aplotipi KIR umani, l'aplotipo A e l'aplotipo B, in base alla distribuzione e al numero di geni KIR attivatori e inibitori. Sia il gruppo degli aplotipi A che il gruppo degli aplotipi B contengono parecchi KIR inibitori, tuttavia l'aplotipo A è principalmente inibitore avendo solo KIR2DS4 e KIR2DL4 come geni per i recettori attivatori. Invece, l'aplotipo B contiene diverse combinazioni di geni KIR attivatori. L'aplotipo A è più comunemente espresso in omozigosi rispetto all'aplotipo B che viene espresso solo in eterozigosi. I geni KIR di un individuo sono polimorfici, così avviene che gli aplotipi KIR che sono identici per contenuto genico differiscano significativamente a livello allelico. In conclusione, il contenuto di geni KIR, il polimorfismo allelico e la combinazione di aplotipi materni e paterni contribuiscono ad una diversità significativa nel genotipo KIR di un individuo. L'espressione dei geni KIR nelle cellule NK umane avviene in modo clonale. Studi su cloni di cellule NK di individui normali hanno mostrato che sulle cellule di un dato individuo possono essere espressi da 1 a 8 differenti recettori provenienti da tutti i geni KIR attivatori o inibitori presenti in un dato genotipo. Questo processo sembra essere casuale e coinvolge il silenziamento genico per mezzo di un meccanismo di metilazione del DNA. Inoltre, il possesso di un gene KIR funzionante non significa che esso sarà espresso sulle cellule NK di un individuo.

## **KLR**

I recettori appartenenti a questa famiglia sono eterodimeri costituiti da una subunità comune (CD94) covalentemente legata ad una catena polipeptidica NKG2, codificata da un gene della famiglia *C-type lectine*. La loro funzionalità specifica risiede nei domini intra ed extracitoplasmatici delle molecole NKG2 ed esistono 4 trascritti correlati appartenenti alla famiglia genica NKG2 localizzati assieme al gene CD94 nel cromosoma 12p12.3-13.1. Essi sono NKG2A (e la sua variante di *splicing* NKG2B), NKG2C, NKG2E (e la sua variante NKG2H) e NKG2F. Di questi solo CD94/NKG2A è un recettore inibitorio in quanto la subunità NKG2A possiede una coda intracitoplasmatica lunga con un motivo ITIM, mentre CD94/NKG2C è un recettore attivatorio poiché la catena NKG2C possiede una coda intracitoplasmatica corta che si associa ad una proteina adattatrice che porta un motivo ITAM. Entrambi riconoscono le molecole MHC-I non classiche HLA-E (Figura5). A tale famiglia appartiene anche il recettore attivatorio NKG2D il cui gene pur trovandosi tra quello per CD94 e quelli per NKG2A-E sul cromosoma 12p12.3-13.1, ha solo una piccola omologia di sequenza con NKG2A-E. Diversamente dalle altre molecole NKG2

non si associa con CD94 per formare eterodimeri, ma è espresso come omodimero e la trasduzione del segnale avviene attraverso l'associazione del suo dominio intracellulare con una proteina adattatrice, DAP10, che recluta la fosfoinositolo 3 chinasi (PI3K) dopo fosforilazione. NKG2D è costitutivamente espresso da tutte le cellule NK e da quasi tutte le cellule T esprimenti la forma  $\gamma\delta$  del TCR ( $T\gamma\delta$ )<sup>69</sup>. I ligandi per NKG2D includono i peptidi polimorfici MHC-I simili (MIC-A, -B) e le proteine che legano ULB16 (ULBP) del HCMV. Queste molecole, in genere, non sono espresse sulle cellule normali, hanno una distribuzione tissutale ristretta all'epitelio intestinale in condizioni di stress, ma possono essere indotte anche in tipi cellulari permissivi (cellule endoteliali, cheratinociti, fibroblasti e monociti, ma non nei linfociti CD4, CD8, CD19) in seguito ad infezioni virali o batteriche, trasformazione neoplastica e proliferazione. L'espressione di questi ligandi rappresenta un segnale di un *self* alterato o di pericolo per il sistema immunitario innato in seguito al quale vengono promosse le risposte da parte delle cellule NK e T<sup>70</sup>.

Un altro recettore che riconosce le molecole MHC-I non classiche sulle cellule bersaglio è il *leukocyte immunoglobulin like receptor 1* (LIR1) appartenente alla famiglia *immunoglobulin like transcripts* (ILT) i cui componenti sono espressi principalmente sulle cellule mieloidi, sulle cellule dendritiche e sui linfociti B. LIR-1 è un recettore inibitorio espresso anche sulle cellule NK e che riconosce le HLA-G (Figura 5).



**Figura 5. Specificità HLA dei NK.**

I KIR riconoscono sulle cellule bersaglio le molecole HLA classiche (HLA-A, -B, -C), i recettori LIR-1 riconoscono le molecole classiche HLA-G, mentre i KLR quelle non classiche HLA-E.

## NCR

I NCR sono recettori di natura attivatoria con struttura immunoglobulino-simile. Ne sono stati descritti 3, Nkp30, Nkp46 e Nkp44 e sono esclusivamente espressi dalle cellule NK; in particolare Nkp46 e Nkp30 si trovano sulla superficie delle cellule NK sia nello stato quiescente che attivato, mentre Nkp44 è espresso solo sulla superficie delle cellule NK attivate. Questi recettori hanno un ruolo cruciale nell'uccisione delle cellule tumorali. L'importanza dei NCR è stata osservata in pazienti affetti da leucemia mieloide acuta (AML): le cellule leucemiche esprimerebbero una quantità insufficiente dei ligandi per i NCR e questo le renderebbe resistenti alla citotossicità delle cellule NK<sup>71</sup>.

Nonostante sia noto il ruolo dei NCR nella difesa antitumorale e antivirale, poco si sa sulla natura dei loro ligandi<sup>72</sup>. Recentemente, il gruppo di Arnon ha dimostrato che Nkp46 e Nkp44, ma non Nkp30, si legano in maniera specifica all'emagglutinina (HA) del virus dell'influenza (IV) e all'emagglutinina neuroaminidasi del Sendai virus (SV)<sup>73,74</sup>. Il legame è diretto, avviene tra l'HA e residui sialilati nei domini prossimali dei recettori e rappresenta una caratteristica generale conservata tra le molecole di HA derivate da vari ceppi virali<sup>75</sup>. Dall'altra parte, è stato individuato un ligando virale anche per Nkp30 che è pp65, la principale proteina tegumento del HCMV. Inoltre, alcuni studi hanno rivelato che gli eparan solfati associati alla membrana potrebbero essere riconosciuti da Nkp30 e Nkp46. In particolare Nkp46 riconosce il motivo HSPG (proteoglican eparan solfato) di membrana rendendo possibile la lisi delle cellule tumorali<sup>76,77</sup>. Oltre a cellule neoplastiche e a cellule infettate da virus, le cellule NK possono lisare cellule infettate da batteri oppure inibire la crescita batterica *in vitro* e produrre INF $\gamma$  che agisce sui macrofagi inducendo resistenza alle infezioni batteriche intracellulari<sup>78</sup>. L'infezione umana da *Mycobacterium tuberculosis* fornisce un modello per lo studio della risposta immunitaria innata ai patogeni intracellulari. Sembra che le cellule NK lisino i monociti infettati da *Mycobacterium Tuberculosis* per mezzo di Nkp46 e NKG2D. NKG2D riconosce la proteina UL16 sulle cellule *target*, mentre Nkp46 si lega per mezzo della vimentina, una proteina del citoscheletro che mantiene l'architettura del citoplasma<sup>79</sup>.

## Co-recettori

Un altro gruppo di molecole di superficie possono contribuire all'attivazione e alla citotossicità naturale delle cellule NK e la loro capacità di trasdurre il segnale dipende, in molti casi, da un ingaggio simultaneo di altri recettori attivatori e per questo motivo, sono meglio classificati come co-recettori<sup>80</sup>. I recettori 2B4 e NTBA possiedono una funzione

duale opposta, attivatoria e inibitoria, che dipende dalla disponibilità nella loro via di trasduzione del segnale di molecole SAP che sono essenziali per la funzione attivante di 2B4. In condizioni normali, la coda intracitoplasmatica di 2B4 lega le SAP mediando un segnale di natura attivatoria mentre, in assenza di SAP, viene trasdotto un segnale inibitorio. 2B4 è espresso sulle cellule NK, sui linfociti T $\gamma\delta$ , nonché sul 50% dei linfociti T CD8<sup>+</sup>. Nel topo e nell'uomo, 2B4 si lega alla molecola CD48 che è diffusamente espressa sulle cellule ematopoietiche e la sua espressione è aumentata in seguito a infezione virale o in seguito a stimolazione da parte di INF- $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ . Mentre nelle NK murine questo recettore ha funzione inibitoria, nelle cellule NK umane ha funzione attivatoria o co-stimolatoria per altri recettori<sup>67,81,82</sup>.

Un altro recettore di natura attivatoria è stato denominato molecola accessoria I di DNAX (DNAM-I). Il gruppo di Bottino ha individuato i ligandi che sono due membri della famiglia delle nectine: il recettore del poliovirus (PVR/CD155) e la nectina 2 (CD112)<sup>71</sup>. Entrambe queste molecole sono espresse abbondantemente sulle linee cellulari tumorali comprese quelle dei carcinomi, melanomi e neuroblastomi. La lisi delle cellule di neuroblastoma, ad esempio, dipende dall'interazione dei NCR con i loro ligandi; infatti, le cellule che non lo esprimono sono resistenti, mentre quelle che lo esprimono sono suscettibili alla lisi da parte delle cellule NK.

#### **1.2.4 NKR e autoimmunità**

Il mantenimento dell'immunosorveglianza sulle cellule infettate o trasformate senza provocare reazioni autoimmuni è una proprietà intrinseca delle cellule NK che svolgono questo ruolo per mezzo di una regolazione negativa da parte di recettori inibitori che riconoscono le molecole MHC-I sulle cellule normali. Per evadere questo controllo le cellule trasformate o infettate possono diminuire l'espressione dei ligandi per i recettori inibitori o aumentare l'espressione di quelli per i recettori attivatori. Il bilancio nell'espressione di ligandi attivatori e inibitori determinerà se la cellula sarà un *target* dell'eliminazione mediata dalle cellule NK (Figura 4). In varie patologie autoimmuni quali il lupus eritematoso sistemico (SLE) e la sindrome di Sjogren è stata descritta riduzione del numero e dell'attività citotossica dei linfociti NK. Anormalità nel numero e nell'attività delle cellule NK sono state riportate anche nella SS, ma con risultati contrastanti<sup>83</sup>. Il modo in cui queste cellule mediano fenomeni di autoimmunità è attualmente oggetto di studi che indicano che alcuni NKR potrebbero essere implicati<sup>84</sup>. Ad esempio, lo sviluppo dell'artrite psoriatrice è associato all'espressione di certi alleli HLA contemporaneamente a

certi KIR attivatori in assenza dei KIR inibitori e ciò è stato osservato anche per lo sviluppo della SS<sup>58</sup>.

E' opinione corrente che i recettori attivatori siano evoluti da recettori inibitori in risposta alle infezioni virali. Un caso esemplare è rappresentato dal recettore 2B4 che nei topi è inibitorio mentre negli uomini è attivatorio<sup>67</sup>. Si pensa che originariamente la natura di 2B4 fosse inibitoria, ma che con l'espressione delle proteine SAP, sia diventato attivatorio. Sembra che 2B4 umano abbia mantenuto il suo potenziale inibitorio che però potrebbe aver assunto un ruolo minore nelle cellule NK umane nel corso dell'evoluzione con l'associazione delle SAP ed è possibile che la funzione attivante di 2B4 sia evoluta grazie alla pressione selettiva da parte delle infezioni virali; se questo fosse vero, il più probabile candidato sarebbe il virus Epstein Barr (EBV). Studi epidemiologici dimostrano un'alta carica di EBV nella popolazione umana (più del 99% di sieropositività in alcune popolazioni). Si è osservato che i linfociti B infettati da EBV *up*-regolano il ligando di 2B4, la molecola CD48, per azione di una proteina virale che agisce sull'*enhancer* del gene CD48; tale *up*-regolazione potrebbe essere stata usata per attivare le cellule NK piuttosto che per inibirle. L'importanza di 2B4 come recettore attivante nell'infezione da EBV è evidente dall'alta mortalità della sindrome XLPD in cui l'attivazione delle cellule NK tramite 2B4 è difettiva. Con 2B4 funzionante come un recettore attivatorio le cellule NK umane devono aver perso il livello di tolleranza al *self* mediato da 2B4-CD48 e ciò potrebbe aver diminuito la soglia d'attivazione delle NK e potrebbe aver condotto all'autoimmunità<sup>66</sup>. In conclusione, secondo tale ipotesi, le malattie autoimmuni potrebbero essere il prezzo pagato da un organismo per tenere a bada l'infezione virale originaria e il beneficio derivante dal controllo dell'infezione deve essere stato maggiore rispetto alla perdita dell'autoimmunità generata da questo cambiamento.

Ci sono altre evidenze del fatto che le cellule NK possono essere responsabili di fenomeni di autoimmunità: per esempio, esse possono ricevere segnali attivatori e diventare autoreattive in seguito all'interazione con cellule dendritiche autologhe, cellule stromali del MO o fibroblasti della pelle<sup>85-87</sup>. Le cellule dendritiche (DC) sono cellule APC che, in seguito al legame e al processamento di Ag virali o batterici, sono in grado di stimolare i linfociti T a proliferare ed a produrre citochine infiammatorie comprese IL-1, IL-12, IL-18. Le cellule NK attivate da IL-2 legano le DC autologhe attraverso l'interazione tra ICAM 1, espresso sulle APC, e LFA1, il suo recettore, espresso sulle cellule NK portando all'attivazione della chinasi II calcio calmodulina (CAMKII), alla degranulazione ed al rilascio extracellulare di perforina e granzimi, ma l'uccisione delle

DC autologhe può essere indotta anche dall'attivazione della PI3K che avviene in seguito al legame mediato dai NCR ed è stato dimostrato che la lisi delle APC correla fortemente con la densità di superficie dei NCR e che cloni di cellule NK che esprimono basse quantità di NKp30 e NKp46 oppure l'uso di specifici AcMo che mascherano la funzione di NKp30 e NKp46 riducono fortemente, se non aboliscono, la lisi delle APC<sup>88</sup>. Le cellule NK possono danneggiare anche cellule stromali del MO (BMSC) o fibroblasti ottenuti da biopsie di pelle (SF). Anche questa interazione avviene per mezzo del legame tra ICAM1-LFA1 e attiva le cellule NK che producono varie citochine proinfiammatorie quali INF $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-10 e IL-1 $\beta$ . Anche questa funzione sembra essere mediata dai NCR e da NKG2D che riconoscono sulle cellule stromali e sui fibroblasti le molecole MIC-A e la proteina legante UL16, ULBP3.

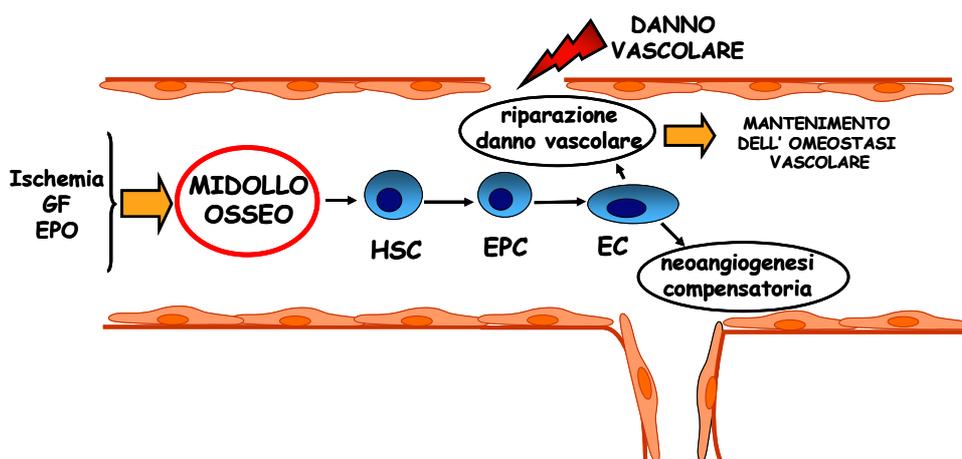
Un altro meccanismo che potrebbe spiegare l'insorgenza dei fenomeni di autoimmunità è mediato da NKG2D. NKG2D è espresso su tutte le cellule NK umane e sui linfociti Tc e l'acquisizione del suo ligando MIC sulla superficie delle cellule *target* può condurre ad una rottura della tolleranza nel momento in cui esso sia indotto in maniera aspecifica da un processo infiammatorio. Dati di letteratura supportano fortemente l'ipotesi che la via d'attivazione di NKG2D partecipa allo sviluppo di disordini immunomediati<sup>69,89</sup>. Il coinvolgimento di NKG2D e dei suoi ligandi nelle malattie autoimmunitarie fu individuato per la prima volta nell'artrite reumatoide (AR). Da allora, vari lavori hanno mostrato che la severità dell'AR correla con l'espansione, nel sangue periferico e nei tessuti sinoviali, di una popolazione di linfociti T CD4<sup>+</sup> privi della molecola costimolatoria CD28, ma esprimenti il recettore NKG2D, normalmente assente nei CD4<sup>+</sup>, la cui espressione è indotta da TNF $\alpha$  e IL-15 abbondanti nelle sinovie infiammate dei pazienti<sup>90</sup>. NKG2D riconosce i ligandi MIC espressi in maniera aberrante sui sinoviociti stimolando la proliferazione ed il rilascio di INF $\gamma$  da parte dei CD4+CD28-autologhi<sup>70</sup>. Il coinvolgimento dell'interazione NKG2D-MICA è stata individuato anche nella distruzione dell'epitelio intestinale da parte dei linfociti intraepiteliali (IEL) in un'altra patologia autoimmune, la celiachia. Le molecole MICA sono abbondantemente espresse sulla superficie epiteliale dei pazienti affetti da celiachia, tale espressione è indotta dalla ghiandola attraverso un meccanismo in cui è coinvolta l'IL-15. Ciò stimola l'attivazione diretta degli IEL attraverso l'ingaggio di NKG2D conducendo ad una citotossicità nei confronti delle cellule epiteliali bersaglio ed in seguito all'attivazione della risposta adattativa da parte dei CD8<sup>91</sup>.

## 1.3 Progenitori endoteliali (EPC)

### 1.3.1 Rigenerazione dell'endotelio vascolare

L'endotelio vascolare rappresenta un confine dinamico tra il circolo sanguigno ed i tessuti circostanti. Esso agisce come superficie non adesiva per le piastrine ed i leucociti e produce una varietà di fattori regolatori, come le prostaglandine e l'ossido nitrico (NO). I soggetti sani hanno un basso ricambio dell'endotelio ed un basso numero di cellule endoteliali mature (EC) circolanti, ma lo stress da danno acuto dell'endotelio lo fa aumentare rapidamente. La rigenerazione dell'endotelio vascolare può avvenire dalla migrazione e proliferazione delle EC mature secondo un processo detto angiogenesi. Tuttavia la capacità delle EC di sostituire l'endotelio danneggiato è limitata poiché sono cellule terminalmente differenziate e dotate di basso potenziale proliferativo, di conseguenza tale processo necessita del supporto di altri tipi cellulari.

Nel sangue periferico degli adulti esiste un sottotipo unico di cellule circolanti che derivano dal MO con proprietà simili a quelle degli angioblasti embrionali che hanno la capacità di proliferare e differenziarsi in cellule EC mature. Queste cellule sono definite progenitori endoteliali (EPC) ed hanno la capacità di indurre e di modulare l'angiogenesi, di stimolare la rigenerazione dei vasi del sangue danneggiati oppure di indurre la vasculogenesi con cui si indica la capacità di formare nuovi vasi del sangue senza la necessità di quelli preesistenti in aree con ridotto apporto d'ossigeno (Figura 6).



**Figura 6: EPC, angiogenesi e mantenimento dell'omeostasi vascolare.** Le EPC sono mobilizzate dal MO da diversi fattori e, differenziandosi in EC mature, sono responsabili della riparazione del danno vascolare, dei fenomeni di angiogenesi e anche di quelli di vasculogenesi.

### 1.3.2 Caratterizzazione

Nella gerarchia del sistema ematopoietico il termine “progenitori” identifica cellule con un più basso potenziale differenziativo rispetto alle cellule staminali, tuttavia, le EPC posseggono caratteristiche di staminalità che includono la capacità di rigenerarsi, la clonogenicità e la capacità differenziativa<sup>92</sup>. La prima descrizione dettagliata dell'isolamento dei progenitori endoteliali fu riportata da Asahara e collaboratori nel 1997<sup>93</sup>. Essi descrissero l'isolamento dal sangue periferico, per mezzo di biglie magnetiche, di cellule CD34<sup>+</sup> che, piastrate su fibronectina, crescevano come cellule con caratteristiche endoteliali. Alcuni anni dopo, sono stati definiti tre marcatori che caratterizzano queste cellule: i marcatori staminali CD34 e CD133, e il marcatore endoteliale VEGFR2. Successivamente, Hristov e Weber proposero uno schema per il differenziamento degli emangioblasti umani in EPC in base al cambiamento del profilo dei marcatori d'espressione<sup>94</sup>:

1. gli emangioblasti del MO che davano origine alle EPC furono definiti come CD133<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, VEGFR2<sup>+</sup>;
2. le EPC precoci esprimevano, oltre ai marcatori di staminalità CD34 e CD133, marcatori del lineage endoteliale, incluso il *platelet endothelial cell adhesion molecule 1* (PECAM-1/CD31), mentre erano negative per altri marcatori endoteliali come il fattore di Von-Willebrandt, VEGF, caderina, E-selectina ed ossido nitrico sintasi endoteliale;
3. le EPC tardive esprimevano ancora CD34, ma non più CD133.

Poiché le CE mature dei grandi vasi sono cellule CD34<sup>-</sup> ed esprimono VEGFR2, VE-caderina e fattore di von-Willebrandt, sembra che la perdita di CD133 e, in seguito, di CD34 rifletta la possibile trasformazione delle EPC circolanti in CE differenziate. Invece, le EPC della microvascolatura continuano ad esprimere CD34. Non esiste una chiara definizione del momento in cui le EPC diventano cellule mature e totalmente differenziate *in vivo*. Una possibilità è la perdita di CD34/CD133 e una concomitante o successiva espressione del fattore di Von Willebrandt insieme con altri marcatori endoteliali specifici e un possibile punto di partenza di questo processo differenziativo potrebbe essere la migrazione dei progenitori endoteliali dal MO alla circolazione<sup>95</sup>.

### 1.3.3 Origine

La fonte meglio caratterizzata delle EPC sono le cellule staminali ematopoietiche (HSC). Le HSC si trovano associate alle cellule stromali all'interno di nicchie nel MO dove sono in uno stato quiescente e sono mobilizzate in seguito all'attivazione di proteinasi come l'elastasi, la catepsina G e le MMP. Questi enzimi tagliano proteoliticamente le molecole di membrana responsabili per il legame delle EPC alle cellule stromali del MO, in particolare, le cellule stromali del MO esprimono il ligando kit (mKit-L) che si lega al recettore c-Kit sulle EPC quando è nella sua forma solubile (sKitL). La metalloproteinasi MMP-9 taglia mKitL in sKitL il quale interagisce con il recettore cKit mediando la trasduzione del segnale essenziale per il differenziamento e la migrazione delle EPC dal MO<sup>96-98</sup>(Figura 7). I primi studi che evidenziarono che le HSC potevano dare origine a cellule di natura endoteliale furono eseguiti isolando cellule CD34<sup>+</sup> o CD133<sup>+</sup>: entrambe queste popolazioni, *in vitro*, erano in grado di differenziare in EC se messe in certe condizioni che stimolavano il differenziamento endoteliale<sup>93,99</sup>. Altri studi evidenziarono che l'iniezione di cellule CD34 e CD133 stimolava la neovascolarizzazione dei tessuti ischemici nei modelli murini<sup>93,100</sup>.

