UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Corso di Laurea in Medicina e Chirurgia

UN NUOVO MODELLO SPERIMENTALE DI PATOGENESI VIRALE DELLA SCLEROSI SISTEMICA

Relatore: Chiar.mo
Prof. Gianluca Moroncini

Tesi di Laurea di:
Margherita Prior

A.A. 2019/2020

"*Living is easy with eyes closed*

Misunderstanding all you see

It's getting hard to be someone

But it all works out

It doesn't matter much to me"

The Beatles

INDICE

INDICE **3**

INTRODUZIONE 4

Sclerosi sistemica *4*

Definizione 4

Epidemiologia 4

Quadro Clinico 5

Lesioni anatomopatologiche 13

Patogenesi 14

PDGF/PDGFR *24*

Recettore del PDGF 25

Ruolo del PDGF nella sclerodermia 27

Autoanticorpi monoclonali umani ricombinanti anti- PDGFRα 28

Eziologia *32*

Ipotesi virale *34*

Virus e autoimmunità 34

Virus e sclerodermia 41

AAV5 ..... *45*

AAV5 e PDGFRα *47*

Modelli animali sperimentali *49*

Generazione di un nuovo modello murino sperimentale di fibrosi cutanea *51*

OBIETTIVO 52

MATERIALI E METODI 53

Modello murino *53*

Iniezione endovenosa di AAV5 ..... *54*

Analisi istologica *55*

Score istologico di infiammazione polmonare *56*

Determinazione dell'espressione genica di collagene nella cute e nei polmoni di topo mediante RT-PCR quantitativa *57*

Analisi statistica *57*

RISULTATI 59

Induzione di fibrosi mediante somministrazione endovenosa di Virus Adeno-Associato 5 (AAV5) *59*

Cute 59

Polmoni 61

DISCUSSIONE 71

BIBLIOGRAFIA 72

INTRODUZIONE

Sclerosi sistemica

Definizione

La sclerosi sistemica (SSc) o sclerodermia è una malattia autoimmune cronica caratterizzata da un processo di fibrosi progressiva risultante dall'eccessiva deposizione di componenti della matrice extracellulare in diversi tessuti e organi. Il danno vascolare, l'infiammazione e la presenza di specifici autoanticorpi sono ulteriori caratteristiche tipiche di questa patologia (Furue et al, 2017).

Epidemiologia

Gli studi epidemiologici nell'ambito della sclerosi sistemica sono scarsi e caratterizzati da una grande variabilità nelle stime di prevalenza e incidenza.

Questo è dovuto sia alla rarità della malattia, sia all'evoluzione dei criteri di classificazione nel corso del tempo. I tassi complessivi per quanto riguarda l'incidenza variano globalmente da 8 a 56 nuovi casi / milione / anno. La prevalenza da quanto emerge nelle recenti relazioni è compresa tra 38 e 341 casi / milione totali, si può notare che è in costante aumento nel tempo, e questo è da attribuirsi al miglioramento finora significativo della sopravvivenza. I tassi di incidenza e prevalenza più alti si possono osservare in Europa, seguono Nord America, Centro e Sud America mentre i tassi più bassi si hanno in Asia (Ingegnoli et al, 2018).

Nell'Europa meridionale, l'incidenza segnalata è leggermente aumentata nei due decenni precedenti e successivi al 2000 (11-23 rispetto a 19-43 nuovi casi / milione / anno, rispettivamente) (Meier et al, 2012).

Colpisce con maggiore frequenza la fascia d'età compresa tra i 30 e i 50 anni (Black et al, 1984), con una prevalenza nel sesso femminile (F:M=8-9:1). (Freire et al, 2017).

Per quanto riguarda la diffusione della malattia in Italia, l'ultimo studio effettuato ci riporta un tasso di prevalenza di 34,1 casi per 100.000 e un tasso di incidenza annuale di 4,3 per 100.000. (criteri LeRoy e Medsger, 2001) (Lo Monaco et al, 2011).

La sclerosi sistemica può anche associarsi ad altre patologie reumatologiche: il 6,8% dei soggetti è per esempio affetto anche da Lupus Eritematoso Sistemico (LES) e questi pazienti sviluppano prima la malattia.

Al momento della diagnosi i pazienti che presentano altre malattie reumatologiche associate hanno un'età media di 37,9 anni mentre i pazienti affetti solo da SSc hanno un'età media di 47,9 anni.
È stato dimostrato inoltre che coloro che sono affetti da più patologie reumatologiche sviluppano più frequentemente l'ipertensione arteriosa polmonare (PAH) (Alharbi et al, 2018).
Vi è una correlazione anche con ipotiroidismo e ipertiroidismo, infatti la prevalenza di queste condizioni nei pazienti affetti da SSc risulta maggiore di quella nella popolazione generale (Arora-Singh et al, 2010).

Quadro Clinico

La sclerosi sistemica colpisce cute ed organi interni, come polmoni, cuore, reni, sistema muscoloscheletrico e tratto gastrointestinale. La sclerosi cutanea è un sintomo principale della SSc, che viene valutato utilizzando il Rodnan skin score modificato (mRss), ed è anche un marker di attività di malattia facilmente rilevabile (Clements et al, 2000).
Le manifestazioni cliniche della SSc sono espressione della vasculopatia, della fibrosi e dell'atrofia dei parenchimi colpiti. In alcuni pazienti sono presenti manifestazioni generali quali astenia, facile affaticabilità, depressione reattiva alle modifiche estetiche dovute alla malattia, calo ponderale (nei casi con sindrome da malassorbimento e in quelli con miosite). La febbre è rara. (Unireuma, 2016)

Si distinguono tre forme cliniche di sclerosi sistemica:

- La *sclerosi sistemica cutanea limitata (lcSSc)*, nella quale sono prevalentemente interessati i siti acrali in modo simmetrico e il viso. Il coinvolgimento degli organi interni avviene in modo ritardato e si manifesta clinicamente solo dopo anni o decenni. Il fenomeno di Raynaud si manifesta precocemente mentre la sclerosi cutanea periferica non prima della quarta o quinta decade di vita (Kowal-Bielecka et al, 2016; Barsotti et al, 2014; Harrison's).

  Dal punto di vista sierologico si caratterizza per una positività degli anticorpi anti-centromero nel 70-80% dei pazienti, mentre alla capillaroscopia si evidenziano dilatazioni delle anse capillari, in assenza di perdita degli stessi. Generalmente questa forma ha una prognosi migliore. L'acronimo CREST (calcinosi, fenomeno di Raynaud, coinvolgimento esofageo, sclerodattilia e teleangectasie e tipicamente associata agli

anticorpi anti-centromero) è in parte obsoleto e non appartiene a un gruppo specifico della patologia. (Harrison's)

- La *sclerosi sistemica cutanea diffusa (dcSSc)* è spesso rapidamente progressiva. La comparsa del fenomeno di Raynaud precede di poco il resto della clinica o è contemporaneo ad essa. Qui si trova un edema compatto principalmente del tronco e prossimalmente a gomiti e ginocchia. Il coinvolgimento degli organi interni è rapido ed esteso (