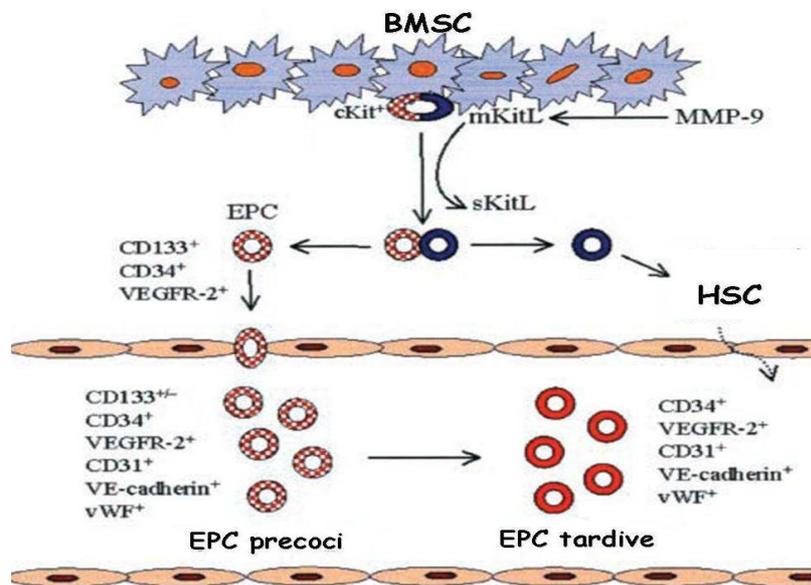
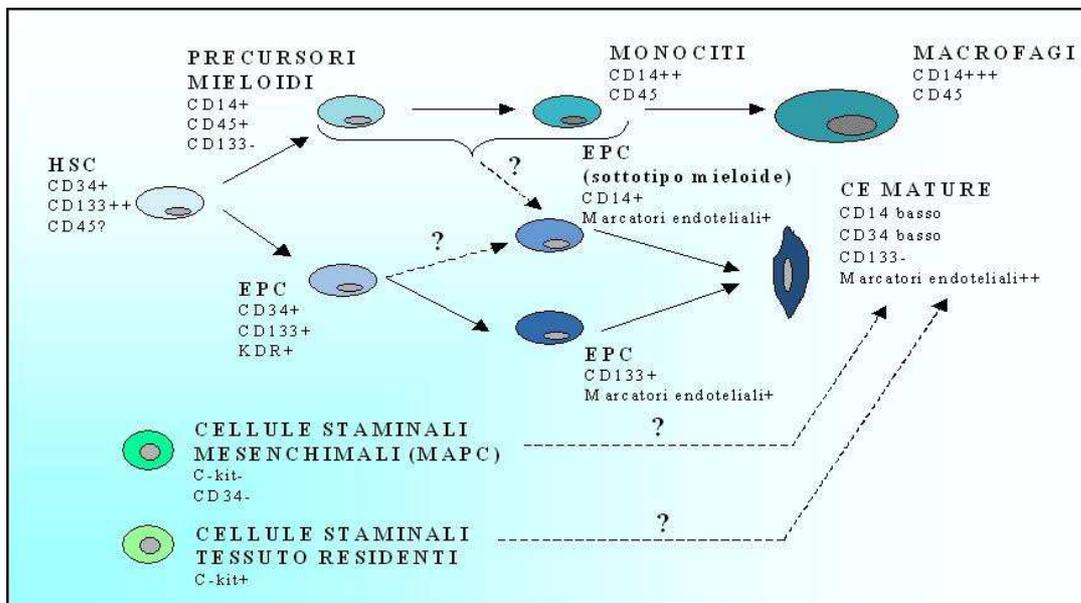


Figura 7. EPC derivate dal MO. La fonte principale dei precursori endoteliali sono le cellule staminali ematopoietiche che vengono mobilizzate dal MO. Inizialmente queste EPC hanno caratteristiche simil-angioblastiche, ma una volta in circolo perdono i marcatori di staminalità per acquisire quelli endoteliali. Modificata da Hristov, 2003<sup>94</sup>.

Anche le cellule mieloidi sono mobilizzate dal MO e derivano dalle HSC e ci sono numerose evidenze del fatto che esse possano differenziare in EC<sup>101</sup>, anche se dotate di più bassa capacità proliferativa rispetto alle HSC, le EPC derivate da precursori mieloidi hanno la stessa capacità di aumentare la neovascolarizzazione nei modelli sperimentali<sup>102</sup>. Esistono delle evidenze del fatto che anche le cellule mesenchimali staminali (MSC) del MO, *in vivo*, possano differenziare in cellule EC e contribuire alla neoangiogenesi<sup>103,104</sup>(Figura 8).

In aggiunta a quelle derivanti dal MO, altre popolazioni cellulari possono dare origine alle EPC. Ad esempio, sembra che il tessuto adiposo ed il cuore possiedano cellule staminali residenti in grado di differenziare in CE, inoltre cellule staminali possono risiedere in altri tessuti adulti, tuttavia le loro specifiche proprietà sono spesso difficili da stabilire a causa della loro eterogeneità e delle difficoltà nella loro identificazione<sup>105</sup><sup>106</sup>(Figura 8).

Una ricca fonte di EPC è il sangue del cordone ombelicale. Queste cellule sono HSC CD34<sup>+</sup> e CD133<sup>+</sup>, sono più numerose di quelle del sangue periferico e, coltivate *in vitro*, sono in grado di differenziare in EC; sono dotate di un'elevata capacità proliferativa ed esprimono l'enzima telomerasi, una caratteristica funzionale che è rara nelle altre popolazioni progenitrici<sup>107</sup>.



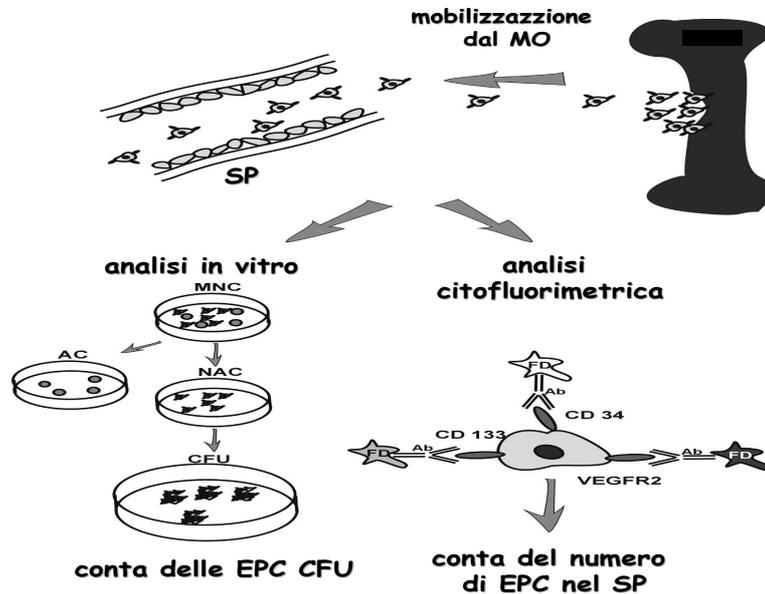
**Figura 8. Origine delle EPC.** Le cellule EPC possono derivare dal MO, oppure da precursori mieloidi, oppure da cellule mesenchimali staminali, oppure da cellule staminali tessuto residenti. Modificata da Urbich, 2004<sup>97</sup>.

### 1.3.4 Isolamento e metodi di valutazione

Sono stati descritti due principali metodi per l'isolamento delle EPC dalle cellule mononucleate<sup>108</sup>. La prima tecnica include l'analisi citofluorimetrica. Le EPC possono essere isolate dal sangue periferico attraverso tecniche immunomagnetiche che prevedono l'utilizzo di biglie magnetiche coniugate ad AcMo specifici per i marcatori di superficie CD34 o CD133 (Figura 9). Il secondo metodo prevede la creazione di colture *ex vivo* di cellule mononucleate o CD34+ isolate da sangue periferico su piastre coperte con fibronectina o gelatina in presenza di medium specifici<sup>109</sup>. Le EPC derivate da queste colture appaiono come unità formanti colonie (CFU) di cellule aderenti disposte a cerchio (*round cell*) con delle cellule filiformi, dotate di fenotipo endoteliale, che si irradiano dal cerchio centrale. Le EPC CFU ottenute da una coltura di 5-7 giorni sono dette EPC precoci e quelle ottenute da una coltura di 1-4 settimane EPC tardive (Figura 9). La valutazione delle caratteristiche angiogeniche delle EPC include un saggio di migrazione basato sulla capacità chemiotattica delle EPC ed un saggio su matrice di gel per valutare la capacità delle EPC di formare tubuli da sole o in co-coltura con cellule endoteliali mature CD34+. Inoltre, le EPC sono in grado di incorporare lipoproteine acetilate a bassa intensità (Ac-LDL) essendo dotate del recettore per LDL, e di legare lectine endoteliali specifiche.

Nonostante l'estesa attività di ricerca attorno a queste cellule, è sorprendente che non ci siano ancora dei criteri *standard* accettati per la loro definizione; ciò deriva dal fatto che non esistono studi sistematici che riguardano le variazioni fisiologiche del numero delle EPC nei soggetti sani. La mancanza di una definizione rende difficile il confronto tra diversi studi. I dati riguardanti il numero dei progenitori endoteliali nel sangue periferico degli individui adulti sani non sono omogenei poiché ci sono forti differenze nelle procedure di isolamento utilizzate. Ad esempio in uno studio, dall'isolamento per mezzo di biglie magnetiche coniugate all'anticorpo anti CD34, sono state ottenute 645 CD34+ per ml di sangue partendo da 50ml di sangue periferico mentre in un altro studio, in base ad un'analisi citofluorimetrica dei PBMC totali, la popolazione di progenitori circolanti endoteliali era di circa 3.000, 5.000 per ml di sangue<sup>110</sup>. In un altro lavoro il gruppo di Peichev, con l'utilizzo di un anticorpo anti-CD34 coniugato a microbiglie, trovava che le cellule CD133+/CD34+/VEGFR2+ erano circa 0.002% dei PBMC totali, che corrisponde a circa 70-210 cellule per ml di sangue<sup>95</sup>. Ragioni possibili per spiegare la scarsa omogeneità dei risultati potrebbero essere le differenze nel volume di sangue di partenza, nella modalità di isolamento e nelle condizioni di coltura. Inoltre, un periodo di coltura di parecchi giorni fino a settimane dei progenitori può cambiare il loro fenotipo, le loro

caratteristiche di progenitori e il loro potenziale proliferativo. Considerando le grosse evidenze a favore delle EPC come marcatore (positivo o negativo) per le malattie cardiovascolari, sarebbe d'aiuto definire un metodo standard per identificare queste cellule.



**Figura 9. Metodi di isolamento delle EPC.**

Le EPC possono essere valutate tramite analisi citofluorimetrica attraverso l'utilizzo di AcMo che marcano gli Ag specifici o con un'analisi in vitro che consiste nel piastrare i PBMC ottenuti dal sangue periferico su piastre coperte con fibronectina. Le EPC che derivano da queste colture appaiono come unità formanti colonie (CFU). Modificata da Miller-Kasprzak, 2007<sup>108</sup>.

### 1.3.5 Fattori che influenzano numero e funzione *in vivo*

Vari fattori possono influenzare il numero e la funzione delle EPC *in vivo*. Tra di essi VEGF e SDF-1 hanno un ruolo cruciale nel loro differenziamento, migrazione e mobilizzazione dal MO. Il legame di VEGF a VEGFR2 media la proliferazione, migrazione e sopravvivenza delle EPC<sup>111</sup>. SDF-1 è una chemioquina espressa in vari tessuti compreso il polmone, i linfonodi, il fegato e il MO. La sua espressione è aumentata in condizioni di stress come l'ipossia e l'aumento della sua espressione nei tessuti ischemici porta ad un reclutamento di cellule ematopoietiche, comprese le EPC, che esprimono il suo recettore specifico CXCR4 sulla superficie<sup>112</sup>.

Altri fattori quali gli estrogeni sono in grado di accelerare il processo di ri-endotelizzazione dei vasi stimolando la mobilizzazione delle EPC dal MO<sup>113</sup>. Alcuni studiosi, ad esempio, hanno dimostrato che il recettore per la leptina, un ormone prodotto dal tessuto adiposo, è espresso nelle colture di EPC tardive e che la leptina, ad alte

concentrazioni, ha effetti sulla migrazione delle EPC<sup>114</sup>. Le statine, gli inibitori della biosintesi del colesterolo, sono in grado di aumentare il numero delle EPC *in vitro* e *in vivo* nei modelli animali e sembra che questo effetto sia mediato dall'attivazione della via PI3K/Akt<sup>115</sup>. Anche l'eritropoietina (EPO), una citochina prodotta dai reni responsabile per il differenziamento in senso eritrocitario, la cui produzione è influenzata dall'ipossia, è un fattore in grado di regolare i livelli delle EPC. Il gruppo di De Groot ha osservato, infatti, che il numero delle EPC nel sangue periferico dei pazienti affetti da insufficienza renale avanzata diminuiva significativamente, ma se ricevevano EPO umana ricombinante (hrEPO) presentavano un significativo rilascio di cellule CD34<sup>+</sup> dal MO al sangue periferico<sup>116</sup>.

Infine, molti studi hanno descritto l'influenza di alcune condizioni patologiche sul numero delle EPC *in vivo*:

- il loro numero e la loro attività migratoria sono ridotte nel sangue dei soggetti con fattori di rischio per le malattie delle arterie coronarie (CAD)<sup>70,117,115</sup>. Invece, l'infarto acuto del miocardio (AMI) è associato con mobilitazione di queste cellule dal MO<sup>118</sup>, mentre traumi vascolari come il trapianto di *bypass* coronarico inducono una rapida, ma transiente mobilitazione dei precursori endoteliali<sup>119</sup>.
- Le EPC provenienti da pazienti con diabete mellito di tipo 2 sono caratterizzate da una ridotta capacità proliferativa, ridotta adesività e capacità di formare tubi capillari *in vitro*<sup>120,121</sup> inoltre, il numero e la funzionalità delle EPC sembrano essere correlate con una complicanza del diabete di tipo 2, ossia la malattia delle arterie periferiche (PAD)<sup>122,123</sup>.
- I dati di questi studi dimostrano una deplezione del numero delle EPC nel sangue periferico dei pazienti affetti da AR, un disordine associato a rischio cardiovascolare, che sembra essere inversamente correlato con lo stato d'attività della malattia<sup>124,125</sup>.

### **1.3.6 EPC nella sclerodermia**

La sclerodermia è una malattia caratterizzata da una grave ischemia tissutale. In genere, l'ipossia tissutale induce la formazione di nuovi vasi del sangue da quelli preesistenti (angiogenesi) o de novo (vasculogenesi), ma in questa patologia entrambi questi processi sono difettosi<sup>46,126,127</sup>. È stato osservato che nei pazienti affetti da SS il numero delle EPC è diminuito e questa diminuzione è stata correlata con le caratteristiche cliniche di coinvolgimento vascolare come le ulcere alle dita<sup>126,128</sup>. Nicoletta del Papa e

collaboratori hanno dimostrato per la prima volta che nella SS c'è un forte squilibrio nel microambiente midollare che coinvolge sia il compartimento endoteliale che quello mesenchimale e ciò può giocare un ruolo importante nella vasculogenesi difettiva della sclerodermia<sup>129</sup>. Essi, infatti, hanno trovato che il numero delle EPC nel sangue periferico era sensibilmente aumentato nei pazienti affetti da SS nelle fasi iniziali della malattia, ma non in quelli in fase avanzata. I midolli di tutti i pazienti analizzati contenevano un ridotto numero di EPC e di cellule stromali entrambe con funzionalità alterata. Sia i progenitori endoteliali che quelli stromali esprimevano il recettore per il VEGF indicando che il MO era fortemente indotto a differenziare in senso endoteliale, ma, *in vitro*, solo le EPC isolate dai pazienti nelle fasi precoci della malattia si differenziavano in EC. Il potenziale angiogenetico delle cellule mesenchimali staminali nei pazienti con SS è stato studiato in un altro lavoro in cui viene formulata l'ipotesi che il fallimento nella riparazione del danno endoteliale in seguito ai danni correlati alla SS potrebbe essere legato ad un'alterazione nel differenziamento endoteliale delle cellule mesenchimali staminali<sup>130</sup>.



## ***2. Scopo della tesi***

Lo scopo primario di questo studio è stato quello di approfondire il ruolo patogenetico del SI nella JLS. A tal fine, sono stati arruolati 42 pazienti affetti da JLS con i seguenti obiettivi:

1. fotografare l'assetto immunologico a livello del sangue periferico e caratterizzare l'infiltrato infiammatorio presente a livello delle biopsie cutanee dei pazienti confrontandolo con quello di un gruppo di soggetti sani al fine di identificare possibili misuratori di attività di malattia (*outcome measure*).
2. Poiché lo studio è inserito all'interno di un *trial* clinico *randomizzato* in doppio cieco per valutare l'efficacia terapeutica del MTX, lo scopo successivo è stato quello di valutare se il trattamento con MTX inducesse un miglioramento della malattia, a tal fine sono stati confrontati i pazienti del gruppo trattato con il MTX con quelli trattati con placebo.
3. Considerato che le anomalie vascolari unite a difetti dell'angiogenesi e della vasculogenesi sono caratteristiche importanti di questa patologia, sono state quantificate le EPC nel sangue periferico dei pazienti affetti da JLS allo scopo di valutare se esistessero delle differenze nel numero di queste cellule rispetto ai controlli sani e se il loro numero variasse nel tempo o in seguito al trattamento con MTX.



## 3. MATERIALI E METODI

### 3.1 Trial clinico

Questo studio sulla JLS è inserito all'interno di un progetto più ampio relativo ad un *trial* multicentrico *randomizzato* in doppio cieco per valutare l'efficacia del farmaco immunosoppressore MTX come possibile terapia per la cura di questa malattia. Tale progetto ha previsto la collaborazione di pediatri, reumatologi, dermatologi ed immunologi e sono stati arruolati pazienti provenienti da diversi Centri di Dermatologia, Reumatologia e Pediatria d'Italia con diagnosi di JLS, definita in base ai criteri di Peterson<sup>3</sup>. I criteri di inclusione sono stati i seguenti:

- diagnosi definita di JLS nelle sue diverse forme (lineare, morfea e morfea generalizzata);
- malattia in fase acuta all'esordio o in fase di ricaduta;
- esordio della malattia avvenuto prima dei 16 anni d'età;
- assenza di terapia immunosoppressiva sistemica nei 6 mesi precedenti l'arruolamento.

I criteri d'esclusione sono stati:

- evidenza clinica di Sclerodermia Sistemica;
- assenza di attività clinica delle lesioni;
- evidenza di anomalie nel sangue periferico come leucopenia (con globuli bianchi (GB)  $<3500/\text{mm}^3$ ), neutropenia (con neutrofili (N)  $<1500/\text{mm}^3$ ), piastrinopenia (con piastrine (PLT)  $<100000/\text{mm}^3$ ), anemia (con emoglobina (Hb)  $<8\text{g/dl}$ );
- trattamento con steroidi (orali o parenterali) o agenti in grado di modificare la malattia inclusi metotrexate, sulfasalazina o penicillamina nei 6 mesi precedenti l'arruolamento;
- presenza di ipercalciuria, ipercalcemia, iperparatiroidismo, insufficienza renale, scompenso cardiaco, alterazioni persistenti della funzionalità epatica, malattie epatiche croniche o diabete.

Tale studio ha previsto la randomizzazione dei pazienti in due gruppi:

1. gruppo MTX: i pazienti sono stati trattati con MTX associato a prednisone (PDN) per 3 mesi seguiti da trattamento con solo MTX per 9 mesi;
2. gruppo placebo: i pazienti sono stati trattati con un farmaco placebo associato a PDN per 3 mesi seguiti dal trattamento con solo il farmaco placebo per 9 mesi.

Il *follow up* totale è stato per tutti di 12 mesi.

Lo studio ha previsto inizialmente una valutazione di base che consisteva in:

- valutazione clinica comprendente un esame clinico generale, l'esame cutaneo, il giudizio medico e il giudizio genitori/paziente;
- esami di natura biomorale comprendenti esami generali, la valutazione degli autoanticorpi ed il dosaggio sierico di citochine e chemiochine;
- esami strumentali che includevano termografia e biopsia cutanea;
- analisi immunologica su sangue venoso periferico al momento dell'arruolamento e dopo 3 e 12 mesi e su biopsie cutanee al tempo 0 e 12 mesi.

L'analisi immunologica è consistita in:

- tipizzazione delle sottopopolazioni cellulari del sangue;
- analisi dell'espressione dei recettori delle cellule NK;
- quantificazione dei progenitori endoteliali;
- saggi di citotossicità per valutare l'attività delle cellule NK;
- analisi immunohistochimica (IC) su biopsie cutanee per caratterizzare l'infiltrato infiammatorio.

### **3.2 Pazienti**

In questo studio sono stati analizzati 42 pazienti con diagnosi di JLS nelle forme di lineare, morfea e morfea generalizzata e con diversa localizzazione anatomica delle lesioni. I pazienti avevano età compresa tra 4 e 30 anni ed erano 28 femmine (67%) e 14 maschi (33%); 26 bambini erano affetti dalla forma lineare (62%), in 8 con localizzazione al volto (19%), 12 dalla forma morfea (31%) e in 2 le lesioni erano localizzate al volto (5%), e 3 dalla forma generalizzata (5%); infine 1 bambina era affetta da una forma mista (2%) (Tabella 2). Subito dopo l'arruolamento 2 pazienti si sono ritirati dallo studio perciò di essi è stato effettuato soltanto il prelievo al tempo 0. Nello studio sono stati arruolati anche 39 bambini sani, di età compresa tra 10 e 18 anni utilizzati come gruppo di controllo per l'analisi citofluorimetrica.

**Tabella 2. Caratteristiche cliniche dei pazienti arruolati nello studio.**

In tabella sono riportati il genere e l'età dei pazienti, la forma di JLS da cui sono affetti e la localizzazione delle lesioni cutanee. ECDS: *en coup de sabre*; JLS forma: classificazione di Peterson<sup>3</sup>.

<b>pazienti</b>	<b>genere</b>	<b>età</b>	<b>JLS forma</b>	<b>localizzazione</b>
1	F	4	lineare	arti e tronco
2	F	11	lineare	arti
3	F	13	lineare	arti e tronco
4	F	8	generalizzata	
5	M	7	lineare	arti e tronco
6	F	12	ECDS	volto
7	F	13	ECDS	volto
8	F	14	placche	-
9	F	10	lineare	arti
10	F	10	lineare	arti
11	M	10	ECDS	volto
12	M	8	ECDS	volto
13	F	10	placche	arti
14	M	6	placche	volto e corpo
15	F	9	generalizzata	
16	F	26	lineare	arti
17	M	12	placche	-
18	F	17	ECDS	volto
19	M	9	placche	arti
20	F	10	generalizzata	addome
21	M	13	placche	corpo
22	M	15	placche	arti e tronco
23	M	13	lineare	arti e tronco
24	M	15	ECDS	volto
25	F	17	placche	arti e tronco
26	F	8	placche	volto
27	F	16	placche	addome
28	F	-	placche	arti
29	F	7	lineare	arti
30	F	8	lineare	arti
31	F	13	lineare	arti
32	F	7	lineare	arti
33	F	14	lineare	arti e tronco
34	F	30	lineare	arti e tronco
35	M	12	lineare	arti e tronco
36	F	10	ECDS	volto
37	M	9	lineare	arti
38	F	8	lineare	arti
39	M	14	lineare	arti
40	F	7	placche	arti
41	F	11	mista	arti e addome
42	M	8	ECDS	volto

Dopo l'arruolamento i pazienti sono stati suddivisi nel gruppo MTX (n=20) e nel gruppo placebo (n=20). A 3 mesi l'analisi citofluorimetrica è stata condotta su 13 pazienti appartenenti al gruppo MTX e su 16 appartenenti al gruppo placebo (Tabella 4), mentre a 12 mesi è stata effettuata su 10 pazienti appartenenti al gruppo MTX e su 7 appartenenti al gruppo placebo (Tabella 5) e questo per i vari motivi di seguito elencati:

- per 4 pazienti le analisi erano ancora in corso durante la stesura di questa tesi e 2 di essi appartenevano al gruppo MTX e 2 al gruppo placebo;
- non tutti i genitori/pazienti hanno dato il consenso informato per l'effettuazione del prelievo di sangue ai tempi previsti dallo studio;
- nel corso del *trial* alcuni pazienti hanno avuto un peggioramento della malattia per cui sono usciti dallo studio e sono stati sottoposti a trattamenti più aggressivi.

Difficoltà maggiori si sono avute per l'ottenimento del consenso informato da parte dei genitori/pazienti ad effettuare la biopsia cutanea. Tuttavia questa è stata eseguita al tempo 0 per la maggior parte dei pazienti mentre pochi l'hanno ripetuta al tempo 12 mesi.

### **3.3 Analisi citofluorimetrica**

L'espressione degli Ag sui linfociti dei pazienti affetti da JLS e sui controlli sani è stata valutata mediante l'analisi citometrica a flusso. La citometria a flusso è una tecnica di analisi di cellule in sospensione e rappresenta uno strumento di indagine con numerosi campi di applicazione. Un citometro a flusso si può considerare alla stregua di un microscopio dotato di un sistema automatico di trasporto delle cellule e di un dispositivo di misura della luce che sostituisce l'occhio dell'osservatore.

Lo strumento impiegato per l'analisi in questione è un analizzatore FACSCalibur (Beckton Dickinson; Sunnyvale, CA) (Figura 10) ed è un citometro automatizzato con cella a flusso dotato di una sorgente laser ad Argon.

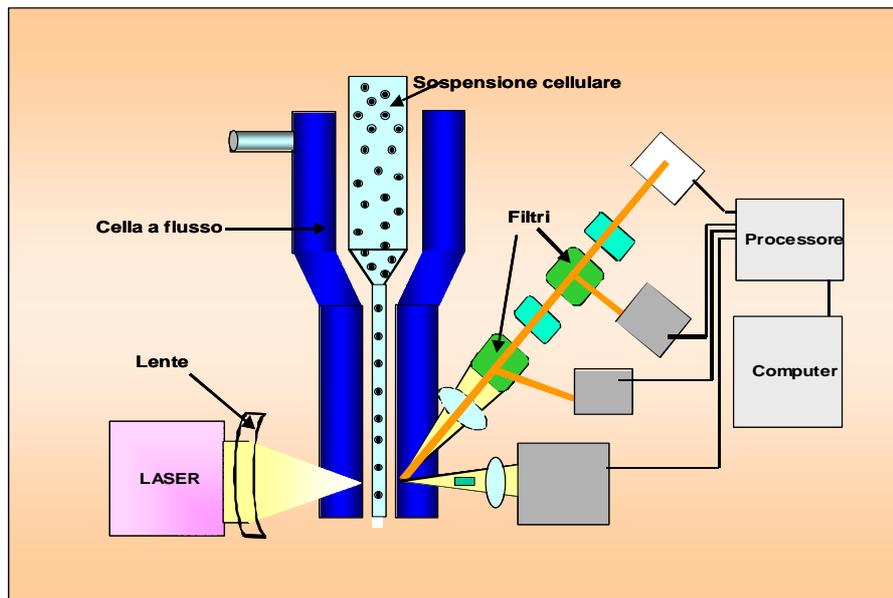
I parametri che possono essere valutati contemporaneamente in un'analisi citofluorimetrica dipendono dal numero di sensori disponibili; in questo caso, un fotodiode per la rilevazione dei segnali di diffusione frontale della luce (*forward scatter*, FSC) e un fotomoltiplicatore per la rilevazione dei segnali di diffusione laterale della luce e per la rilevazione dei segnali di fluorescenza (*side scatter*, SSC). L'analisi citometrica è basata sulla valutazione di questi parametri in quanto il FSC è proporzionale alle dimensioni cellulari, mentre il SSC fornisce informazioni relative alla complessità strutturale della cellula ossia alle caratteristiche di rugosità della superficie e di granulosità.

L'espressione degli Ag di superficie ed intracitoplasmatici può venire evidenziata

con i fluorocromi, molecole che, se eccitate da una specifica lunghezza d'onda ( $\lambda$ ), passano dallo stato fondamentale ad uno stato eccitato provvisorio e poco duraturo, per ritornare allo stato iniziale elettricamente più stabile emettendo una caratteristica fluorescenza monocromatica. I fluorocromi utilizzati in questo studio sono stati la fluoresceina isotiocianato (FITC), la ficoeritrina (PE), la ficoeritrina-cianina 5 (PECy5) e l'allofococianina (APC). Il fluorocromo FITC viene eccitato alla lunghezza d'onda di 488nm dal laser ad Argon e lo spettro d'emissione è nel verde ( $530\pm 30\text{nm}$ ); il fluorocromo PE viene eccitato alla lunghezza d'onda di 488nm dal laser ad Argon e presenta uno spettro d'emissione nel rosso ( $585\pm 42\text{nm}$ ); l'APC è una proteina contenente 6 gruppi prostetici cromofori, viene eccitata alla lunghezza d'onda di 635nm ed emette a 660nm. Questo fluorocromo non può essere eccitato dal laser ad Argon ( $\lambda=488\text{nm}$ ), ma da un secondo laser ad Elio ( $\lambda=635\text{nm}$ ). Infine, la PeCy5 è una molecola *tandem* costituita da due fluorocromi: il fluorocromo PE, che viene eccitato a 488nm, la cui radiazione emessa funge da radiazione eccitante per il secondo fluorocromo, la cianina 5 (Cy5) che emette nel rosso profondo a 670nm.

In breve, la miscela di cellule marcate viene fatta passare attraverso un capillare che crea un flusso continuo di cellule poste l'una in fila all'altra. Le singole cellule passano attraverso il raggio laser incidente a singola frequenza, ciascuna cellula disperde la luce in maniera caratteristica ed il fluoroforo coniugato all'AcMo può essere eccitato, cosicché emette una luce a frequenza inferiore rispetto a quella della sorgente di eccitazione. Il FSC, posto lungo l'asse del laser incidente, misura la luce diffratta mentre il SSC, posto a circa  $90^\circ$  rispetto al raggio incidente, misura la luce riflessa e i due tubi fotomoltiplicatori (verde e rosso) amplificano i segnali derivanti dall'emissione fluorescente, la quale fornisce informazioni sul legame degli AcMo marcati e, quindi, sull'espressione dei marcatori di superficie. Tutte le informazioni vengono successivamente elaborate da un *software* associato ad un computer (Figura 10). Dall'analisi contemporanea del FSC e del SSC, tramite un diagramma a punti (*dot plot*), è possibile discriminare le popolazioni cellulari che compongono il campione in esame in base alle loro caratteristiche morfologiche (dimensione e granulosità). Ciò consente di creare una regione di analisi (*gate*) che comprende la popolazione cellulare contro cui sono diretti gli anticorpi marcati. Quando si utilizza un singolo AcMo marcato con un fluoroforo, i dati ottenuti vengono mostrati con un istogramma che ha in ascissa l'intensità di fluorescenza (in scala logaritmica) ed in ordinata il numero di cellule. Se si utilizzano due o più AcMo, ciascuno dei quali è coniugato con un diverso fluoroforo, i dati vengono rappresentati mediante un diagramma

bidimensionale (citogramma) per un'analisi contestuale dei due marcatori. Esaminando molte cellule, il citofluorimetro può dare informazioni "quantitative" sulla percentuale di cellule che esprimono determinati marcatori e dare informazioni relative all'intensità con cui viene espressa una determinata molecola da parte della cellula. Inoltre, è sempre necessario prevedere un controllo costituito da AcMo diretti contro Ag non rilevanti, ma della stessa sottoclasse (isotipo) e marcati con gli stessi fluorocromi (controllo isotipico) dell'AcMo di interesse, in modo da valutare il livello del legame aspecifico degli anticorpi alle cellule.



**Figura 10. Funzionamento del citometro a flusso.**

La sospensione cellulare passa per una cella a flusso che crea un flusso continuo di cellule poste l'una in fila all'altra. In seguito, le singole cellule attraversano il raggio laser incidente e ciascuna cellula disperde la luce in maniera caratteristica. Il SSC posto a circa 90° rispetto al raggio incidente misura la luce riflessa ed i due tubi fotomoltiplicatori amplificano i segnali derivanti dall'emissione fluorescente. Tutte le informazioni sono elaborate da un *software* associato ad un computer.

### **3.4 Analisi immunofenotipica**

In questa tesi sono state utilizzate tecniche di immunofluorescenza (IF) con marcature di superficie dirette e indirette. L'IF diretta si basa sull'uso di AcMo direttamente coniugati con fluorocromi, mentre l'IF indiretta utilizza AcMo non coniugati seguiti da un trattamento con AcMo secondari coniugati con fluorocromi e specifici per l'AcMo primario non coniugato.

Per la marcatura diretta 50 µl di sangue periferico di ciascun paziente sono stati incubati con 5 µl di AcMo marcato direttamente con il fluorocromo FITC, 5 µl dell' AcMo

marcato con il fluorocromo PE, 5 µl dell'AcMo marcato con il fluorocromo PE-Cy5 e 5 µl dell'AcMo marcato con APC. Dopo 15 minuti di incubazione al buio a temperatura ambiente sono stati aggiunti 3-4 ml di soluzione lisante (cloruro di ammonio, NH<sub>4</sub>Cl) che è stata lasciata agire per 10 minuti a temperatura ambiente allo scopo di eliminare i globuli rossi attraverso lisi osmotica. Quindi, i campioni sono stati centrifugati per 10 minuti a 409g e le cellule sono state analizzate al citometro a flusso dopo averle risospese in 500 µl di PBS 1X.

Per la marcatura indiretta 100 µl di sangue periferico di ciascun paziente sono stati incubati con gli AcMo di interesse (50µl) o con gli AcMo di controllo (5µl) non coniugati per 15 minuti. In seguito i campioni sono stati lavati con PBS 1X, centrifugati ed incubati con l'anticorpo *anti-mouse immunoglobulin* (Caltag, Burlingame, CA) monospecifico coniugato con il fluorocromo FITC per 15 minuti. Successivamente il campione è stato lisato seguendo il procedimento descritto in precedenza. L'analisi è stata fatta utilizzando il programma CellQuest Pro (BD bioscience, San Jose, CA).

### **3.4.1 Tipizzazione delle sottopopolazioni cellulari del sangue**

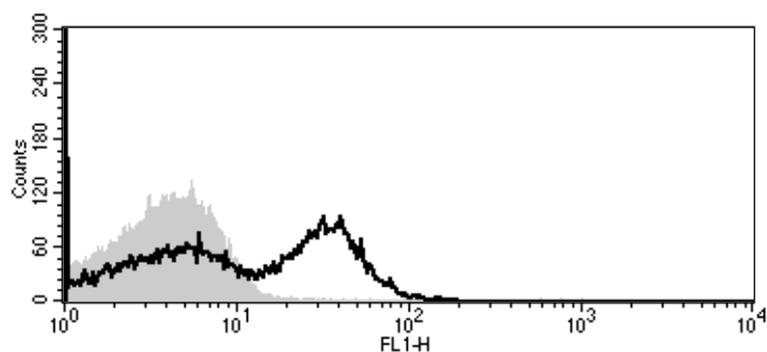
Per la tipizzazione delle sottopopolazioni del sangue periferico è stato utilizzato un pannello di AcMo commercializzati da Becton Dickinson (Sunnyvale, CA, USA), Caltag Laboratories, Immunotech (Marseille, France) e R&D Systems (Toronto, Canada) che includeva: anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD16, anti-CD19, anti-CD56, anti-CD57, anti-human  $\gamma\delta$  TCR, anti-human HLA-DR.

Per la marcatura sono stati utilizzati AcMo specifici per i diversi Ag di interesse direttamente coniugati a 4 fluorocromi diversi e si è proceduto secondo il protocollo descritto nel paragrafo "Analisi immunofenotipica". L'analisi è stata effettuata identificando i linfociti attraverso la valutazione del FSC e del SSC e successivamente, individuando le varie sottopopolazioni cellulari presenti nella nuvola linfocitaria per mezzo degli AcMo specifici per i diversi Ag. Per ogni analisi sono stati acquisiti 15.000 eventi. L'analisi citofluorimetrica ha restituito le percentuali d'espressione dei singoli marcatori che è stato possibile convertire in valori assoluti essendo noto per ciascun paziente il numero assoluto dei linfociti dal numero dei leucociti.

### 3.4.2 Analisi fenotipica delle cellule NK

Per l'analisi dell'espressione dei NKR sono stati usati AcMo non coniugati, gentilmente forniti dai Prof. L. Moretta e A. Moretta (Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università degli Studi di Genova, Italia). Il pannello degli AcMo includeva: EB6 (IgG1), che reagisce con la molecola inibitoria (KIR2DL1) ed una attivatoria (KIR2DS1) appartenenti alla famiglia p58/p50 che riconoscono gli alleli HLA-Cw2, -Cw4, -Cw5, -Cw6; GL183 (IgG1) che reagisce con una molecola inibitoria (KIR2DL2) ed una attivatoria (KIR2DS2) appartenenti alla famiglia p58/p50 che riconoscono gli alleli HLA-Cw1, -Cw3, -Cw7, -Cw8; ZIN (IgG1) che reagisce con una molecola inibitoria (KIR3DL1) ed una attivatoria (KIR3DS1) appartenenti alla famiglia p70 che riconosce l'allele HLA-Bw4; DEC (IgM) che reagisce con la molecola p140 (KIR3DL2) che riconosce gli alleli HLA-A4, -A11; KP43 (IgG1), che reagisce con la molecola CD94 che riconosce gli HLA-E mostrando funzione attivatoria o inibitoria a seconda che sia associata a NKG2C o a NKG2A; Z199 (IgG2b) che riconosce il recettore inibitore NKG2A; BAT221 (IgG2b) che riconosce il recettore attivatorio NKG2D; P25 (IgG2b) che riconosce NKG2C/A. Sono stati utilizzati inoltre gli AcMo AZ20 (IgG1), Z231 (IgG1), BAB281 (IgG1) che riconoscono rispettivamente NKp30, NKp44 e NKp46, recettori appartenenti alla famiglia dei NCR. Infine gli AcMo MA152 (IgG1) che riconosce il co-recettore NKp80; PP35 che riconosce il co-recettore 2B4 e QA79 che riconosce il co-recettore AIRM1.

L'espressione dei NKR è stata valutata con una marcatura indiretta secondo il protocollo descritto nella sezione "Analisi immunofenotipica". Per l'analisi sono stati acquisiti 50.000 eventi ed è stata effettuata sovrapponendo gli istogrammi ottenuti dai campioni marcati con diversi AcMo specifici per gli Ag d'interesse rispetto all'istogramma ottenuto dall'AcMo di controllo, che ha lo stesso isotipo dell'AcMo in esame, ma non è antigenicamente correlato (Figura 11). Per ogni paziente esaminato, dopo lo studio dell'espressione di questi recettori nel *gate* linfocitario, è stato definito un *gate* di acquisizione degli eventi sulle cellule positive per CD16, che rappresenta la popolazione NK nei pazienti.



	Marker	Left, Right	% Gated	Mean
CONTROLLO	All	1, 9910	100.00	4.41
	M1	12, 213	1.20	16.72

	Marker	Left, Right	% Gated	Mean
BAT221	All	1, 9910	100.00	19.04
	M1	12, 213	47.83	34.96

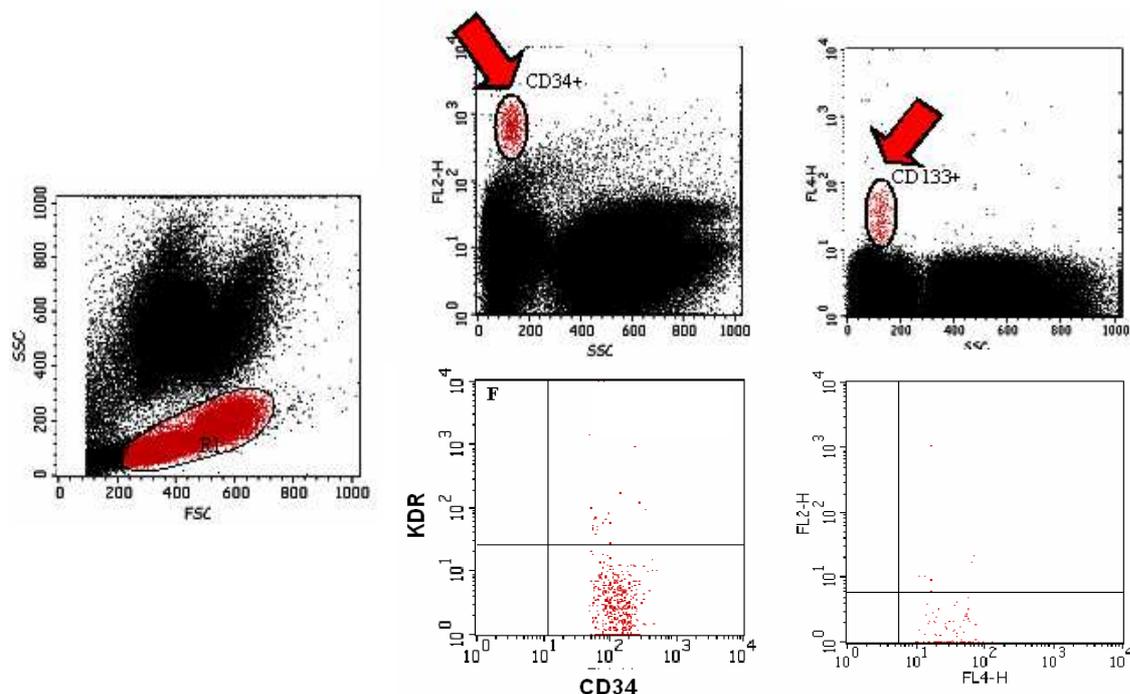
### Figura 11. Analisi dell'espressione dei NKR.

L'analisi dell'espressione dei NKR è stata realizzata sovrapponendo l'istogramma dell'AcMo di interesse (ad es. BAT221) rispetto a quello dell'AcMo di controllo. Alla percentuale d'espressione del NKR specifico si è sottratto il background di fluorescenza dato dall'AcMo di controllo.

### 3.4.3 Analisi fenotipica delle EPC

Per la quantificazione delle EPC è stato utilizzato un pannello di AcMo coniugati che comprendeva CD34-FITC (Becton Dickinson), CD133-APC (Miltenyi Biotechnology; Bergish Gladbach, Germany), KDR-PE (R e D System Inc; Minneapolis, MN) utilizzando una marcatura diretta di superficie.

Attraverso la valutazione dei parametri di FSC e SSC è stata individuata la popolazione delle cellule mononucleate e sono stati esclusi i granulociti ed i detriti cellulari. All'interno della popolazione selezionata, sono state individuate le cellule CD34<sup>+</sup> ed analizzate per la duplice e triplice espressione di CD133<sup>+</sup> e KDR<sup>+</sup> (Figura 12). Come controllo sono state usate cellule non marcate o AcMo anti-isotipo. I precursori circolanti sono stati definiti come CD34<sup>+</sup> o CD133<sup>+</sup> o CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> e i precursori endoteliali come CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> o CD133<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> e CD133<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup>. Per l'analisi sono stati acquisiti 500.000 eventi.



**Figura 12. Analisi immunofenotipica delle EPC.**

R1: cellule mononucleate. L'analisi è stata effettuata su R1 individuando le cellule CD34<sup>+</sup> e CD133<sup>+</sup> che sono state caratterizzate per la doppia marcatura con KDR.

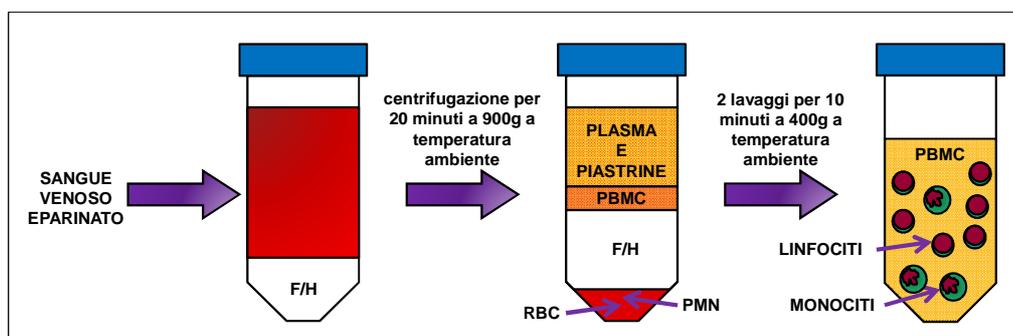
### 3.4 Test di citotossicità delle cellule NK

Il test funzionale di citotossicità delle cellule NK è stato realizzato utilizzando PBMC isolati dal sangue periferico prelevato dai pazienti mediante stratificazione su Ficoll/Hypaque (F/H). Lo scopo del test è quello di misurare l'attività citotossica di tali cellule (effettrici) nei confronti di due linee cellulari K562 e Raji (*target*). L'attività citotossica delle cellule NK è direttamente proporzionale al rilascio di <sup>51</sup>Cr da parte di queste cellule.

#### 3.4.1 Separazione Ficoll/Hypaque

Il sangue periferico, ottenuto da prelievo venoso eparinato, è stato separato al fine di ottenere le cellule mononucleate (PBMC) tramite stratificazione su Ficoll/Hypaque (F/H) (Amersham Biosciences; San Francisco, CA). Tale metodo sfrutta la diversa densità dei PBMC (linfociti e monociti) rispetto agli altri elementi corpuscolati del sangue: i PBMC e le piastrine, a minore densità, si concentrano sopra lo strato di F/H; viceversa, i globuli rossi ed i granulociti si raccolgono sul fondo della provetta. Le piastrine sono state separate dalle cellule mononucleate mediante lavaggi successivi. Il sangue periferico è stato diluito in rapporto 1:3 con sodio cloruro 0,9% (soluzione fisiologica) a temperatura

ambiente e, in seguito, è stato stratificato lentamente sopra la soluzione di F/H. Si è proceduto con una centrifugazione a 900g per 20 minuti e l'anello di PBMC formatosi all'interfaccia F/H è stato aspirato e sottoposto a due lavaggi successivi con soluzione fisiologica mediante centrifugazione a 400g (Figura 13); le cellule ottenute sono state contate utilizzando la camera di Burker.



**Figura 13. Separazione del sangue periferico mediante Ficoll/Hypaque**

Tramite centrifugazione su F/H sono state isolate le cellule mononucleate dal sangue periferico. Le cellule mononucleate e le piastrine si concentrano sopra lo strato di F/H perché hanno densità minore; al contrario, i globuli rossi (RBC) e i granulociti hanno una maggiore densità rispetto al F/H e si raccolgono sul fondo della provetta.

### 3.4.2 Cellule *target*

Le linee cellulari usate per il test NK sono linee stabilizzate ottenute dalla *American Type Culture Collection* (Rockville, USA).

K562: derivate da effusione pleurica di una donna di 53 anni affetta da leucemia mieloide in crisi blastica terminale; sono cellule altamente indifferenziate ed appartenenti alla serie granulocitica;

RAJI: linea di cellule B linfoidi umane ottenute nel 1963 dalla mascella sinistra di un ragazzo nero di 11 anni affetto da linfoma di Burkitt; sono cellule rotondeggianti che crescono in sospensione singolarmente o formando aggregati.

Le cellule sono state coltivate in terreno RPMI1640 (Invitrogen; Paisley, UK) addizionato con antibiotici e con 10% di FCS e tenute in termostato a 37°C al 5% di CO<sub>2</sub>.

### 3.4.3 Test di rilascio del <sup>51</sup>Cr

Le cellule *target* K562 e Raji ( $5 \times 10^6$ ) sono state marcate con 150μCi di <sup>51</sup>Cr (PerkinElmer; Boston, MA) ed incubate per almeno 4 ore a 37°C e al 5% di CO<sub>2</sub>. Nel frattempo i PBMC di paziente (cellule effettrici) sono stati contati e risospesi ad una concentrazione tale da piastrarne 400.000 nei primi 3 pozzetti di una piastra da 96, 200.000

nei successivi 3 pozzetti, 100.000 in altri 3 pozzetti e 50.000 negli ultimi 3 pozzetti. Scaduto il periodo di incubazione, le cellule *target* sono state lavate con RPMI 1640, contate in camera di Burker e risospese alla concentrazione di  $1 \times 10^5$  cell/mL. 100 $\mu$ L di questa sospensione ( $1 \times 10^4$  cellule) sono stati aggiunti ad ogni pozzetto della piastra da 96 dove erano stati precedentemente piastrati i PBMC a diverse concentrazioni tali che cellule effettrici e bersaglio si trovassero a diversi rapporti tra loro (40:1, 20:1, 10:1, e 5:1). Dopo una centrifugata su centrifuga per piastre affinché cellule *target* ed effettrici venissero in stretto contatto tra loro, è stata eseguita un'incubazione di almeno 4 ore dopo la quale 100 $\mu$ L del sovrinatante di ogni pozzetto sono stati raccolti in tubini da conta e contati da un  $\gamma$ counter il quale ha misurato direttamente i cpm presenti in  $1 \times 10^4$  cellule *target* di ogni campione marcate con  $^{51}\text{Cr}$  (cpm exp). In tutti gli esperimenti sono stati previsti controlli autologhi per determinare il rilascio spontaneo (SR) e il rilascio massimo (MR) di  $^{51}\text{Cr}$ . Il rilascio spontaneo è la quantità di  $^{51}\text{Cr}$  rilasciata dalle cellule *target* piastrate con solo il terreno RPMI 1640; il rilascio massimo è la quantità di  $^{51}\text{Cr}$  rilasciata dalle cellule *target* piastrate con il sapone MAP40 che le lisa per lisi osmotica.

Il rilascio specifico (RS) è stato valutato secondo la formula:

$$\text{RS (\%)} = (\text{cpm exp} - \text{cpm SR} / \text{cpm MR} - \text{cpm SR}) \times 100$$

#### **3.4.4 Analisi immunoistochimica (IC)**

L'analisi immunoistochimica sulle biopsie cutanee è stata effettuata dal laboratorio della Prof.ssa Fiorella Calabrese (Laboratorio di Patologia Molecolare, Sez. Anatomia Patologica Speciale, Università degli Studi di Padova).

Il pannello di AcMo primari utilizzati per quest'analisi comprendeva: CD45 (Novocastra; Newcastle, UK), CD3 (Novocastra) e CD20 (Novocastra).

Un frammento di pelle della lesione è stato ottenuto da ogni paziente mediante biopsia. Ogni campione è stato fissato in formalina al 10% per 24 ore e sottoposto alle procedure di *routine* per l'inclusione in paraffina. Le sezioni istologiche (4 $\mu$ m) sono state tagliate e montate su vetrini ricoperti con silano (Dako; Tokyo, Japan). Successivamente, sono state deparaffinate in xilene e reidratate mediante passaggi in alcool a diverse gradazioni. Si è proceduto alla neutralizzazione della perossidasi endogena usando perossido di idrogeno/metanolo 0.5% v/v per 10 minuti. Dopo essere state lavate in TBS 1X, sono state saturate con siero normale di cavallo per 10 minuti. A questo punto, i vetrini

sono stati incubati con l'AcMo primario diluito in siero di cavallo con albumina e tenuti per tutta la notte a 4°C in un ambiente umido. Il giorno dopo, sono stati incubati per 30 minuti con l'anticorpo secondario coniugato a biotina (*anti-mouse* ottenuto in cavallo) e dopo lavaggio in PBS 1X sono stati incubati con il complesso biotina-avidina (ABC) per 6 minuti a temperatura ambiente e infine visualizzati per mezzo della 3,3,2-diaminobenzidina per 2-4 minuti la cui reazione è stata bloccata lavandoli in acqua distillata. Infine, i vetrini sono stati lavati in PBS 1X. Come controlli sono stati usati vetrini marcati con i soli AcMo secondari. Le valutazioni immunoistochimiche sono state effettuate su almeno 3 campi scelti a caso della misura di 1mm<sup>2</sup> mediante l'utilizzo di un programma di analisi morfometrica computerizzata (Image Pro-Plus versione 5, Media Cybernetics, Inc., Silver Spring, MD).

### **3.5 Analisi statistica**

In questo lavoro tutti i dati ottenuti sono stati espressi come media  $\pm$  errore standard (ES) della media; l'analisi statistica si è basata sul test *t* di Student e sono stati considerati statisticamente significativi valori con  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ .



## 4. RISULTATI:

### 4.1 Tipizzazione delle sottopopolazioni cellulari del sangue

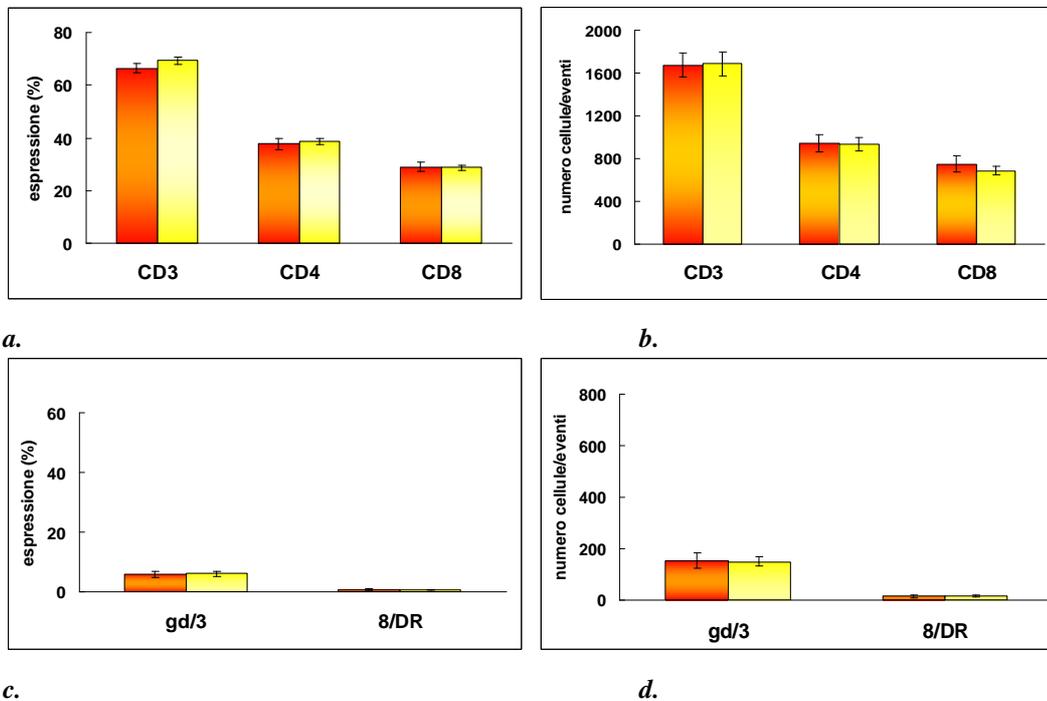
#### 4.1.1 Analisi dei pazienti al tempo 0 mesi.

**Tabella 3. Pazienti e controlli al tempo 0 mesi.**

I valori di leucociti e linfociti sono espressi come media±ES. Noto il valore dei linfociti rispetto ai leucociti è possibile convertire le percentuali fornite dall'analisi citofluorimetrica in valori assoluti.

	PAZIENTI	CONTROLLI
<b>Numerosità</b>	42	39
<b>Leucociti (cell/mm<sup>3</sup>)</b>	6921±380	7347±360
<b>Linfociti (cell/mm<sup>3</sup>)</b>	2454±163	2356±157

#### Analisi delle sottopopolazioni T:

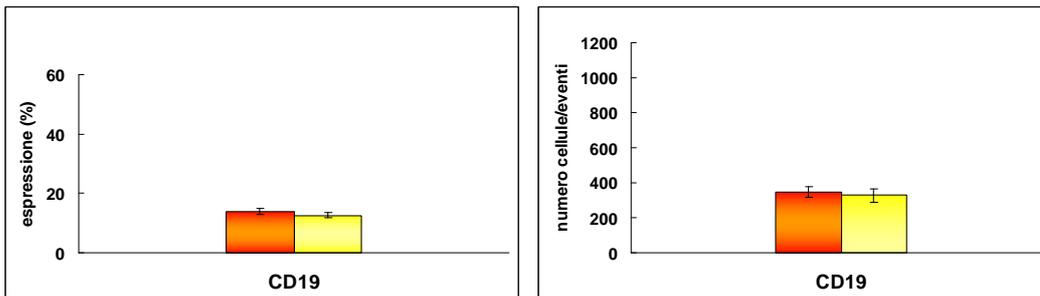


**Figura 14.** In questa figura e in tutte quelle che seguiranno in questa sezione gli istogrammi riportano i valori di media±ES. Le barre arancioni rappresentano le medie calcolate nel gruppo

controllo, le barre gialle quelle calcolate nei pazienti a tempo 0. In a. e c. i valori sono espressi in percentuale in b. e d. i valori sono espressi in numero assoluto.

**Legenda:** **CD3:** marcatore dei linfociti T; **CD4:** marcatore dei linfociti T<sub>H</sub>; **CD8:** marcatore dei linfociti T<sub>C</sub>;  **$\gamma\delta/3$ :** marcatore per la forma del recettore  $\gamma\delta$  dei linfociti T; **DR:** marcatore per HLA-DR dei linfociti T attivati.

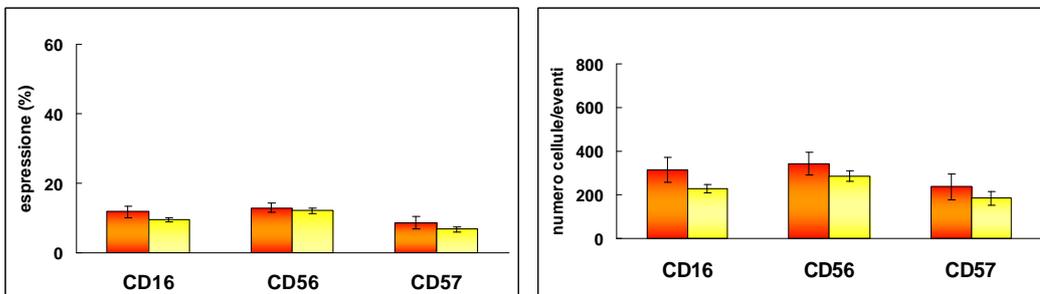
### Analisi dei linfociti B



*a.*  
**Figura 15.**

**Legenda:** **CD19:** marcatore dei linfociti B

### Analisi dei linfociti NK



*a.*  
**Figura 16**

**Legenda:** **CD16:** marcatore delle cellule NK; **CD56:** marcatore delle cellule NK; **CD57:** marcatore dei linfociti granulati.

I pazienti arruolati nello studio (n=42) avevano un numero medio di leucociti e linfociti su mm<sup>3</sup> di sangue paragonabile al numero riscontrato nel gruppo di bambini sani (n=39) (Tabella 3). L'analisi citofluorimetrica delle sottopopolazioni cellulari del sangue è stata effettuata selezionando i linfociti attraverso la valutazione dei parametri fisici di FSC e di SSC e individuando all'interno della popolazione linfocitaria le varie sottopopolazioni cellulari per

mezzo della marcatura con AcMo specifici per i diversi Ag. Sono stati caratterizzati i linfociti T (CD3<sup>+</sup>), i linfociti Th (CD4<sup>+</sup>) e i linfociti Tc (CD8<sup>+</sup>), dove la somma delle percentuali delle due popolazioni, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, restituisce la percentuale dei linfociti CD3<sup>+</sup>. Inoltre sono state identificate la sottopopolazione dei linfociti T che esprime TCR $\gamma\delta$  ed è stata valutata la co-marcatura dei CD8<sup>+</sup> con il marcatore d'attivazione HLA-DR.

Dall'analisi dei dati relativi alle sottopopolazioni T non emergono differenze riguardo alla loro distribuzione nei pazienti affetti da JLS rispetto ai controlli sani (Figura 14a e b). La popolazione T esprime il recettore TCR $\gamma\delta$  è comparabile tra i due gruppi, e i linfociti CD8 non esprimono il marcatore d'attivazione HLA-DR (Figura 14c e d).

L'analisi dei linfociti B è stata eseguita utilizzando l'AcMo CD19 e non sono state riscontrate differenze di frequenza e di numero assoluto nel sangue periferico dei pazienti rispetto ai controlli sani (Figura 16a e b).

I linfociti NK sono stati individuati attraverso i marcatori specifici CD16, CD56 e CD57 e si è trovato che la frequenza e il numero assoluto di questi tipi cellulari sono mediamente ridotti nei pazienti rispetto ai controlli essendo rispettivamente (10 $\pm$ 0.7 % vs 12 $\pm$ 1.7% e 228 $\pm$ 20 vs 316 $\pm$ 57 cellule), (12 $\pm$ 0.8% vs 13 $\pm$ 1.4% e 286 $\pm$ 23 vs 343 $\pm$ 51 cellule) e (7 $\pm$ 0.8% vs 9 $\pm$ 1.8% e 184 $\pm$ 29 vs 236 $\pm$ 59 cellule), ma tali differenze sottoposte al test statistico *t* di Student non sono risultate significative.

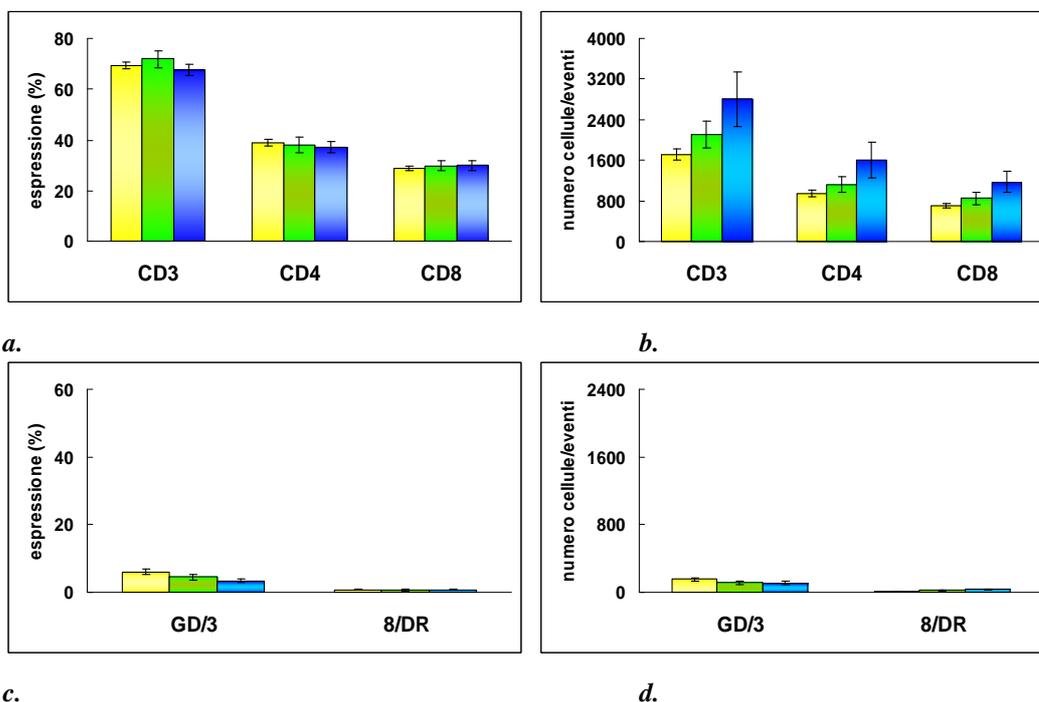
## 4.1.2 Analisi dei pazienti al tempo 3 mesi

**Tabella 4. Gruppo MTX e gruppo placebo a 3 mesi.**

I pazienti arruolati nello studio sono randomizzati in un gruppo trattato con MTX ed un gruppo trattato con placebo. L'analisi citofluorimetrica a 3 mesi è stata condotta su 13 pazienti appartenenti al gruppo MTX/PDN e su 16 appartenenti al gruppo placebo/PDN.

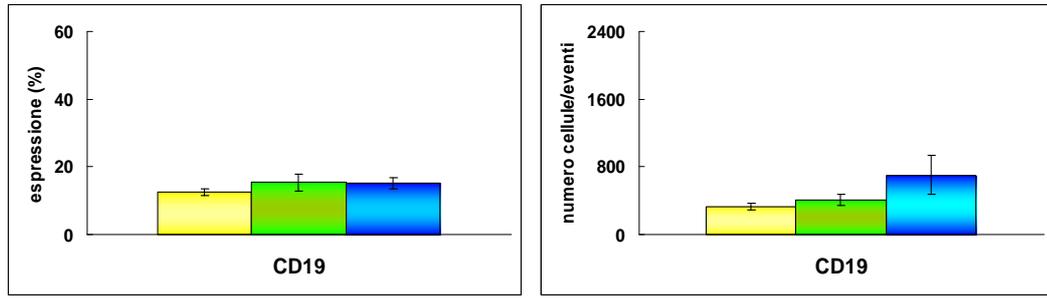
	PAZIENTI T-0m	MTX/PDN T-3m	PLAC/PDN T-3m
<b>Numerosità</b>	42	20 (13)	20 (16)
<b>Leucociti (cell/mm<sup>3</sup>)</b>	6921±380	9410±958	11148±1158
<b>Linfociti (cell/mm<sup>3</sup>)</b>	2454±163	2869±359	4088±803

### Analisi delle popolazioni T



**Figura 17.** Le barre gialle rappresentano le medie calcolate nel gruppo dei pazienti al tempo 0 mesi, quelle verdi rappresentano le medie calcolate nel gruppo MTX, quelle blu rappresentano le medie calcolate nel gruppo placebo. In a. e c. i valori sono espressi in percentuale in b. e d. i valori sono espressi in numero assoluto.

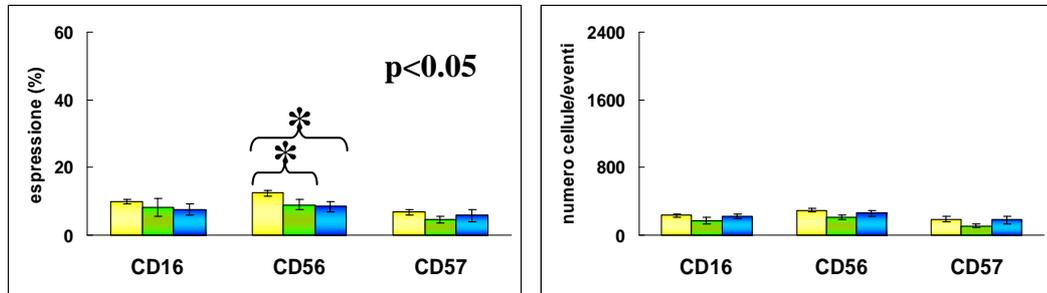
## Analisi dei linfociti B



a.  
Figura 18

b.

## Analisi delle cellule NK



a.  
Figura 19

b.

Dopo l'arruolamento i pazienti sono stati suddivisi in maniera casuale tra quelli che sono stati trattati con il farmaco MTX associato al PDN per 3 mesi, seguiti dal trattamento con solo MTX per 9 mesi ( $n=20$ ) e quelli che sono stati trattati con il farmaco placebo associato al PDN per 3 mesi, seguiti dal trattamento con il farmaco placebo per 9 mesi ( $n=20$ ). Del gruppo MTX, 4 pazienti non hanno dato il consenso informato per il prelievo del terzo mese e per 2 il *trial* clinico era ancora in corso perciò agli effetti l'analisi è stata eseguita su 13 individui. Per quanto riguarda il gruppo placebo, 1 paziente è uscito dal *trial* prima dello scadere dei 3 mesi a causa di un peggioramento della malattia, 2 pazienti non hanno potuto effettuare il prelievo a 3 mesi per motivi di distanza geografica e per 2 pazienti il *trial* era ancora in corso perciò l'analisi è stata condotta su 16 pazienti. Inoltre, 2 pazienti si sono ritirati dallo studio subito dopo la diagnosi della malattia. Dopo 3 mesi i pazienti appartenenti al gruppo MTX e al gruppo placebo mostravano un numero di leucociti e di linfociti su  $\text{mm}^3$  di sangue mediamente

più alto rispetto a quello riscontrato al tempo 0; ciò potrebbe essere dovuto all'effetto del trattamento con il farmaco anti-infiammatorio PDN che viene somministrato ad entrambi i gruppi per i primi 3 mesi (Tabella 4).

Dall'analisi delle sottopopolazioni T è risultato che i pazienti trattati con il placebo hanno valori assoluti medi di cellule CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> più elevati rispetto al tempo 0 rispettivamente (2805±544 vs 1713±115cellule), (1600±352 vs 951±67cellule) e (1170±205 vs 696±45cellule) e rispetto al gruppo MTX rispettivamente (2805±544 vs 2106±268cellule), (1600±352 vs 1118±153cellule) e (1170±205 vs 847±122cellule), ma tali differenze non sono risultate significative (Figura 17b). La popolazione T esprime il recettore TCRγδ era diminuita nel gruppo placebo rispetto al tempo 0 (3±0.5% vs 6±0.8%) e anche nel gruppo MTX (4±0.9% vs 6±0.8%), ma entrambe queste differenze non sono risultate significative (Figura 17c). I linfociti T CD8<sup>+</sup> non esprimevano il marcatore d'attivazione HLA-DR (Figura 17c e d).

Anche il numero assoluto dei linfociti B è risultato mediamente aumentato nel gruppo placebo rispetto al tempo 0 (702±232 vs 332±37cellule) e rispetto al gruppo MTX (702±232 vs 410±71cellule), tuttavia queste differenze non erano significative. (Figura 18b).

Si è osservato che il trattamento con MTX per 3 mesi ha indotto una diminuzione della frequenza e in alcuni casi del numero assoluto delle cellule NK CD16<sup>+</sup> (8±2.8% vs 10±0.7% e 172±36 vs 233±21cellule), CD56<sup>+</sup> (9±1.5% vs 12±0.7%, p<0.05) e CD57<sup>+</sup> (5±0.9% vs 7±0.8% e 109±23 vs 188±31cellule) rispetto al tempo 0. Anche nei pazienti del gruppo placebo è stata osservata la diminuzione del numero delle cellule CD16<sup>+</sup> (8±1.75% vs 10±0.66%) e CD56<sup>+</sup> (8±1.5% vs 12±0.7%, p<0.05) rispetto al tempo 0 (Figura 19a e b). Poiché tale riduzione si è verificata in entrambi i gruppi è probabile che essa sia dovuta all'effetto del trattamento con PDN somministrato ai pazienti di entrambi i gruppi per i primi 3 mesi.

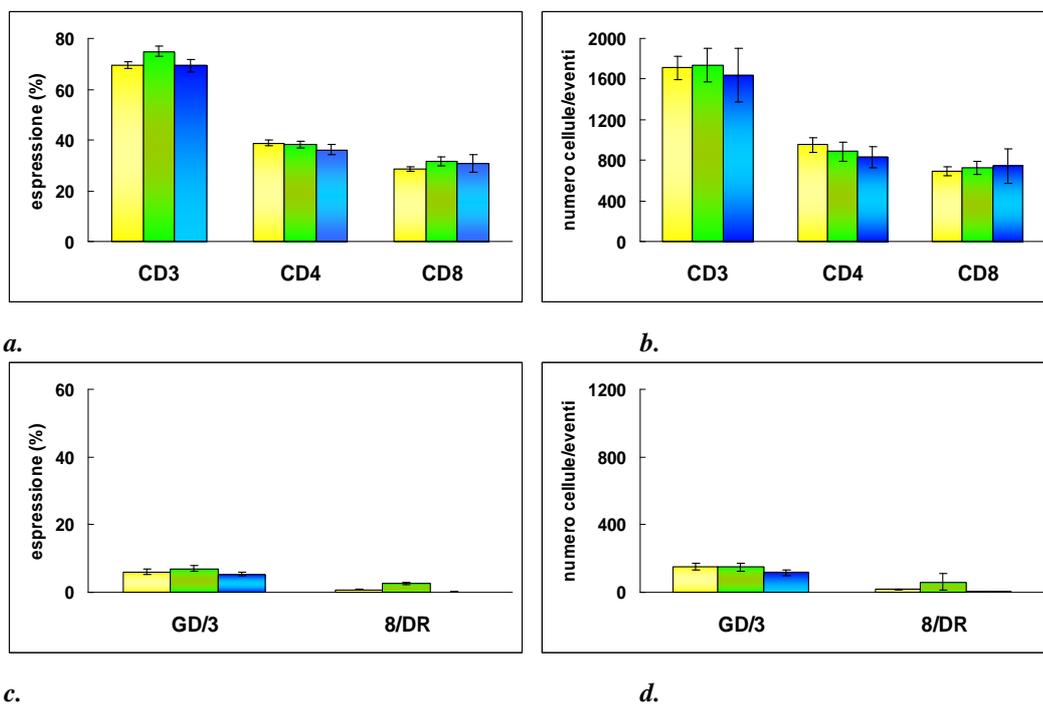
### 4.1.3 Analisi dei pazienti al tempo 12 mesi

**Tabella 5. Gruppo MTX e gruppo placebo a 12 mesi.**

L'analisi citofluorimetrica a 12 mesi è stata condotta su 10 pazienti appartenenti al gruppo MTX e 7 appartenenti al gruppo placebo.

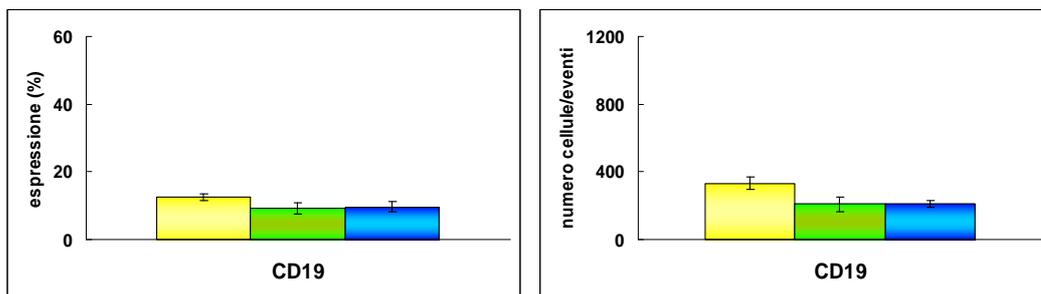
	PAZIENTI T-0m	MTX T-12m	PLAC T-12m
<b>Numerosità</b>	42	10	7
<b>Leucociti (cell/mm<sup>3</sup>)</b>	6921±380	5918±331	7890±967
<b>Linfociti (cell/mm<sup>3</sup>)</b>	2454±163	2303±194	2343±356

#### Analisi delle sottopopolazioni T



**Figura 20**

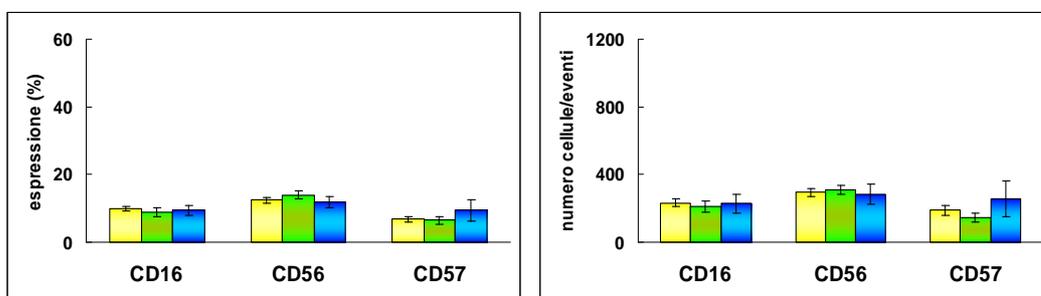
## Analisi dei linfociti B



a.  
Figura 21

b.

## Analisi delle cellule NK



a.  
Figura 22

b.

L'analisi delle sottopopolazioni cellulari del sangue a 12 mesi è stata resa complicata dal fatto che non tutti i pazienti sono arrivati a concludere il *trial* clinico: del gruppo MTX (n=20) 3 pazienti sono usciti dallo studio prima del tempo di *follow up* previsto per ricaduta di malattia, 2 non hanno dato il consenso informato per effettuare il prelievo del dodicesimo mese, e per 2 pazienti l'elaborazione dei dati era ancora in corso perciò l'analisi effettiva è stata condotta su 10 pazienti. Del gruppo placebo (n=20) 10 pazienti sono usciti dallo studio prima della conclusione per ricaduta di malattia e per 2 di essi il *trial* era ancora in corso perciò l'analisi è stata condotta su 7 pazienti. Dopo 12 mesi di trattamento con MTX o con il farmaco placebo i pazienti presentavano un numero medio di leucociti e di linfociti su  $\text{mm}^3$  di sangue comparabili tra loro e ai valori riscontrati al tempo 0. (Tabella 5).

Dall'analisi della distribuzione delle sottopopolazioni dei linfociti T non sono emerse differenze nelle percentuali e nei numeri assoluti tra il gruppo MTX

e il gruppo placebo rispetto al tempo 0 (Figura 20a e b). La popolazione T $\gamma$  $\delta$  continuava a mantenere valori mediamente inferiori nel gruppo placebo rispetto al tempo 0 (118 $\pm$ 17 vs 153 $\pm$ 49cellule) e rispetto al gruppo MTX (118 $\pm$ 17 vs 149 $\pm$ 25cellule), anche se le differenze non sono risultate significative. (Figura 20c e d).

Dall'analisi dell'espressione del marcatore CD19 si è osservata una diminuzione nei pazienti trattati con MTX rispetto al tempo 0 (9 $\pm$ 1.7% vs 13 $\pm$ 0.9% e 209 $\pm$ 41 vs 332 $\pm$ 47cellule) e nei pazienti trattati con il farmaco placebo rispetto al tempo 0 (10 $\pm$ 1.6% vs 13 $\pm$ 0.9% e 210 $\pm$ 21 vs 332 $\pm$ 47cellule ) anche se tali differenze, valutate con il test statistico *t* di Student, non sono risultate significative (Figura 21).

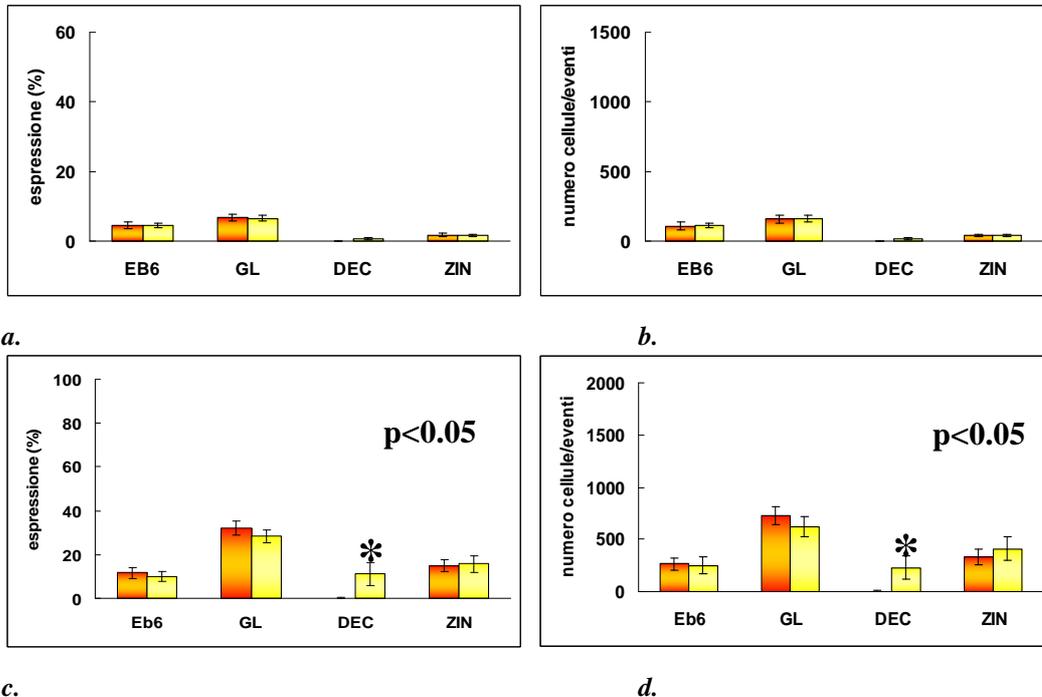
Infine, il numero di cellule CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup> e CD57<sup>+</sup>, che era ridotto a 3 mesi in entrambi i gruppi, a 12 mesi ha riacquisito valori comparabili al tempo 0 e ciò ci fa supporre che la riduzione osservata a 3 mesi potesse essere stata dovuta al trattamento con PDN. (Figura 22)

In conclusione, dall'analisi delle sottopopolazioni cellulari del sangue è stato evidenziato che l'assetto immunologico, a livello del sangue periferico, dei pazienti affetti da JLS è pressoché normale e le differenze osservate a tempo 3 mesi sono probabilmente dovute al trattamento con il PDN che è stato utilizzato in associazione alla terapia.

## 4.2 Analisi dell'espressione dei NKR

### 4.2.1 Analisi dei pazienti al tempo 0 mesi

#### Analisi dell'espressione dei KIR

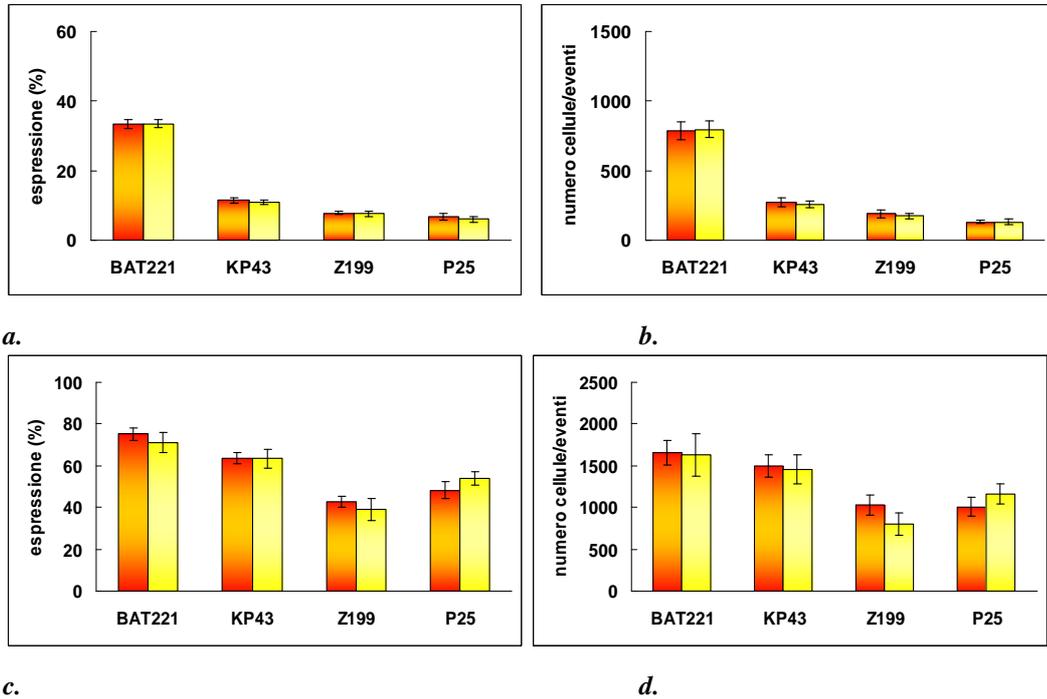


**Figura 23.** In questa figura e in tutte quelle che seguiranno nella sezione “Analisi dell’espressione dei NKR”, gli istogrammi riportano i valori di media±ES. Le barre arancioni rappresentano le medie calcolate nel gruppo controllo, le barre gialle quelle calcolate a tempo 0.

Inoltre, in **a** e **b** sono stati riportati i risultati dell’analisi condotta sul *gate* dei linfociti, in **a** come frequenze in **b** come valori assoluti; mentre in **c** e **d** sono stati riportati i valori dell’analisi condotta sul *gate* delle cellule CD16<sup>+</sup>, in **c** come frequenze e in **d** come valori assoluti.

**Legenda:** **EB6:** marcatore per il recettore inibitorio KIR2DL (p58.1) e per il recettore attivatorio KIR2DS (p50.1) entrambi specifici per l’HLA-C; **GL183:** marcatore per il recettore inibitorio KIR2DL (p58.2) e per quello attivatorio KIR2DS (p58.2) entrambi specifici per l’HLA-C; **DEC:** marcatore per il recettore KIR3DL2 (p140) specifico per l’HLA-A; **ZIN:** marcatore per il recettore KIR3DL1 (p70) specifico per l’HLA-B.

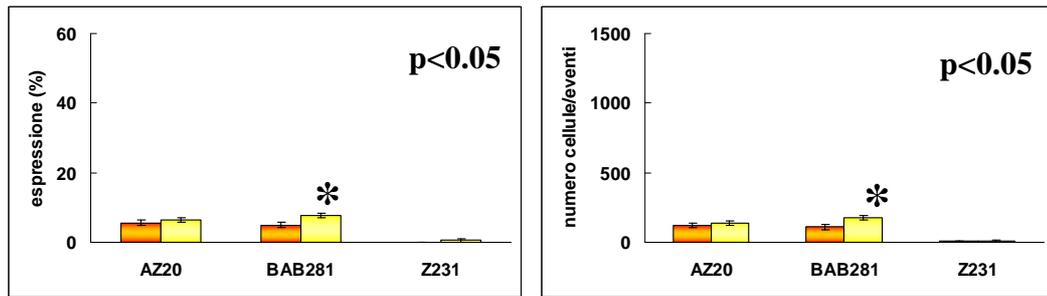
## Analisi dei KLR



**Figura 24.**

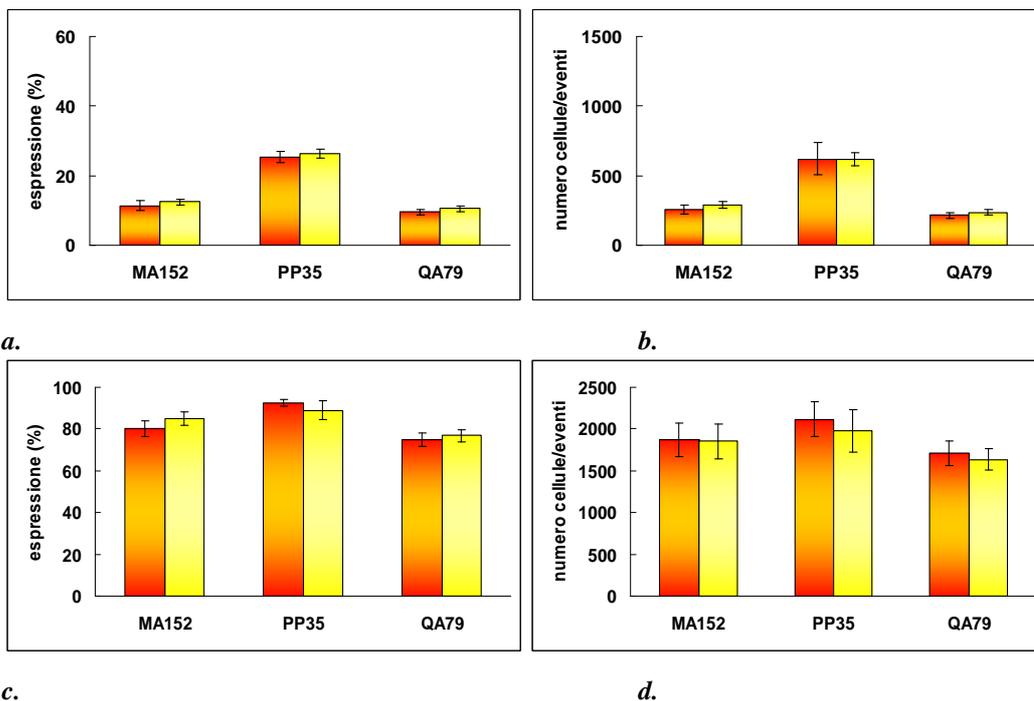
**Legenda:** **BAT221:** marcatore del recettore NKG2D che forma omodimeri attivatori; **KP43:** marcatore del recettore CD94; **Z199:** marcatore del recettore NKG2A che forma eterodimeri inibitori con CD94; **P25:** marcatore per il recettore NKG2A e C che forma eterodimeri attivatori con CD94. L'espressione di NKG2C si ricava dalla differenza d'espressione tra i due marcatori.

## Analisi dei NCR



**Figura 25.** I NCR sono espressi esclusivamente sulle cellule NK perciò la loro analisi è stata fatta solo nel gate dei linfociti. **Legenda:** **AZ20:** marcatore del recettore attivatorio NKp30; **BAB281:** marcatore del recettore attivatorio NKp46; **Z231:** marcatore del recettore attivatorio NKp44.

## Analisi dei co-recettori



**Figura 26.**

**Legenda:** MA152: marcatore del recettore NKP80; PP35: marcatore del recettore 2B4; QA79: marcatore del recettore AIRM1/P75.

L'analisi dell'espressione dei NKR è stata realizzata sovrapponendo gli istogrammi ottenuti dai campioni marcati con diversi AcMo specifici per gli Ag d'interesse rispetto all'istogramma ottenuto con l'AcMo di controllo, che ha lo stesso isotipo degli AcMo in esame, ma non è antigenicamente correlato ad essi (Figura 11). Per ogni paziente lo studio dell'espressione di questi recettori è stato eseguito nel *gate* linfocitario ed inoltre, è stato definito un *gate* di acquisizione degli eventi sulle cellule CD16<sup>+</sup>, che rappresentano la popolazione NK nei pazienti. In questo studio, è stata caratterizzata l'espressione di recettori appartenenti alle famiglie KIR, KLR, NCR e i co-recettori. Poiché i NCR sono esclusivamente espressi sulle cellule NK l'analisi per essi è stata eseguita solo nel *gate* linfocitario.

Dall'analisi dell'espressione dei KIR a tempo 0 è emerso un aumento dell'espressione di DEC/KIR3DL2 sulle cellule NK dei pazienti rispetto ai controlli ( $11 \pm 5.2\%$  vs  $0 \pm 0.2\%$ ,  $p < 0.05$  e  $213 \pm 107$  vs  $5 \pm 4$  cellule,  $p < 0.05$ ), tuttavia essa è risultata essere molto variabile all'interno del gruppo di pazienti affetti da

JLS assumendo valori compresi in un range variabile tra 0% e 73%). Tuttavia, la maggior parte dei pazienti non esprimeva questo marcatore, così come osservato nei controlli sani. Nonostante ciò, la differenza osservata tra le medie calcolate per ciascun gruppo è risultata significativa ( $p < 0.05$ ). Tra i KIR, è stata osservata la diminuzione dell'espressione di GL183/KIR2DL o KIR2DS sulle cellule NK dei pazienti rispetto ai controlli ( $28 \pm 3.1\%$  vs  $32 \pm 3.2\%$  e  $619 \pm 95$  vs  $725 \pm 86$  cellule), anche se questa differenza non è risultata significativa. (Figura 23c e d).

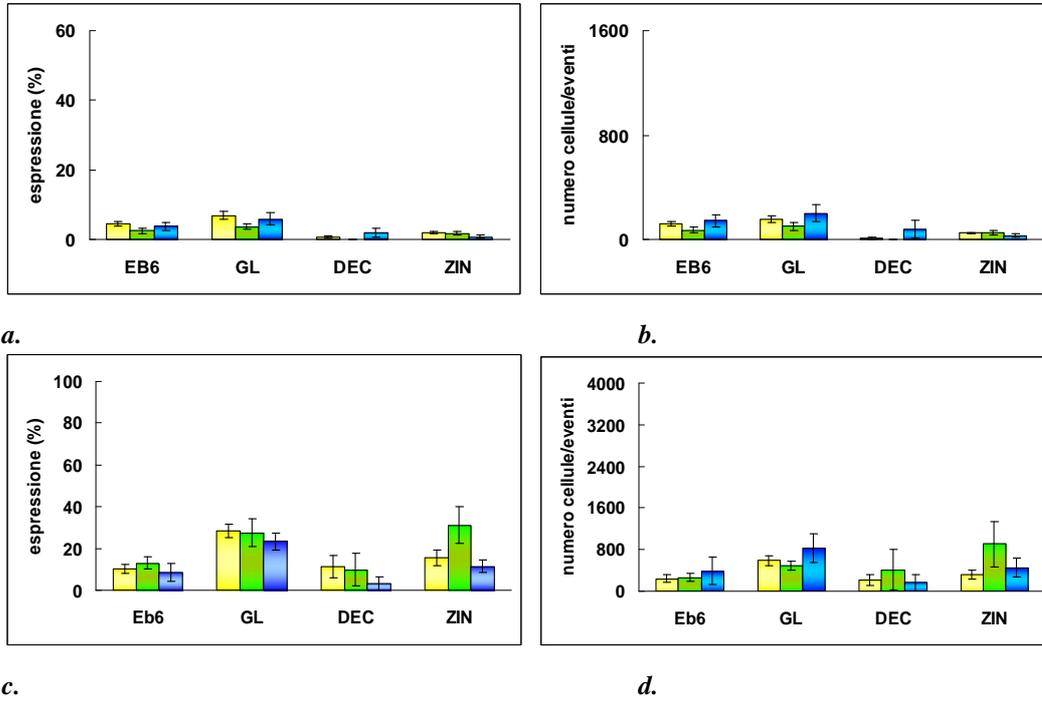
Dall'analisi della distribuzione dei recettori KLR, è stata osservata una diminuzione non significativa dell'espressione del recettore inibitorio Z199/NKG2A da parte delle cellule NK dei pazienti ( $39 \pm 5.3\%$  vs  $43 \pm 2.6\%$  e  $801 \pm 130$  vs  $1032 \pm 119$  cellule) ed un aumento non significativo dell'espressione del recettore attivatorio P25/NKG2C ( $54 \pm 3.2\%$  vs  $48 \pm 3.8\%$  e  $1165 \pm 120$  vs  $1005 \pm 115$  cellule) rispetto ai controlli. Dal momento che questi recettori si associano con CD94 per formare dimeri attivatori (CD94/NKG2C) o inibitori (CD94/NKG2A), ciò potrebbe indicare una tendenza da parte delle cellule NK dei pazienti a formare dimeri attivatori con una maggiore frequenza rispetto ai bambini sani (Figura 24c e d).

Dall'analisi dell'espressione dei NCR è stato evidenziato un aumento significativo dell'espressione del recettore attivatorio BAB281/Nkp46 ( $8 \pm 0.7\%$  vs  $5 \pm 0.8\%$ ,  $p < 0.05$  e  $176 \pm 18$  vs  $109 \pm 21$  cellule,  $p < 0.05$ ) nei pazienti rispetto ai controlli (Figura 25). Questo dato unito a quello relativo all'aumento della frequenza di formazione di dimeri attivatori CD94/NKG2A da parte delle cellule NK potrebbe indicare un quadro di aumentata attività citotossica delle cellule NK dei pazienti affetti da JLS.

Non sono state riscontrate differenze nell'espressione dei co-recettori tra i pazienti affetti da JLS e i controlli sani (Figura 26).

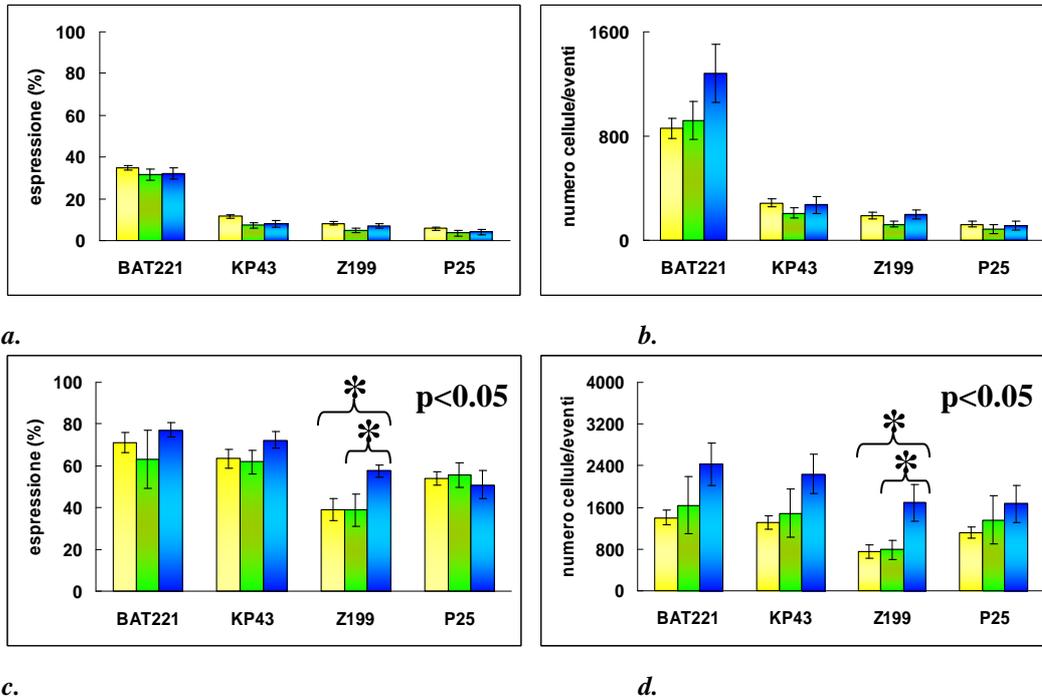
## 4.2.2 Analisi dei pazienti al tempo 3 mesi

### Analisi dell'espressione dei KIR



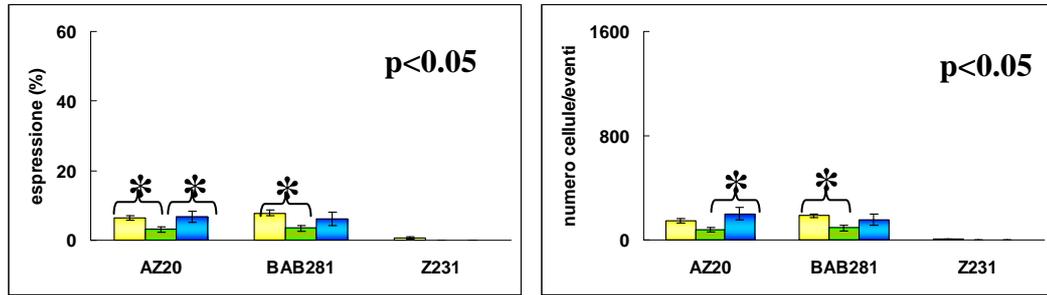
**Figura 27.** Le barre gialle rappresentano le medie $\pm$ ES calcolate nei pazienti a tempo 0 mesi, quelle verdi le medie calcolate nel gruppo MTX, quelle blu le medie calcolate nel gruppo placebo. In a. e c. i valori sono espressi in percentuale in b. e d. in numero assoluto.

### Analisi dell'espressione dei KLR



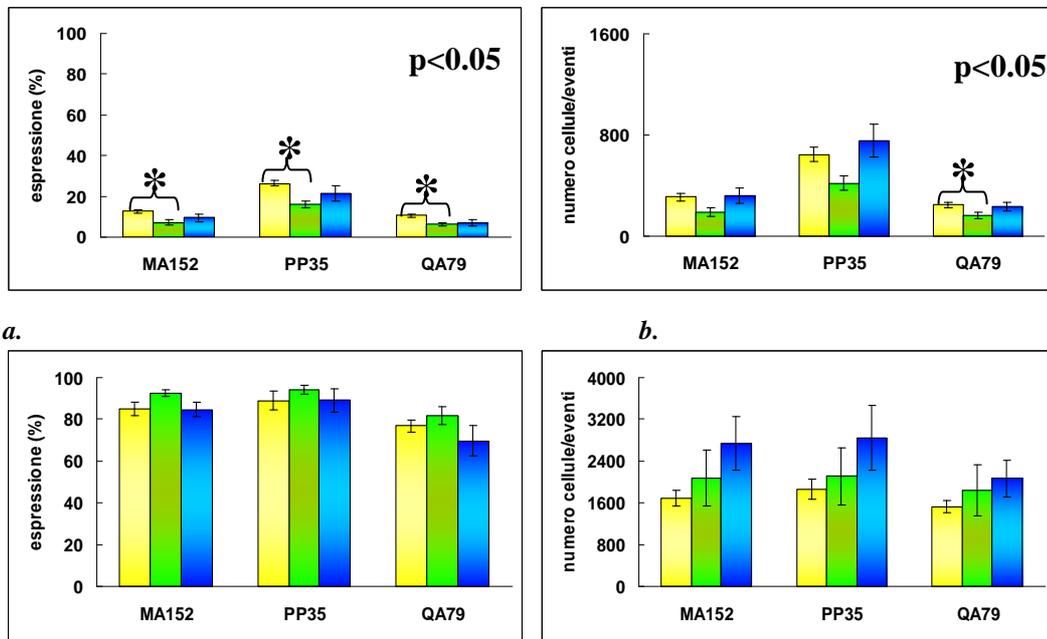
**Figura 28.**

### Analisi dell'espressione dei NCR



**Figura 29.**

### Analisi dell'espressione dei co-recettori



**Figura 30.**

L'analisi dell'espressione dei NCR è stata ripetuta dopo 3 mesi nel corso dei quali i pazienti sono stati sottoposti a trattamento con MTX associato a PDN oppure con il farmaco placebo associato a PDN.

Poco è stato possibile capire rispetto all'andamento dell'espressione di DEC dopo 3 mesi: la sua variabilità d'espressione nei pazienti affetti da JLS aggiunta alla scarsa numerosità dei gruppi a 3 mesi, hanno fatto sì che i valori medi calcolati per i 2 gruppi avessero degli ES molto elevati. Il marcatore GL183/KIR2DL o KIR2DS che a tempo 0 aveva valori di espressione

mediamente inferiori sulle cellule NK dei pazienti rispetto ai controlli, a 3 mesi di trattamento sembra mantenerli tali sia nel gruppo MTX che nel gruppo placebo, indicando che probabilmente la sua espressione non è modulata dall'azione del trattamento farmacologico a cui sono stati sottoposti i pazienti per i primi 3 mesi.(Figura 27c e d)

Per quanto riguarda l'analisi dei KLR, l'espressione del recettore inibitorio Z199/NKG2A che era mediamente inferiore sulle cellule NK dei pazienti a tempo 0, dopo 3 mesi è risultata significativamente aumentata nel gruppo placebo rispetto al tempo 0 ( $58\pm 2.8\%$  vs  $39\pm 5.3\%$ ,  $p<0.05$  e  $1692\pm 358$  vs  $751\pm 127$  cellule,  $p<0.05$ ) e rispetto al gruppo MTX ( $58\pm 2.8\%$  vs  $39\pm 7.8\%$ ,  $p<0.05$  e  $1692\pm 358$  vs  $792\pm 181$  cellule) che, invece, mantiene valori comparabili al tempo 0. Contemporaneamente all'aumento dell'espressione di Z199 è stato osservato un aumento anche dell'espressione di CD94 nel gruppo placebo sia rispetto al tempo 0 ( $72\pm 4\%$  vs  $63\pm 5\%$  e  $2247\pm 381$  vs  $1305\pm 128$  cellule) sia rispetto ai pazienti trattati con MTX ( $72\pm 4\%$  vs  $62\pm 6\%$  e  $2247\pm 381$  vs  $1490\pm 460$  cellule) (Figura 28 c e d). Quindi, nei placebo, ma non nei MTX è aumentata significativamente la tendenza da parte delle cellule NK a formare dimeri inibitori CD94/NKG2A.

Valutando l'espressione del marcatore BAB281/Nkp46 è emerso che la sua espressione, aumentata sulle cellule NK dei pazienti al tempo 0, dopo 3 mesi di trattamento con MTX e PDN diminuiva in maniera significativa rispetto al tempo 0 ( $4\pm 0.8\%$  vs  $8\pm 0.7\%$ ,  $p<0.05$  e  $97\pm 20.9$  vs  $176\pm 17.8$  cellule,  $p<0.05$ ). Ciò non accadeva nei pazienti trattati con placebo che continuavano ad avere valori di espressione di questo recettore elevati e comparabili a quelli ritrovati al tempo 0 (Figura 29). Tra i NCR, è emersa una diminuzione dell'espressione di un altro recettore citotossico, AZ20/Nkp30 nei pazienti trattati con MTX rispetto ai pazienti al tempo 0 ( $3\pm 0.8\%$  vs  $6\pm 0.7\%$ ,  $p<0.05$  e  $79\pm 19$  vs  $143\pm 18$  cellule) e rispetto ai pazienti trattati con il farmaco placebo ( $3\pm 0.8\%$  vs  $6\pm 1.3\%$ ,  $p<0.05$  e  $79\pm 19$  vs  $185\pm 41.6$  cellule,  $p<0.05$ ) (Figura 29).

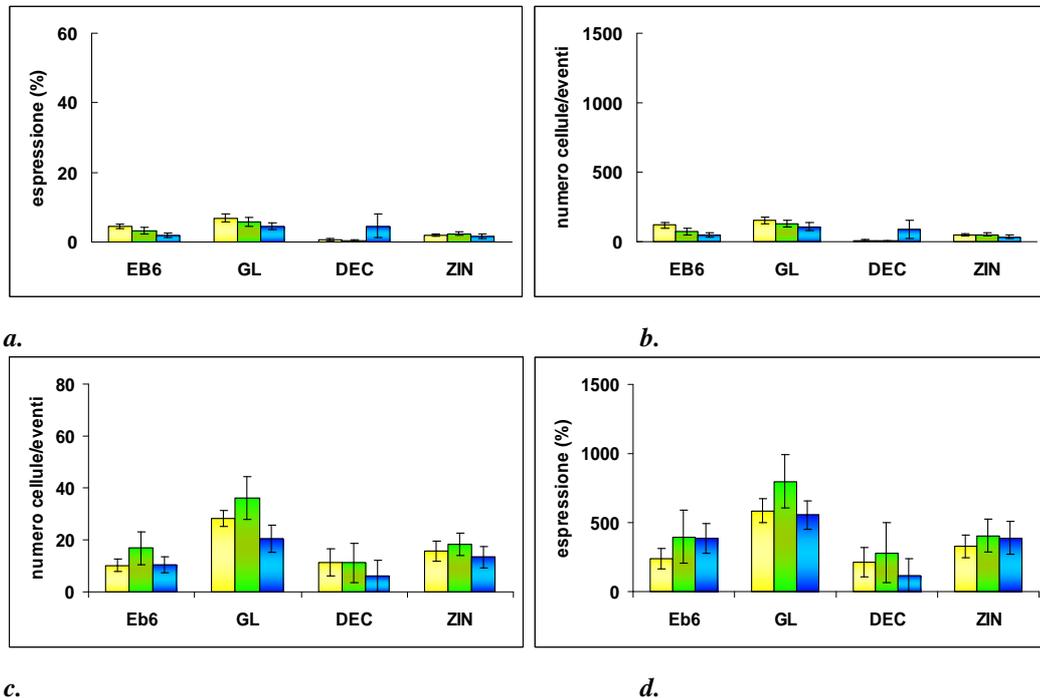
Infine, dall'analisi dei co-recettori, la cui espressione era normale al tempo 0, sono stati osservati valori ridotti delle frequenze di espressione di MA152/NKp80 ( $7\pm 1.1\%$  vs  $12\pm 0.8\%$ ,  $p<0.05$ ); di PP35/2B4 ( $16\pm 1.7\%$  vs  $26\pm 1.3\%$ ,  $p<0.05$ ) e di QA79/AIRM1 ( $6\pm 0.8\%$  vs  $11\pm 0.7\%$ ,  $p<0.05$  e  $164\pm 24.6$  vs

235±18.3 cellule,  $p<0.05$ ) nei linfociti dei pazienti trattati con MTX rispetto al tempo 0. Questi risultati non sono stati confermati dall'analisi eseguita nel gate delle cellule CD16<sup>+</sup>, indicando che le differenze osservate sono a carico, probabilmente di altri tipi cellulari che esprimono sulla loro superficie i NKR. E' noto, infatti che tali recettori possono essere espressi anche da alcune sottopopolazioni di linfociti T come ad esempio le cellule T $\gamma\delta$  e CD8<sup>+</sup>.

In conclusione, dall'analisi dei NKR a 3 mesi è emersa una tendenza significativamente aumentata da parte delle cellule NK dei pazienti placebo a formare dimeri inibitori CD94/NKG2A imputabile al trattamento con il PDN. Inoltre, 3 mesi di trattamento con MTX inducevano una riduzione dell'espressione di alcuni recettori di natura citotossica non solo nelle cellule NK, ma anche in altri sottotipi linfocitari che li esprimono.

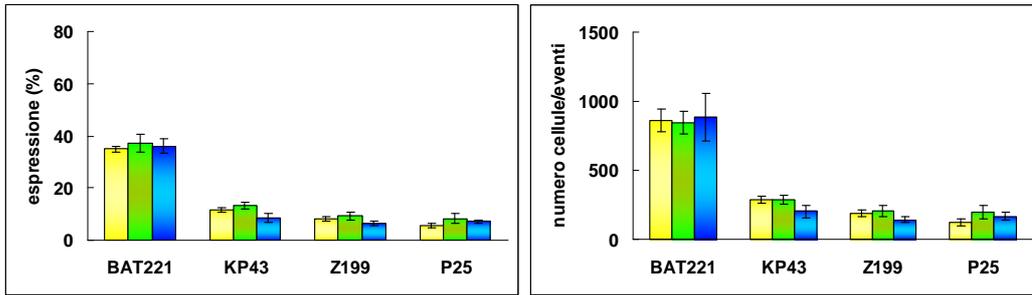
### 4.2.3 Analisi dei pazienti al tempo 12 mesi

#### Analisi dei KIR



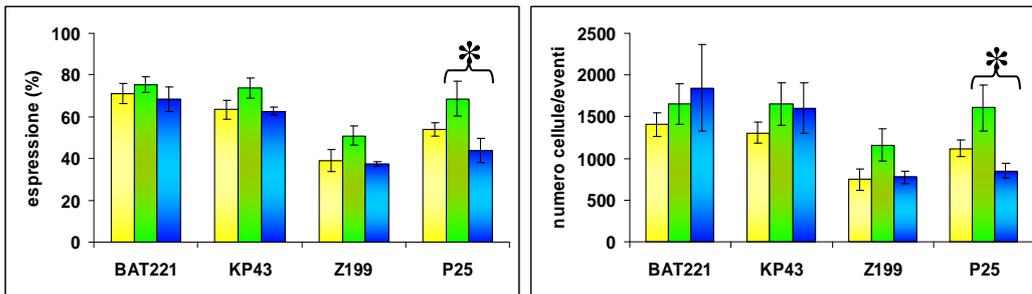
**Figura 31.**

## Analisi dei KLR



a.

b.

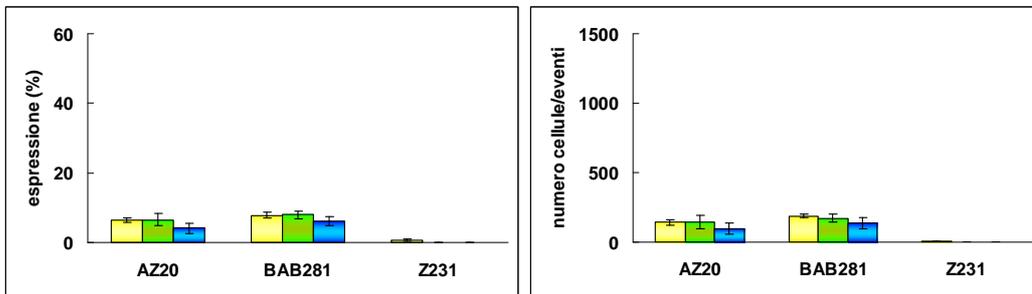


c.

d.

Figura 32.

## Analisi dei NCR

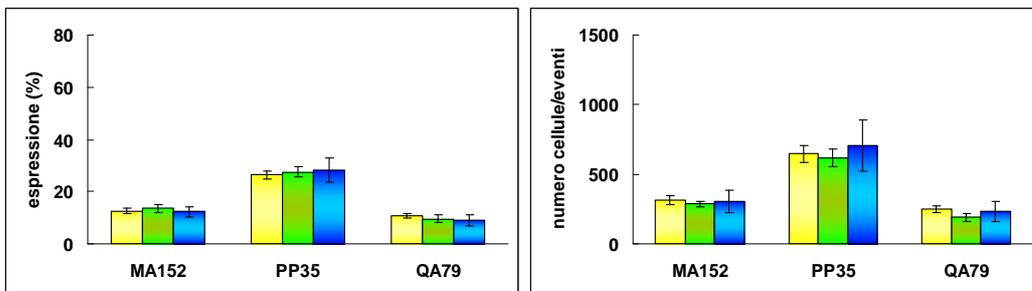


a.

b.

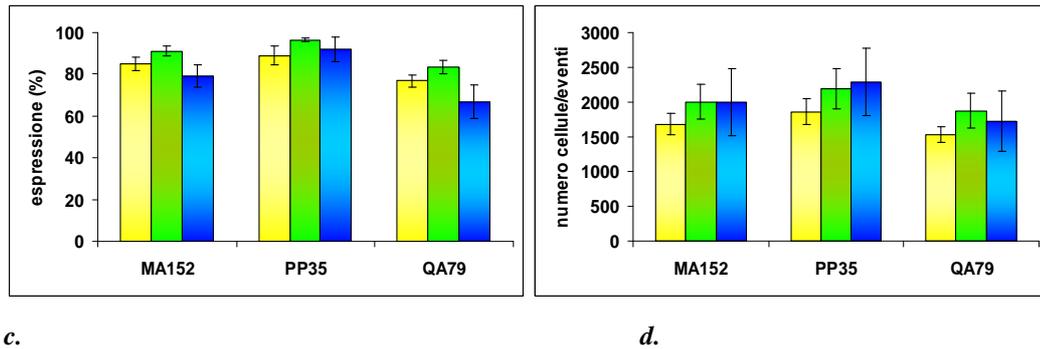
Figura 33.

## Analisi dei co-recettori



a.

b.



**Figura 34.**

Durante i primi 3 mesi del *trial* i pazienti sono stati trattati con il MTX o con il placebo associati al PDN e nei successivi 9 mesi essi sono stati trattati con il solo MTX o placebo.

L'espressione di GL183, che nelle cellule NK dei pazienti a tempo 0 aveva valori mediamente inferiori rispetto ai controlli e che, dopo 3 mesi di trattamento, li manteneva tali sia nel gruppo MTX che nel gruppo placebo, analizzata a 12 mesi aveva valori mediamente più elevati nei pazienti trattati con MTX rispetto al tempo 0 ( $36\pm 8\%$  vs  $28\pm 3\%$  e  $799\pm 189$  vs  $585\pm 89$  cellule) e rispetto al placebo ( $36\pm 8\%$  vs  $21\pm 5\%$  e  $799\pm 189$  vs  $554\pm 99$  cellule) (Figura 31 c e d).

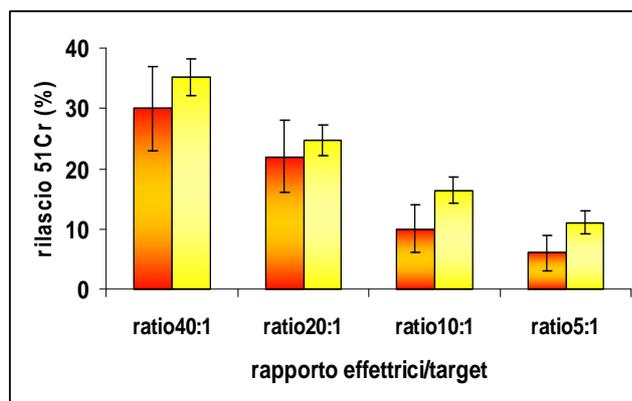
Dall'analisi dei KLR, l'espressione di Z199 che era mediamente diminuita nelle cellule NK dei pazienti a tempo 0 e che dopo 3 mesi era significativamente aumentata nel gruppo placebo sia rispetto al tempo 0 sia rispetto al gruppo MTX, dopo 12 mesi di trattamento con placebo diminuisce riacquisendo valori paragonabili al tempo 0 e questa riduzione rispetto al tempo 3 mesi è risultata significativa ( $38\pm 1.1\%$  vs  $58\pm 2.8\%$ ,  $p < 0.05$  e  $774\pm 71$  vs  $1692\pm 358$  cellule,  $p < 0.05$ ). Al contrario, sulle cellule NK dei pazienti trattati con MTX l'espressione di questo marcatore è aumentata rispetto al tempo 0 ( $51\pm 4.5\%$  vs  $39\pm 5.3\%$  e  $1161\pm 196$  vs  $751\pm 127$  cellule) e rispetto al gruppo placebo ( $51\pm 4.5$  vs  $38\pm 1.1$  e  $1161\pm 196$  vs  $774\pm 71$  cellule) (Figura 32 c e d). Queste differenze non sono significative, ma indicherebbero la tendenza da parte del MTX ad indurre la formazione di dimeri inibitori. Inoltre, nel gruppo MTX, contemporaneamente all'aumento dell'espressione di Z199 si è osservato un aumento non significativo dell'espressione di KP43 nelle cellule NK rispetto al tempo 0 ( $74\pm 5.0\%$  vs  $63\pm 4.5\%$  e  $1658\pm 255$  vs  $1305\pm 128$  cellule) (Figura 32 c e d). Infine, l'espressione

di P25 che aveva valori mediamente più elevati nelle cellule CD16<sup>+</sup> al tempo 0 e che a 3 mesi li manteneva tali sia nel gruppo placebo che in quello MTX, a 12 mesi aumenta nei MTX rispetto al tempo 0 (69±8.3% vs 54±3.2 e 1612±276 vs 1121±104cellule) e al placebo (69±8.3% vs 44±5.8%, p<0.05 e 1612±276 vs 852±85cellule, p<0.05) (Figura 32 c e d). Poiché P25 marca sia NKG2C che NKG2A, dalla differenza con i valori di espressione di Z199 si è dedotto che tali cellule tendono a formare dimeri inibitori con maggior frequenza. Contemporaneamente all'aumento dell'espressione di P25 nel gruppo MTX si verifica una riduzione della sua espressione nel gruppo placebo rispetto al tempo 0 (44±5.8% vs 54±3.2% e 852±85 vs 1121±104cellule) e questo fa sì che la differenza osservata tra gruppo MTX e gruppo placebo sia statisticamente significativa (Figura 32 c e d).

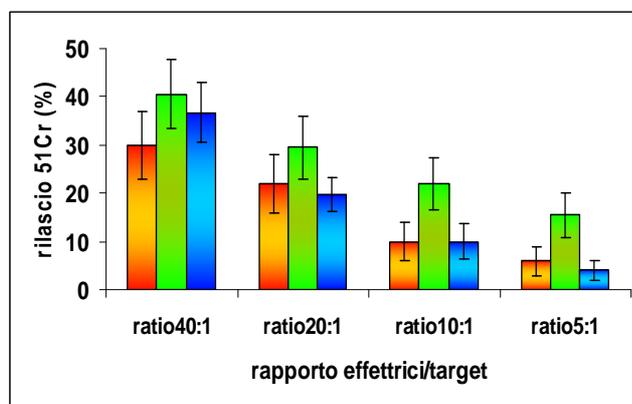
Dall'analisi dei NCR è emerso che BAB281/NKp46 che sembrava essere modulato da 3 mesi di trattamento con MTX, a 12 mesi riacquista valori paragonabili al tempo 0 e ciò ci ha fatto ipotizzare che il MTX abbia effetto sull'espressione di BAB281 solo quando associato al PDN. Anche l'espressione di AZ20 nei MTX riacquista valori paragonabili alla popolazione di partenza, confermando quello appena ipotizzato su BAB281. (Figura 33)

Il fatto che anche l'espressione dei co-recettori che a 3 mesi sembrava essere modulabile da MTX, a 12 mesi ritorni a valori comparabili al tempo 0 non fa che rassicurarci sulla teoria secondo la quale gli effetti sull'espressione dei recettori citotossici osservati a 3 mesi siano dovuti all'associazione MTX/PDN (Figura 34).

### 4.3 Valutazione dell'attività citotossica delle cellule NK



a.



b.

**Figura 35.** Il test di citotossicità NK è stato effettuato incubando i PBMC dei pazienti (effetttrici), piastrati a diverse concentrazioni, con le cellule *target* marcate con  $^{51}\text{Cr}$  piastrate ad una concentrazione fissa. Il rilascio di  $^{51}\text{Cr}$  è proporzionale all'attività citotossica delle cellule NK presenti. Negli istogrammi in ascissa sono riportati i rapporti ai quali vengono piastrate le cellule effettrici rispetto alle cellule *target*, in ordinata sono riportati i valori percentuali di rilascio di  $^{51}\text{Cr}$ . **a.** Le barre arancioni rappresentano i *range* di normalità dell'adulto espressi come  $\text{media} \pm \text{ES}$ . Le barre gialle rappresentano le  $\text{media} \pm \text{ES}$  calcolate sui valori percentuali di rilascio del  $^{51}\text{Cr}$  nei pazienti al tempo 0. **b.** Le barre verdi rappresentano le  $\text{media} \pm \text{ES}$  calcolate sui valori percentuali di rilascio del  $^{51}\text{Cr}$  nei pazienti trattati con MTX per 12 mesi; le barre blu rappresentano le  $\text{media} \pm \text{ES}$  calcolate sui valori percentuali di rilascio del  $^{51}\text{Cr}$  nei pazienti trattati con placebo per 12 mesi

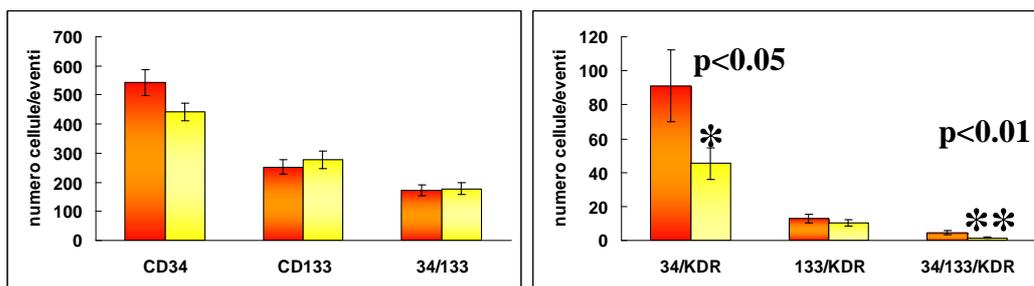
L'attività citotossica delle cellule NK dei pazienti affetti da JLS è stata valutata a tempo 0 prima del trattamento ed al tempo 12 mesi. Dall'elaborazione dei dati è emerso che le cellule NK dei pazienti affetti da JLS, rispetto ai *range* di

normalità nell'adulto, hanno un'elevata attività citotossica ai rapporti più bassi tra cellule effettrici e cellule *target* essendo ( $16\pm 2\%$  vs  $10\pm 4\%$ ) per il rapporto 10:1 e ( $11\pm 2\%$  vs  $6\pm 3\%$ ) per il rapporto 5:1.

Quando il test è stato ripetuto a 12 mesi si è osservato che in seguito a trattamento con MTX l'attività citotossica delle cellule NK continuava a mantenere valori mediamente più elevati ai più bassi rapporti di effettrici e *target* essendo ( $22\pm 5\%$  vs  $10\pm 4\%$ ) per il rapporto 10:1 e ( $16\pm 5\%$  vs  $6\pm 3\%$ ) per il rapporto 5:1. I valori riscontrati nel gruppo placebo rientravano nei range di normalità dell'adulto.

## 4.4 Quantificazione delle EPC

### 4.4.1 Analisi dei pazienti al tempo 0 mesi



**a.** **Figura 36.** L'analisi è stata effettuata sulle cellule  $CD34^+$ , identificate da un AcMo specifico e valutate per la duplice e triplice espressione di  $CD133^+$  e  $KDR^+$ ; e sulle cellule  $CD133^+$ , identificata da un AcMo specifico e valutate per la duplice espressione di  $KDR^+$ . **a.** I precursori circolanti sono stati definiti come  $CD34^+$  o  $CD133^+$  o  $CD34^+/CD133^+$ . **b.** I precursori endoteliali come  $CD34^+/KDR^+$ ,  $CD133^+/KDR^+$  o  $CD133^+/CD34^+/KDR^+$ . I dati ottenuti dall'analisi citofluorimetrica sono stati espressi come numero di cellule contate su  $1 \times 10^6$  eventi e sono stati rielaborati esprimendoli come medie $\pm$ ES. In arancione i valori relativi ai controlli, in giallo i valori relativi ai pazienti arruolati al tempo 0.

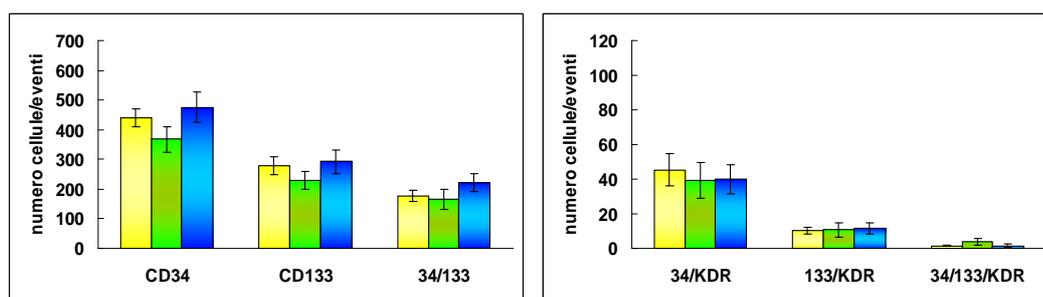
**Legenda:** **CD34:** marcatore ematopoietico; **CD133:** marcatore di staminalità; **KDR:** marcatore del recettore di VEGF, VEGFR-2 sulle cellule endoteliali.

Dall'analisi citofluorimetrica delle EPC è emerso che nel sangue periferico dei pazienti affetti da JLS il numero dei precursori ematopoietici  $CD34^+$  è

mediamente diminuito rispetto ai controlli sani ( $440 \pm 29.9$  vs  $542 \pm 46.3$  cellule) anche se tale differenza non è significativa (Figura 36a); invece non sono state riscontrate differenze nella numerosità delle cellule staminali  $CD133^+$  e  $CD34^+/CD133^+$  nei pazienti rispetto ai controlli. (Figura 36b)

Il numero dei precursori endoteliali  $CD34^+/KDR^+$  era significativamente diminuito nel sangue periferico dei pazienti affetti da JLS ( $45 \pm 9.3$  vs  $91 \pm 21.0$  cellule,  $p < 0.05$ ) così come quello dei precursori definiti come  $CD34^+/CD133^+/KDR^+$  ( $1.4 \pm 0.3$  vs  $4.7 \pm 1.2$  cellule,  $p < 0.01$ ) (Figura 36b). Anche le cellule  $CD133^+/KDR^+$  mostravano valori mediamente più bassi nel sangue dei pazienti rispetto ai controlli ( $10.3 \pm 2.1$  vs  $12.7 \pm 2.6$  cellule), ma questa differenza non è risultata significativa. (Figura 36b)

#### 4.4.2 Analisi dei pazienti al tempo 3 mesi

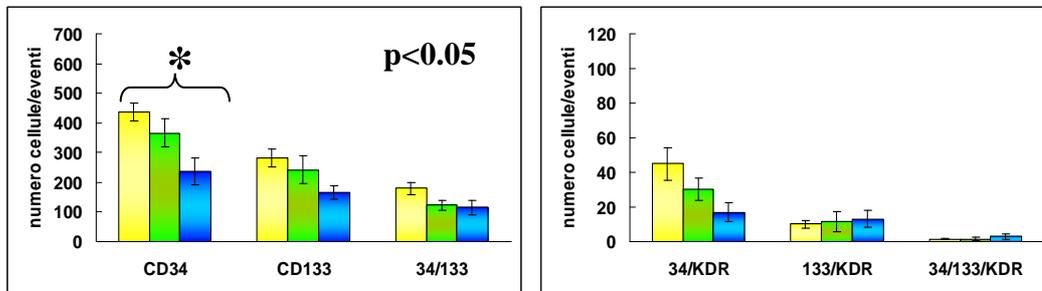


**a.** **b.**  
**Figura 37.** Le barre gialle rappresentano i valori di media $\pm$ ES nei pazienti t=0, le barre verdi nei pazienti trattati con MTX, le barre blu nei pazienti trattati con il farmaco placebo.

Dall'analisi del numero delle EPC nei pazienti a 3 mesi di *follow up* si è osservato che nonostante i pazienti trattati con MTX avessero quantità mediamente più basse di cellule staminali  $CD34^+$ ,  $CD133^+$  e  $CD34^+/KDR^+$  sia rispetto al tempo 0 ( $368 \pm 43$  vs  $440 \pm 30$  cellule), ( $229 \pm 30$  vs  $278 \pm 30$  cellule), ( $165 \pm 33$  vs  $177 \pm 20$  cellule) rispettivamente, sia rispetto ai pazienti trattati con il farmaco placebo ( $368 \pm 43$  vs  $476 \pm 50$  cellule), ( $229 \pm 30$  vs  $292 \pm 38$  cellule), ( $165 \pm 33$  vs  $221 \pm 30$  cellule) rispettivamente (Figura 37a), tuttavia possedevano un lieve aumento del numero delle cellule  $CD34^+/CD133^+/KDR^+$  rispetto ai pazienti al tempo 0 ( $3.8 \pm 2.0$  vs  $1.4 \pm 0.3$  cellule) e rispetto ai pazienti trattati con il farmaco

placebo ( $3.8 \pm 2.0$  vs  $1.5 \pm 0.8$  cellule), ma tali differenze non erano significative (Figura 37b).

#### 4.4.3 Analisi dei pazienti al tempo 12 mesi



a.  
Figura 38.

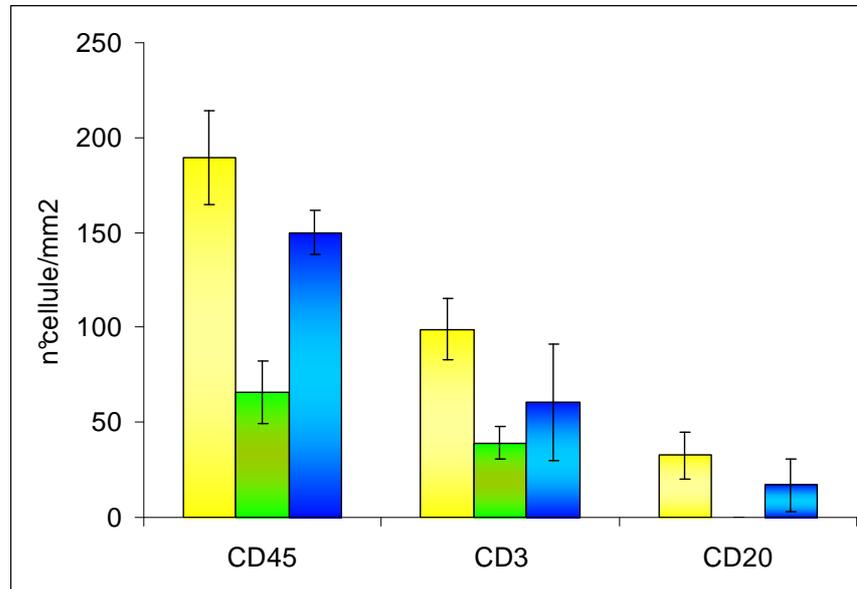
b.

Dall'analisi delle EPC dei pazienti dopo 12 mesi di trattamento con il farmaco placebo o con il farmaco MTX, è emerso che per quanto concerne le cellule staminali ematopoietiche, i pazienti trattati con farmaco placebo presentavano un abbattimento significativo del numero delle cellule  $CD34^+$ ,  $CD133^+$  e  $CD34^+/CD133^+$  rispetto ai valori che avevano a 3 mesi rispettivamente ( $238 \pm 46$  vs  $476 \pm 50$  cellule,  $p < 0.05$ ), ( $166 \pm 22$  vs  $292 \pm 38$  cellule,  $p < 0.05$ ), ( $116 \pm 24$  vs  $221 \pm 30$  cellule,  $p < 0.05$ ). Invece i pazienti trattati con il MTX mantenevano valori comparabili al tempo 3 mesi e al tempo 0 (figura 38a).

Per quanto riguarda i progenitori endoteliali, nei pazienti trattati con il farmaco placebo è stata osservata una diminuzione non significativa del numero delle cellule  $CD34^+/KDR^+$  ( $17 \pm 5.5$  vs  $40 \pm 8.4$  cellule) e valori comparabili al tempo 3 e al tempo 0 delle popolazioni  $CD133^+/KDR^+$  e  $CD34^+/CD133^+/KDR^+$  (Figura 38b). Le EPC che dopo 3 mesi di trattamento con MTX sembravano aumentate a 12 mesi sono diminuite a valori comparabili al tempo 0 e tale diminuzione non è significativa (Figura 38b).

Quindi, in generale si è osservato che il MTX potrebbe modulare il numero dei precursori staminali in circolo. Nei pazienti trattati con placebo, infatti, è stato osservato un forte abbattimento di esso a 12 mesi. Al contrario, il numero delle EPC non sembra essere modulato dal MTX: se a 3 mesi sembrava aumentare, a 12 mesi tornava ai livelli più bassi della normalità.

## 4.5 Analisi immunoistochimica



**Figura 39.** Negli istogrammi in giallo sono riportati i valori di medie $\pm$ ES calcolati al tempo 0, in verde quelli calcolati sui pazienti trattati con MTX per 12 mesi e in blu quelli calcolati sui pazienti trattati con placebo per 12 mesi. In ascissa è riportato il numero di cellule contate per mm<sup>2</sup> di tessuto. Il trattamento con MTX per 12 mesi ha indotto una regressione di più del 50% dei CD45<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> e una remissione dei CD20<sup>+</sup>.

La biopsia cutanea è stata ottenuta da 21 dei 42 pazienti arruolati nello studio al tempo 0 mesi e solo su 8 di questi pazienti è stata ripetuta dopo 12 mesi. Infatti, i pazienti che avevano localizzazione delle lesioni sclerotiche al volto non hanno effettuato biopsia e non sempre i genitori/pazienti hanno dato il consenso informato per l'esecuzione della biopsia ed inoltre alcuni pazienti sono usciti dallo studio prima del tempo di *follow-up* previsto a causa di un peggioramento della malattia. Tra i pazienti che hanno effettuato la biopsia al tempo 0, 12 erano affetti dalla forma lineare, 8 da morfea a placche, 1 da forma mista. Non sono state osservate differenze nelle caratteristiche dell'infiltrato infiammatorio tra le diverse forme. Degli 8 pazienti che hanno ripetuto la biopsia al tempo 12 mesi, 3 erano stati trattati con placebo e 5 con MTX. Le valutazioni immunoistochimiche sono state effettuate su almeno 3 campi di tessuto cutaneo scelti a caso della misura di 1mm<sup>2</sup> mediante l'utilizzo di un programma di analisi morfometrica computerizzata

Nell'infiltrato infiammatorio è stata analizzata la presenza di cellule CD45<sup>+</sup>. CD45 è un marcatore pan-leucocitario che individua linfociti, neutrofilii, monociti e granulociti. Tra i linfociti è stata indagata la presenza delle cellule CD3<sup>+</sup> e CD20<sup>+</sup>. In media sono state contate 189 cellule CD45<sup>+</sup> su mm<sup>2</sup> di tessuto, la popolazione linfocitaria maggiormente rappresentata era quella dei linfociti T CD3<sup>+</sup> e mediamente sono state contate 99 cellule per mm<sup>2</sup> di tessuto. Infine è stata evidenziata la presenza di una discreta popolazione di linfociti B, mediamente 33 cellule per mm<sup>2</sup> di tessuto.

Dopo 12 mesi si è osservata una significativa riduzione dell'infiltrato infiammatorio dei pazienti trattati con MTX e una parziale remissione dell'infiltrato dei placebo. In particolare, i pazienti trattati con MTX hanno avuto una riduzione del 65% delle cellule CD45<sup>+</sup> nell'infiltrato infiammatorio contro il 20% osservato nei pazienti trattati con il placebo e una riduzione delle cellule CD3<sup>+</sup> del 60% contro il 38% osservato nei pazienti trattati con il placebo, infine, mentre nei MTX la popolazione dei linfociti B laddove presente, era scomparsa e non se ne contava più una cellula, nei placebo subiva una parziale regressione dopo 12 mesi.

In conclusione, il MTX sembra avere modulato il processo infiammatorio locale riducendo di oltre il 50% l'infiltrato leucocitario con particolare efficacia a livello linfocitario dove si è osservata una drastica riduzione della componente T ed addirittura la scomparsa totale della popolazione B.

## 5. DISCUSSIONE

In questo studio è stato approfondito il ruolo del SI nella patogenesi della JLS. Tale patologia è considerata una malattia autoimmune essendo caratterizzata da alterazioni nel funzionamento del SI innato e adattativo evidenziate dalla presenza di autoanticorpi, citochine e fattori di crescita nel siero dei pazienti e dalla presenza di infiltrati leucocitari a livello delle lesioni cutanee<sup>26</sup>.

A tale scopo sono stati valutati 42 pazienti che erano stati arruolati nel *trial* clinico *randomizzato* in doppio cieco su “ efficacia del Metotrexate in associazione a Prednisone *versus* Prednisone nella Sclerodermia Localizzata Giovanile (Progetto INSIEME)”.

Subito dopo l’arruolamento, i pazienti sono stati randomizzati in due gruppi: il gruppo MTX, nel quale i pazienti sono stati trattati con MTX associato a PDN per 3 mesi seguiti da un trattamento con solo MTX per altri 9 mesi ed il gruppo placebo, nel quale i pazienti sono stati trattati con un farmaco placebo associato a PDN per 3 mesi seguiti da un trattamento con il solo placebo per altri 9 mesi. Il gruppo di controllo è stato costituito da 39 soggetti sani confrontabili per età e sesso.

Al fine di identificare le componenti del SI implicate nelle alterazioni tipiche della JLS è stata analizzata la distribuzione di alcune sottopopolazioni linfocitarie nel sangue periferico dei pazienti al tempo 0 rispetto al gruppo di controllo e si è monitorato se il loro numero variasse in seguito al trattamento con MTX o con il farmaco placebo dopo 3 e 12 mesi.

In generale, è emerso che l’assetto immunologico del sangue periferico dei pazienti affetti da JLS arruolati in questo studio era pressoché comparabile a quello dei bambini sani e non c’erano differenze significative nella distribuzione delle sottopopolazioni analizzate. Infatti, la frequenza dei linfociti T e B era pressoché normale, salvo che a 3 mesi i pazienti del gruppo placebo presentavano numeri assoluti di cellule CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e CD19<sup>+</sup> mediamente aumentati rispetto al tempo 0 e rispetto ai pazienti trattati con MTX, ma questa differenza oltre a non essere significativa, probabilmente rappresentava un effetto dovuto al

trattamento con il corticosteroide PDN. Infatti, a 12 mesi il numero dei linfociti T e B nel gruppo placebo tornava normale.

In contrasto a quanto osservato nel sangue periferico, l'analisi IC dell'infiltrato infiammatorio presente nelle lesioni cutanee mostrava un'abbondante presenza di leucociti CD45<sup>+</sup> che erano per la maggior parte cellule CD3<sup>+</sup>, inoltre è stata evidenziata la presenza di cellule CD20<sup>+</sup>. Il trattamento con MTX induceva una regressione di oltre il 50% di tutte le popolazioni cellulari analizzate e una remissione completa dei linfociti B, indicando che il MTX aveva un effetto importante sui fenomeni infiammatori in corso localmente.

Vari studi in letteratura hanno analizzato le caratteristiche dell'infiltrato infiammatorio delle lesioni sclerodermiche; uno studio in particolare, ha riportato l'analisi IC di biopsie cutanee di 6 pazienti adulti affetti da SL e 3 controlli sani evidenziando numeri più elevati di cellule CD1a<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e CD57<sup>+</sup> nell'infiltrato dermico dei pazienti rispetto a quello dei controlli rivelando che i linfociti T, le cellule di Langerhans e le cellule NK avevano un ruolo importante in questa patologia<sup>131</sup>. Alcuni Autori hanno ipotizzato che la sclerodermia sia una patologia guidata dalla risposta ad un Ag specifico da parte dei linfociti T essendo presenti negli infiltrati infiammatori insieme ai macrofagi già prima di ogni evidenza di fibrosi<sup>132</sup>. Inoltre, essi vanno incontro ad un'espansione oligoclonale nel tessuto<sup>39</sup>. Altri hanno dimostrato che nel sangue periferico dei pazienti affetti da SS sono riscontrati livelli elevati di linfociti T con marcatori di attivazione come IL2-R, HLA-DR e CD29<sup>133,77,134</sup>, nonché quelli di alcune citochine quali IL-2, -4, e -6 che indicherebbero uno stato d'attivazione dei linfociti T<sup>34</sup>.

Il ruolo dei linfociti B nella SS è meno chiaro, come risulta da alcuni studi: Tedder, ad esempio, ha dimostrato che i topi transgenici i cui linfociti avevano CD19 *over*-espresso, perdevano la tolleranza al *self* e producevano spontaneamente auto-anticorpi<sup>135</sup>. Il gruppo di Sato ha evidenziato che i pazienti affetti da SS presentavano *over*-espressione di CD19<sup>35</sup> e, in un lavoro successivo, ha dimostrato che nel sangue periferico dei pazienti affetti da SS c'era un'alterazione dell'omeostasi dei linfociti B con un'espansione dei linfociti B vergini e una riduzione dei linfociti B di memoria. Entrambe queste popolazioni presentavano *iper*-espressione del marcatore CD19 responsabile dello stato *iper*-

attivato dei linfociti B vergini<sup>29,33,130,136</sup>. Altri studi hanno dimostrato che la via di trasduzione del segnale attivata dall'asse CD19-CD21R era in grado di mediare l'espansione clonale e il differenziamento delle cellule B, nonché la produzione di anticorpi diretti contro Ag esogeni e *self*<sup>42</sup>.

Mentre le cellule B e T sono le principali responsabili della risposta immunitaria adattativa, le cellule NK sono le principali componenti del SI innato essendo capaci di uccidere le cellule bersaglio senza una precedente immunizzazione, siano esse tumorali o infettate da virus. Nei pazienti affetti da JLS analizzati in questo studio non sono state osservate alterazioni del numero e della frequenza delle cellule NK nel sangue periferico tuttavia, la loro attività citotossica, valutata con test di rilascio del <sup>51</sup>Cr, è risultata superiore ai livelli di normalità riscontrati nei soggetti sani adulti. Essa rimaneva elevata anche in seguito a 12 mesi di trattamento con MTX, mentre nei soggetti trattati con il farmaco placebo rientrava nei valori di normalità. In letteratura, vari gruppi hanno studiato il numero e la citotossicità delle cellule NK nel sangue periferico di pazienti affetti da SS con risultati contraddittori; i risultati osservati in questo studio sono più vicini a quelli riportati dal gruppo di Miller che non ha trovato una variazione nella frequenza e nel numero assoluto delle cellule NK<sup>108</sup>. Altri hanno osservato che la frequenza era diminuita<sup>137</sup> e un lavoro recente ha mostrato che il numero era aumentato mentre l'attività citotossica era diminuita<sup>83</sup>. In almeno tre studi l'attività citotossica era ridotta<sup>10,108,138</sup> e in almeno due aumentata<sup>137,139</sup>.

Le cellule NK esprimono sulla loro superficie recettori di natura inibitoria che ne regolano l'attività riconoscendo le molecole MHC-I sulle cellule bersaglio. Quando ciò non avviene, i segnali indotti dai recettori attivatori presenti sulla loro superficie prevalgono su quelli inibitori e le cellule NK si attivano lisando le cellule bersaglio. I recettori espressi dalle cellule NK appartengono a 4 famiglie principali: i KIR, i KLR, i NCR e i co-recettori e in questo studio la loro espressione è stata studiata mediante analisi citofluorimetrica. I pazienti analizzati al tempo 0 presentavano un aumento significativo dell'espressione del recettore citotossico NKp46/BAB281, appartenente alla famiglia dei NCR e non HLA specifico, e del recettore inibitorio KIR3DL2/DEC, appartenente alla famiglia dei KIR e HLA-A specifico. KIR3DL2 ha evidenziato un'alta variabilità di

espressione nei pazienti rispetto ai controlli e mentre al tempo 0 le differenze osservate sono risultate significative ( $p < 0.05$ ) ai tempi 3 e 12 mesi la significatività statistica è andata perduta. Infine, sono state osservate delle oscillazioni meno importanti dell'espressione di alcuni recettori appartenenti alla famiglia dei KLR. Il recettore CD94 appartenente a tale famiglia, può formare eterodimeri inibitori associandosi con il recettore NKG2A oppure eterodimeri attivatori associandosi con NKG2C. In questo studio è stato osservato che le cellule NK dei pazienti affetti da JLS tendevano a formare con maggiore frequenza eterodimeri attivatori rispetto a quelle degli individui sani. In conclusione, l'iper-espressione di alcuni recettori attivatori delle cellule NK e l'aumento della loro attività citotossica evidenziato dai test di rilascio del  $^{51}\text{Cr}$  suggeriscono che nella JLS è presente un quadro di un'aumentata citotossicità. Dalla letteratura è emerso chiaramente il ruolo cruciale delle cellule NK nell'immunosorveglianza. Alterazioni della loro funzionalità comportano fenomeni di autoimmunità mediati dai loro recettori<sup>86</sup>. Alcuni studi hanno dimostrato che le cellule NK sono in grado di uccidere cellule dendritiche (DC) autologhe attraverso l'attivazione di almeno due diverse vie del segnale e che la loro capacità citotossica è direttamente proporzionale alla densità di superficie dei NCR, in particolare di NKp46 e NKp30<sup>85,88</sup>. Molto spesso l'attività dei NCR è associata a quella di un KLR come NKG2D<sup>86,89,140</sup>. L'aumento dell'espressione di un KIR inibitorio osservato in questo studio, potrebbe sembrare contraddittorio rispetto al quadro descritto finora, ma in letteratura sono riportate condizioni in cui la presenza di certi KIR attivatori in assenza della controparte inibitoria o di KIR inibitori in assenza del loro ligando possono predisporre allo sviluppo di malattie autoimmuni. Per esempio, la presenza di KIR2DS2 è stata associata con lo sviluppo delle vasculiti nei pazienti affetti da AR<sup>141</sup>; la presenza di KIR2DS2 e KIR2DL2 in assenza dei ligandi per KIR2DL2 è stata associata con l'artrite psoriatICA<sup>142</sup> inoltre, la presenza del KIR attivatore KIR2DS2 e la contemporanea assenza di quello inibitore KIR2DL2 è stata associata con lo sviluppo della SS<sup>58</sup>. Una possibile ipotesi è che l'aumento dell'espressione di KIR3DL2 rappresenti la risposta dell'organismo ad un evento patologico, come un'infezione virale, tuttavia questo KIR non trovando le HLA-A sulla superficie delle cellule

bersaglio non induce il segnale inibitorio. Contemporaneamente aumenta l'espressione anche dei recettori attivatori che, in mancanza di segnali inibitori, attivano le cellule NK. Queste, per motivi ancora ignoti, non sono in grado di distinguere il *self* dal *non-self* e rivolgono la loro attività citotossica anche contro cellule autologhe<sup>12</sup>. E' noto dalla letteratura che, in seguito ad infezione da HCMV, nel sangue periferico di individui sani si osserva un'espansione di cellule CD94<sup>+</sup>/NKG2C<sup>+</sup>. Infatti, i PBMC prelevati da pazienti sani, messi in coltura con fibroblasti autologhi infettati da HCMV, presentano un aumento della popolazione CD94<sup>+</sup>/NKG2C<sup>+</sup><sup>143,144</sup>.

Dopo tre mesi di trattamento con MTX associato a PDN abbiamo assistito ad una significativa riduzione dell'espressione del recettore NKp46 nei pazienti trattati mentre ciò non avveniva in quelli trattati con solo PDN. Inoltre, diminuiva in maniera significativa anche l'espressione di un altro NCR, NKp30/AZ20, sia rispetto al tempo 0 che rispetto ai pazienti trattati con il farmaco placebo. Di contro, nel gruppo placebo è stato evidenziato un aumento dell'espressione di CD94 e di NKG2A, ma non di NKG2C indicando una tendenza da parte delle cellule NK di questi pazienti a formare dimeri inibitori con maggiore frequenza rispetto ai pazienti trattati con MTX. Infine, in seguito al trattamento con MTX è stata riscontrata la diminuzione dell'espressione anche dei co-recettori 2B4/PP35, Nkp80/MA152 e p75/QA79. Questi recettori sono in genere attivatori e molto spesso funzionano da coadiuvanti proprio all'attività dei NCR. L'alterazione della loro espressione è stata riscontrata nella popolazione linfocitaria totale, ma non nella popolazione CD16<sup>+</sup> e ciò ha fatto pensare che non fosse a carico delle cellule NK, ma di altri tipi cellulari. I co-recettori, come anche i KLR, possono essere espressi sia sui T $\gamma\delta$  che sui T CD8<sup>+</sup> e dati in letteratura hanno dimostrato la presenza di cellule T CD1d ristrette, con un repertorio di recettori simile a quello delle cellule NK. Tali cellule sono state definite cellule NKT ed è stato dimostrato un loro coinvolgimento in alcuni processi autoimmuni<sup>145,146</sup>.

Dai risultati raccolti in questo studio sembra che il MTX riesca a modulare l'espressione dei NKR nel sangue periferico solo se in associazione con i corticosteroidi. Questo è evidenziato dal fatto che quei recettori, la cui espressione sembrava essere stata modulata a 3 mesi, dopo 12 mesi tornano ad

assumere valori comparabili a quelli basali. Aggiunto a ciò, l'attività citotossica delle cellule NK a 12 mesi era elevata nei pazienti trattati con MTX.

In conclusione, nei pazienti con JLS l'espressione dei recettori attivatori è aumentata (NKp46, CD94/NKG2A) inducendo probabilmente come risultato l'aumento dell'attività citotossica delle cellule NK. Le alterazioni individuate a livello del sangue periferico non hanno un andamento specifico e omogeneo per tutti i pazienti perciò, nonostante siano risultate significative, non sembrano essere fattori cruciali nell'influenzare l'andamento della patologia, piuttosto potrebbero rappresentare degli epifenomeni. Non è escluso che in una malattia di natura localizzata, com'è la JLS, le cellule NK e i loro recettori possano avere un ruolo più incisivo a livello locale dove varrebbe la pena, e questo sarà il nostro prossimo obiettivo, di analizzare non solo la loro espressione, ma anche quella dei loro ligandi che sono stati trovati *iper*-espressi nei tessuti infiammati<sup>140</sup>.

La sclerodermia è una patologia caratterizzata da grave ischemia tissutale. L'apporto ridotto d'ossigeno genera stress ossidativo che danneggia le cellule endoteliali e l'organismo risponde con un aumento dei fenomeni di riparazione del danno, ma l'incapacità di risolverlo porta al rimodellamento incontrollato del tessuto e alla deposizione di ECM e collagene responsabili della fibrosi. Vari lavori hanno dimostrato che l'angiogenesi e la vasculogenesi sono difettose in questa patologia<sup>126,127,45</sup>. Allo scopo di approfondire le cause che inducono tali difetti sono state quantificate le EPC nel sangue periferico dei pazienti arruolati nello studio e si è monitorato se la numerosità di queste cellule venisse modificata dal trattamento con MTX. Le EPC sono generalmente di raro riscontro a livello del sangue periferico e non è facile identificarle. Diversi studi hanno usato criteri diversi per caratterizzarle, in alcuni vengono definite EPC le cellule CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> o CD133<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> in altri le cellule CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup><sup>147,148</sup>. In questo studio, i precursori circolanti sono stati definiti come CD34<sup>+</sup> o CD133<sup>+</sup> o CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>, mentre i precursori endoteliali come CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> o CD133<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> e CD133<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup>. Nel sangue periferico dei pazienti affetti da JLS è emersa una deplezione del numero delle EPC CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup>, CD133<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup>, nonché del numero delle cellule staminali ematopoietiche CD34<sup>+</sup>. Questo è il primo studio che dimostra una deplezione delle EPC nella JLS, infatti, vari gruppi

hanno studiato il loro ruolo nelle alterazioni vascolari della SS con risultati contrastanti, alcuni hanno dimostrato una diminuzione del loro numero<sup>128,149</sup>, altri un aumento<sup>49</sup>. A questa apparente contraddizione sembrava avere fatto chiarezza il lavoro di un gruppo Italiano che correlava il numero delle EPC con le fasi di malattia dimostrando come, nella fase iniziale, in risposta al danno endoteliale, ci fosse un aumento della loro mobilitazione dal MO che si riduceva nel corso della fase tardiva sottolineando il fallimento dei sistemi di riparazione<sup>129</sup>. I risultati ottenuti in questo studio, in cui sono stati arruolati pazienti con malattia in fase acuta per lo più all'esordio, sembrano essere in contrasto con quanto riportato proprio dal suddetto studio ed il motivo delle differenze osservate potrebbe risiedere nella diversa patologia in oggetto: Sclerosi Sistemica *versus* Sclerodermia Localizzata.

Per quanto riguarda l'andamento del numero di queste cellule nel tempo e in seguito ai trattamenti previsti dal *trial*, è emerso che i pazienti trattati con MTX mantenevano livelli costanti sia dei precursori ematopoietici sia dei precursori endoteliali. Invece, i pazienti trattati con il placebo a 3 mesi avevano un aumento dei livelli dei precursori ematopoietici e a 12 mesi un abbattimento del loro numero, mentre mantenevano costante quello dei precursori endoteliali. Questi dati suggeriscono che il MTX moduli la mobilitazione delle cellule staminali dal MO mantenendola costante nel corso del tempo e ciò è evidenziato dal fatto che i pazienti che non lo assumono a 12 mesi hanno una deplezione significativa del loro numero nel sangue periferico. Tuttavia, il MTX non sembra modulare in alcun modo il numero dei precursori endoteliali che rimane pressoché costante nel tempo tra i due gruppi.

In conclusione, i pazienti affetti da JLS presentano un aumento dell'attività citotossica delle cellule NK, determinato probabilmente dall'aumento dell'espressione di alcuni recettori di citotossicità. Tali fenomeni, osservati a livello periferico, sono troppo poco specifici per essere definiti marcatori di malattia.

La deplezione delle EPC potrebbe invece rappresentare una caratteristica specifica della patologia ed essere indice d'una ridotta mobilitazione di questi

precursori staminali dal MO. Ciò avrebbe come conseguenza difetti dell'angiogenesi e della vasculogenesi.

La presenza di infiltrati infiammatori ricchi di linfociti a livello delle lesioni cutanee suggerisce che il SI ha un ruolo patogenetico importante nella JLS, evidente soprattutto a livello locale dove si verifica il reclutamento di cellule infiammatorie. Il fatto che esse siano principalmente linfociti T indica che la patologia è probabilmente guidata da una risposta ad un Ag da parte di queste cellule.

## *Bibliografia*

1. Torres JE, Sanchez JL. Histopathologic differentiation between localized and systemic scleroderma. *Am J Dermatopathol.* 1998;20:242-245.
2. Weibel L, Harper JI, Howell KJ. Morphea (localized scleroderma). *J Pediatr.* 2007;150:560.
3. Peterson LS, Nelson AM, Su WP. Classification of morphea (localized scleroderma). *Mayo Clin Proc.* 1995;70:1068-1076.
4. Zulian F, Athreya BH, Laxer R, et al. Juvenile localized scleroderma: clinical and epidemiological features in 750 children. An international study. *Rheumatology (Oxford).* 2006;45:614-620.
5. Artlett CM, Smith JB, Jimenez SA. New perspectives on the etiology of systemic sclerosis. *Mol Med Today.* 1999;5:74-78.
6. Scaletti C, Vultaggio A, Maggi E, Romagnani S, Piccinni MP. Microchimerism and systemic sclerosis. *Int Arch Allergy Immunol.* 2001;125:196-202.
7. Jimenez SA, Derk CT. Following the molecular pathways toward an understanding of the pathogenesis of systemic sclerosis. *Ann Intern Med.* 2004;140:37-50.
8. Stephens CO, Briggs DC, Whyte J, et al. Familial scleroderma--evidence for environmental versus genetic trigger. *Br J Rheumatol.* 1994;33:1131-1135.
9. Kuwana M, Inoko H, Kameda H, et al. Association of human leukocyte antigen class II genes with autoantibody profiles, but not with disease susceptibility in Japanese patients with systemic sclerosis. *Intern Med.* 1999;38:336-344.
10. Kuwana M, Kaburaki J, Arnett FC, Howard RF, Medsger TA, Jr., Wright TM. Influence of ethnic background on clinical and serologic features in patients with systemic sclerosis and anti-DNA topoisomerase I antibody. *Arthritis Rheum.* 1999;42:465-474.
11. Maul GG, Jimenez SA, Riggs E, Ziemnicka-Kotula D. Determination of an epitope of the diffuse systemic sclerosis marker antigen DNA topoisomerase I: sequence similarity with retroviral p30gag protein suggests a possible cause for autoimmunity in systemic sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86:8492-8496.
12. Lunardi C, Bason C, Corrocher R, Puccetti A. Induction of endothelial cell damage by hCMV molecular mimicry. *Trends Immunol.* 2005;26:19-24.
13. Lunardi C, Bason C, Navone R, et al. Systemic sclerosis immunoglobulin G autoantibodies bind the human cytomegalovirus late protein UL94 and induce apoptosis in human endothelial cells. *Nat Med.* 2000;6:1183-1186.
14. Lunardi C, Dolcino M, Peterlana D, et al. Antibodies against human cytomegalovirus in the pathogenesis of systemic sclerosis: a gene array approach. *PLoS Med.* 2006;3:e2.
15. Artlett CM. Pathophysiology of fetal microchimeric cells. *Clin Chim Acta.* 2005;360:1-8.
16. Sawaya HH, Jimenez SA, Artlett CM. Quantification of fetal microchimeric cells in clinically affected and unaffected skin of patients with systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford).* 2004;43:965-968.

17. Artlett CM, Cox LA, Jimenez SA. Detection of cellular microchimerism of male or female origin in systemic sclerosis patients by polymerase chain reaction analysis of HLA-Cw antigens. *Arthritis Rheum.* 2000;43:1062-1067.
18. Artlett CM, Cox LA, Ramos RC, et al. Increased microchimeric CD4+ T lymphocytes in peripheral blood from women with systemic sclerosis. *Clin Immunol.* 2002;103:303-308.
19. Sambo P, Jannino L, Candela M, et al. Monocytes of patients with systemic sclerosis (scleroderma) spontaneously release in vitro increased amounts of superoxide anion. *J Invest Dermatol.* 1999;112:78-84.
20. Sambo P, Baroni SS, Luchetti M, et al. Oxidative stress in scleroderma: maintenance of scleroderma fibroblast phenotype by the constitutive up-regulation of reactive oxygen species generation through the NADPH oxidase complex pathway. *Arthritis Rheum.* 2001;44:2653-2664.
21. Derk CT, Jimenez SA. Systemic sclerosis: current views of its pathogenesis. *Autoimmun Rev.* 2003;2:181-191.
22. Christner PJ, Jimenez SA. Animal models of systemic sclerosis: insights into systemic sclerosis pathogenesis and potential therapeutic approaches. *Curr Opin Rheumatol.* 2004;16:746-752.
23. Jimenez SA, Christner PJ. Murine animal models of systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol.* 2002;14:671-680.
24. Lakos G, Takagawa S, Varga J. Animal models of scleroderma. *Methods Mol Med.* 2004;102:377-393.
25. Gentiletti J, McCloskey LJ, Artlett CM, Peters J, Jimenez SA, Christner PJ. Demonstration of autoimmunity in the tight skin-2 mouse: a model for scleroderma. *J Immunol.* 2005;175:2418-2426.
26. Takehara K, Sato S. Localized scleroderma is an autoimmune disorder. *Rheumatology (Oxford).* 2005;44:274-279.
27. McHugh NJ, Whyte J, Artlett C, et al. Anti-centromere antibodies (ACA) in systemic sclerosis patients and their relatives: a serological and HLA study. *Clin Exp Immunol.* 1994;96:267-274.
28. Takehara K, Kikuchi K, Soma Y, Igarashi A, Ishibashi Y. Anti-single-stranded DNA antibody and muscle involvement in localized scleroderma. *Arch Dermatol.* 1990;126:1368.
29. Hayakawa I, Hasegawa M, Takehara K, Sato S. Anti-DNA topoisomerase IIalpha autoantibodies in localized scleroderma. *Arthritis Rheum.* 2004;50:227-232.
30. Sato S, Ihn H, Soma Y, et al. Antihistone antibodies in patients with localized scleroderma. *Arthritis Rheum.* 1993;36:1137-1141.
31. Sato S, Fujimoto M, Ihn H, Kikuchi K, Takehara K. Clinical characteristics associated with antihistone antibodies in patients with localized scleroderma. *J Am Acad Dermatol.* 1994;31:567-571.
32. Sato S, Fujimoto M, Ihn H, Kikuchi K, Takehara K. Antigen specificity of antihistone antibodies in localized scleroderma. *Arch Dermatol.* 1994;130:1273-1277.
33. Sato S, Kodera M, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K. Antinucleosome antibody is a major autoantibody in localized scleroderma. *Br J Dermatol.* 2004;151:1182-1188.

34. Ihn H, Sato S, Fujimoto M, Kikuchi K, Takehara K. Demonstration of interleukin-2, interleukin-4 and interleukin-6 in sera from patients with localized scleroderma. *Arch Dermatol Res.* 1995;287:193-197.
35. Nagaoka T, Sato S, Hasegawa M, Ihn H, Takehara K. Serum levels of soluble interleukin 6 receptor and soluble gp130 are elevated in patients with localized scleroderma. *J Rheumatol.* 2000;27:1917-1921.
36. Sato S, Fujimoto M, Hasegawa M, Takehara K. Antiphospholipid antibody in localised scleroderma. *Ann Rheum Dis.* 2003;62:771-774.
37. Artlett CM. Immunology of systemic sclerosis. *Front Biosci.* 2005;10:1707-1719.
38. Kraling BM, Maul GG, Jimenez SA. Mononuclear cellular infiltrates in clinically involved skin from patients with systemic sclerosis of recent onset predominantly consist of monocytes/macrophages. *Pathobiology.* 1995;63:48-56.
39. Sakkas LI, Xu B, Artlett CM, Lu S, Jimenez SA, Platsoucas CD. Oligoclonal T cell expansion in the skin of patients with systemic sclerosis. *J Immunol.* 2002;168:3649-3659.
40. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol.* 2005;6:345-352.
41. Hasegawa M, Hamaguchi Y, Yanaba K, et al. B-lymphocyte depletion reduces skin fibrosis and autoimmunity in the tight-skin mouse model for systemic sclerosis. *Am J Pathol.* 2006;169:954-966.
42. Saito E, Fujimoto M, Hasegawa M, et al. CD19-dependent B lymphocyte signaling thresholds influence skin fibrosis and autoimmunity in the tight-skin mouse. *J Clin Invest.* 2002;109:1453-1462.
43. Distler JH, Akhmetshina A, Schett G, Distler O. Monocyte chemoattractant proteins in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford).* 2008.
44. Hasegawa M. The roles of chemokines in the development of systemic sclerosis. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi.* 2008;31:23-36.
45. Koch AE, Distler O. Vasculopathy and disordered angiogenesis in selected rheumatic diseases: rheumatoid arthritis and systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther.* 2007;9 Suppl 2:S3.
46. Distler O, Del Rosso A, Giacomelli R, et al. Angiogenic and angiostatic factors in systemic sclerosis: increased levels of vascular endothelial growth factor are a feature of the earliest disease stages and are associated with the absence of fingertip ulcers. *Arthritis Res.* 2002;4:R11.
47. D'Alessio S, Fibbi G, Cinelli M, et al. Matrix metalloproteinase 12-dependent cleavage of urokinase receptor in systemic sclerosis microvascular endothelial cells results in impaired angiogenesis. *Arthritis Rheum.* 2004;50:3275-3285.
48. Serrati S, Cinelli M, Margheri F, et al. Systemic sclerosis fibroblasts inhibit in vitro angiogenesis by MMP-12-dependent cleavage of the endothelial cell urokinase receptor. *J Pathol.* 2006;210:240-248.
49. Del Papa N, Cortiana M, Comina DP, et al. [Endothelial progenitor cells in systemic sclerosis: their possible role in angiogenesis]. *Reumatismo.* 2005;57:174-179.

50. Moustakas A, Souchelnytskyi S, Heldin CH. Smad regulation in TGF-beta signal transduction. *J Cell Sci.* 2001;114:4359-4369.
51. Ihn H, Yamane K, Asano Y, Jinnin M, Tamaki K. Constitutively phosphorylated Smad3 interacts with Sp1 and p300 in scleroderma fibroblasts. *Rheumatology (Oxford).* 2006;45:157-165.
52. Denton CP, Abraham DJ. Transforming growth factor-beta and connective tissue growth factor: key cytokines in scleroderma pathogenesis. *Curr Opin Rheumatol.* 2001;13:505-511.
53. Mori Y, Chen SJ, Varga J. Expression and regulation of intracellular SMAD signaling in scleroderma skin fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 2003;48:1964-1978.
54. Varga J. Scleroderma and Smads: dysfunctional Smad family dynamics culminating in fibrosis. *Arthritis Rheum.* 2002;46:1703-1713.
55. Abraham DJ, Eckes B, Rajkumar V, Krieg T. New developments in fibroblast and myofibroblast biology: implications for fibrosis and scleroderma. *Curr Rheumatol Rep.* 2007;9:136-143.
56. Bakin AV, Tomlinson AK, Bhowmick NA, Moses HL, Arteaga CL. Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration. *J Biol Chem.* 2000;275:36803-36810.
57. Rajkumar VS, Sundberg C, Abraham DJ, Rubin K, Black CM. Activation of microvascular pericytes in autoimmune Raynaud's phenomenon and systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 1999;42:930-941.
58. Momot T, Koch S, Hunzelmann N, et al. Association of killer cell immunoglobulin-like receptors with scleroderma. *Arthritis Rheum.* 2004;50:1561-1565.
59. Murray KJ, Laxer RM. Scleroderma in children and adolescents. *Rheum Dis Clin North Am.* 2002;28:603-624.
60. Hulshof MM, Bouwes Bavinck JN, Bergman W, et al. Double-blind, placebo-controlled study of oral calcitriol for the treatment of localized and systemic scleroderma. *J Am Acad Dermatol.* 2000;43:1017-1023.
61. Seyger MM, van den Hoogen FH, de Boo T, de Jong EM. Low-dose methotrexate in the treatment of widespread morphea. *J Am Acad Dermatol.* 1998;39:220-225.
62. Uziel Y, Feldman BM, Krafchik BR, Yeung RS, Laxer RM. Methotrexate and corticosteroid therapy for pediatric localized scleroderma. *J Pediatr.* 2000;136:91-95.
63. Weibel L, Sampaio MC, Visentin MT, Howell KJ, Woo P, Harper JJ. Evaluation of methotrexate and corticosteroids for the treatment of localized scleroderma (morphea) in children. *Br J Dermatol.* 2006;155:1013-1020.
64. Swierkot J, Szechinski J. Methotrexate in rheumatoid arthritis. *Pharmacol Rep.* 2006;58:473-492.
65. Farag SS, Caligiuri MA. Human natural killer cell development and biology. *Blood Rev.* 2006;20:123-137.
66. Parolini S, Bottino C, Falco M, et al. X-linked lymphoproliferative disease. 2B4 molecules displaying inhibitory rather than activating function are responsible for the inability of natural killer cells to kill Epstein-Barr virus-infected cells. *J Exp Med.* 2000;192:337-346.

67. Vaidya SV, Mathew PA. Of mice and men: different functions of the murine and human 2B4 (CD244) receptor on NK cells. *Immunol Lett.* 2006;105:180-184.
68. Moretta L, Moretta A. Killer immunoglobulin-like receptors. *Curr Opin Immunol.* 2004;16:626-633.
69. Hayakawa Y, Smyth MJ. NKG2D and cytotoxic effector function in tumor immune surveillance. *Semin Immunol.* 2006;18:176-185.
70. Bauer S, Groh V, Wu J, et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science.* 1999;285:727-729.
71. Pende D, Spaggiari GM, Marcenaro S, et al. Analysis of the receptor-ligand interactions in the natural killer-mediated lysis of freshly isolated myeloid or lymphoblastic leukemias: evidence for the involvement of the Poliovirus receptor (CD155) and Nectin-2 (CD112). *Blood.* 2005;105:2066-2073.
72. Bottino C, Castriconi R, Moretta L, Moretta A. Cellular ligands of activating NK receptors. *Trends Immunol.* 2005;26:221-226.
73. Arnon TI, Lev M, Katz G, Chernobrov Y, Porgador A, Mandelboim O. Recognition of viral hemagglutinins by NKp44 but not by NKp30. *Eur J Immunol.* 2001;31:2680-2689.
74. Mandelboim O, Lieberman N, Lev M, et al. Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature.* 2001;409:1055-1060.
75. Arnon TI, Achdout H, Lieberman N, et al. The mechanisms controlling the recognition of tumor- and virus-infected cells by NKp46. *Blood.* 2004;103:664-672.
76. Bloushtain N, Qimron U, Bar-Ilan A, et al. Membrane-associated heparan sulfate proteoglycans are involved in the recognition of cellular targets by NKp30 and NKp46. *J Immunol.* 2004;173:2392-2401.
77. Zilka A, Landau G, Hershkovitz O, et al. Characterization of the heparin/heparan sulfate binding site of the natural cytotoxicity receptor NKp46. *Biochemistry.* 2005;44:14477-14485.
78. Vankayalapati R, Garg A, Porgador A, et al. Role of NK cell-activating receptors and their ligands in the lysis of mononuclear phagocytes infected with an intracellular bacterium. *J Immunol.* 2005;175:4611-4617.
79. Garg A, Barnes PF, Porgador A, et al. Vimentin expressed on *Mycobacterium tuberculosis*-infected human monocytes is involved in binding to the NKp46 receptor. *J Immunol.* 2006;177:6192-6198.
80. Sivori S, Parolini S, Falco M, et al. 2B4 functions as a co-receptor in human NK cell activation. *Eur J Immunol.* 2000;30:787-793.
81. Assarsson E, Kambayashi T, Persson CM, Ljunggren HG, Chambers BJ. 2B4 co-stimulation: NK cells and their control of adaptive immune responses. *Mol Immunol.* 2005;42:419-423.
82. Assarsson E, Kambayashi T, Persson CM, Chambers BJ, Ljunggren HG. 2B4/CD48-mediated regulation of lymphocyte activation and function. *J Immunol.* 2005;175:2045-2049.
83. Horikawa M, Hasegawa M, Komura K, et al. Abnormal natural killer cell function in systemic sclerosis: altered cytokine production and defective killing activity. *J Invest Dermatol.* 2005;125:731-737.

84. Raulet DH, Vance RE. Self-tolerance of natural killer cells. *Nat Rev Immunol.* 2006;6:520-531.
85. Sivori S, Pende D, Bottino C, et al. NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells. Correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells. *Eur J Immunol.* 1999;29:1656-1666.
86. Poggi A, Prevosto C, Massaro AM, et al. Interaction between human NK cells and bone marrow stromal cells induces NK cell triggering: role of NKp30 and NKG2D receptors. *J Immunol.* 2005;175:6352-6360.
87. Poggi A, Prevosto C, Zancolli M, Canevali P, Musso A, Zocchi MR. NKG2D and natural cytotoxicity receptors are involved in natural killer cell interaction with self-antigen presenting cells and stromal cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1109:47-57.
88. Spaggiari GM, Carosio R, Pende D, et al. NK cell-mediated lysis of autologous antigen-presenting cells is triggered by the engagement of the phosphatidylinositol 3-kinase upon ligation of the natural cytotoxicity receptors NKp30 and NKp46. *Eur J Immunol.* 2001;31:1656-1665.
89. Poggi A, Zocchi MR. Human natural killer lymphocytes through the engagement of natural cytotoxicity receptors and NKG2D can trigger self-aggression. *Autoimmun Rev.* 2007;6:295-299.
90. Warrington KJ, Takemura S, Goronzy JJ, Weyand CM. CD4+,CD28- T cells in rheumatoid arthritis patients combine features of the innate and adaptive immune systems. *Arthritis Rheum.* 2001;44:13-20.
91. Hue S, Mention JJ, Monteiro RC, et al. A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease. *Immunity.* 2004;21:367-377.
92. Ribatti D. The discovery of endothelial progenitor cells. An historical review. *Leuk Res.* 2007;31:439-444.
93. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 1997;275:964-967.
94. Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:1185-1189.
95. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood.* 2000;95:952-958.
96. Murayama T, Asahara T. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells for vascular regeneration. *Curr Opin Mol Ther.* 2002;4:395-402.
97. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res.* 2004;95:343-353.
98. Nishimura H, Asahara T. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascular formation. *Exs.* 2005:147-154.
99. Gehling UM, Ergun S, Schumacher U, et al. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood.* 2000;95:3106-3112.
100. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med.* 2001;7:430-436.

101. Schmeisser A, Garlichs CD, Zhang H, et al. Monocytes coexpress endothelial and macrophagocytic lineage markers and form cord-like structures in Matrigel under angiogenic conditions. *Cardiovasc Res.* 2001;49:671-680.
102. Hur J, Yoon CH, Kim HS, et al. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovascuogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:288-293.
103. Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie CM. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest.* 2002;109:337-346.
104. Al-Khaldi A, Eliopoulos N, Martineau D, Lejeune L, Lachapelle K, Galipeau J. Postnatal bone marrow stromal cells elicit a potent VEGF-dependent neoangiogenic response in vivo. *Gene Ther.* 2003;10:621-629.
105. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell.* 2003;114:763-776.
106. Muller P, Beltrami AP, Cesselli D, Pfeiffer P, Kazakov A, Bohm M. Myocardial regeneration by endogenous adult progenitor cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2005;39:377-387.
107. Leor J, Guetta E, Feinberg MS, et al. Human umbilical cord blood-derived CD133+ cells enhance function and repair of the infarcted myocardium. *Stem Cells.* 2006;24:772-780.
108. Miller-Kasprzak E, Jagodzinski PP. Endothelial progenitor cells as a new agent contributing to vascular repair. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2007;55:247-259.
109. Khan SS, Solomon MA, McCoy JP, Jr. Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom.* 2005;64:1-8.
110. Tiwari A, Hamilton G, Seifalian AM, Lowdell MW, O'Neill E. Regarding "Isolation of endothelial cells and their progenitor cells from human peripheral blood". *J Vasc Surg.* 2002;35:827; author reply 827-828.
111. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, et al. Vascular endothelial growth factor(165) gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects. *Circ Res.* 2000;86:1198-1202.
112. Campioni D, Lo Monaco A, Lanza F, et al. CXCR4 pos circulating progenitor cells coexpressing monocytic and endothelial markers correlating with fibrotic clinical features are present in the peripheral blood of patients affected by systemic sclerosis. *Haematologica.* 2008;93:1233-1237.
113. Masuda H, Kalka C, Takahashi T, et al. Estrogen-mediated endothelial progenitor cell biology and kinetics for physiological postnatal vasculogenesis. *Circ Res.* 2007;101:598-606.
114. Wolk R, Deb A, Caplice NM, Somers VK. Leptin receptor and functional effects of leptin in human endothelial progenitor cells. *Atherosclerosis.* 2005;183:131-139.
115. Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, et al. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *J Clin Invest.* 2001;108:391-397.
116. de Groot K, Bahlmann FH, Sowa J, et al. Uremia causes endothelial progenitor cell deficiency. *Kidney Int.* 2004;66:641-646.

117. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med.* 2003;348:593-600.
118. Shintani S, Murohara T, Ikeda H, et al. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation.* 2001;103:2776-2779.
119. Gill M, Dias S, Hattori K, et al. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)AC133(+) endothelial precursor cells. *Circ Res.* 2001;88:167-174.
120. Krankel N, Adams V, Linke A, et al. Hyperglycemia reduces survival and impairs function of circulating blood-derived progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:698-703.
121. Pistrosch F, Herbrig K, Oelschlaegel U, et al. PPARgamma-agonist rosiglitazone increases number and migratory activity of cultured endothelial progenitor cells. *Atherosclerosis.* 2005;183:163-167.
122. Fadini GP, Agostini C, Avogaro A. Endothelial progenitor cells and vascular biology in diabetes mellitus: current knowledge and future perspectives. *Curr Diabetes Rev.* 2005;1:41-58.
123. Avogaro A, Fadini GP, Gallo A, Pagnin E, de Kreutzenberg S. Endothelial dysfunction in type 2 diabetes mellitus. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2006;16 Suppl 1:S39-45.
124. Grisar J, Aletaha D, Steiner CW, et al. Depletion of endothelial progenitor cells in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Circulation.* 2005;111:204-211.
125. Herbrig K, Haensel S, Oelschlaegel U, Pistrosch F, Foerster S, Passauer J. Endothelial dysfunction in patients with rheumatoid arthritis is associated with a reduced number and impaired function of endothelial progenitor cells. *Ann Rheum Dis.* 2006;65:157-163.
126. Kuwana M, Okazaki Y, Yasuoka H, Kawakami Y, Ikeda Y. Defective vasculogenesis in systemic sclerosis. *Lancet.* 2004;364:603-610.
127. Distler JH, Gay S, Distler O. Angiogenesis and vasculogenesis in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford).* 2006;45 Suppl 3:iii26-27.
128. Del Papa N, Colombo G, Fracchiolla N, et al. Circulating endothelial cells as a marker of ongoing vascular disease in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2004;50:1296-1304.
129. Del Papa N, Quirici N, Soligo D, et al. Bone marrow endothelial progenitors are defective in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2006;54:2605-2615.
130. Cipriani P, Guiducci S, Miniati I, et al. Impairment of endothelial cell differentiation from bone marrow-derived mesenchymal stem cells: new insight into the pathogenesis of systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2007;56:1994-2004.
131. Xie Y, Zhang X, Wakasugi S, Makino T, Inoue Y, Ihn H. Immunohistochemical characterization of the cellular infiltrate in localized scleroderma. *Int J Dermatol.* 2008;47:438-442.
132. Prescott RJ, Freemont AJ, Jones CJ, Hoyland J, Fielding P. Sequential dermal microvascular and perivascular changes in the development of scleroderma. *J Pathol.* 1992;166:255-263.

133. Freundlich B, Jimenez SA. Phenotype of peripheral blood lymphocytes in patients with progressive systemic sclerosis: activated T lymphocytes and the effect of D-penicillamine therapy. *Clin Exp Immunol.* 1987;69:375-384.
134. Fiocco U, Rosada M, Cozzi L, et al. Early phenotypic activation of circulating helper memory T cells in scleroderma: correlation with disease activity. *Ann Rheum Dis.* 1993;52:272-277.
135. Tedder TF, Inaoki M, Sato S. The CD19-CD21 complex regulates signal transduction thresholds governing humoral immunity and autoimmunity. *Immunity.* 1997;6:107-118.
136. Sato S, Fujimoto M, Hasegawa M, Takehara K, Tedder TF. Altered B lymphocyte function induces systemic autoimmunity in systemic sclerosis. *Mol Immunol.* 2004;41:1123-1133.
137. Grazia Cifone M, Giacomelli R, Famularo G, et al. Natural killer activity and antibody-dependent cellular cytotoxicity in progressive systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol.* 1990;80:360-365.
138. Majewski S, Blaszczyk M, Wasik M, Jablonska S. Natural killer cell activity of peripheral blood mononuclear cells from patients with various forms of systemic scleroderma. *Br J Dermatol.* 1987;116:1-8.
139. Wanchu A, Singh VK, Yadav VS, Biswas S, Misra R, Agarwal SS. Lack of natural killer cell augmentation in vitro by human interferon gamma in a subset of patients with systemic sclerosis. *Pathobiology.* 1995;63:288-292.
140. Schrambach S, Ardizzone M, Leymarie V, Sibia J, Bahram S. In vivo expression pattern of MICA and MICB and its relevance to auto-immunity and cancer. *PLoS ONE.* 2007;2:e518.
141. Yen JH, Moore BE, Nakajima T, et al. Major histocompatibility complex class I-recognizing receptors are disease risk genes in rheumatoid arthritis. *J Exp Med.* 2001;193:1159-1167.
142. Martin MP, Nelson G, Lee JH, et al. Cutting edge: susceptibility to psoriatic arthritis: influence of activating killer Ig-like receptor genes in the absence of specific HLA-C alleles. *J Immunol.* 2002;169:2818-2822.
143. Guma M, Angulo A, Vilches C, Gomez-Lozano N, Malats N, Lopez-Botet M. Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire. *Blood.* 2004;104:3664-3671.
144. Guma M, Budt M, Saez A, et al. Expansion of CD94/NKG2C+ NK cells in response to human cytomegalovirus-infected fibroblasts. *Blood.* 2006;107:3624-3631.
145. Hammond KJ, Godfrey DI. NKT cells: potential targets for autoimmune disease therapy? *Tissue Antigens.* 2002;59:353-363.
146. Linsen L, Somers V, Stinissen P. Immunoregulation of autoimmunity by natural killer T cells. *Hum Immunol.* 2005;66:1193-1202.
147. George J, Shmilovich H, Deutsch V, Miller H, Keren G, Roth A. Comparative analysis of methods for assessment of circulating endothelial progenitor cells. *Tissue Eng.* 2006;12:331-335.
148. Leor J, Marber M. Endothelial progenitors: a new Tower of Babel? *J Am Coll Cardiol.* 2006;48:1588-1590.
149. Gomer RH. Circulating progenitor cells and scleroderma. *Curr Rheumatol Rep.* 2008;10:183-188.

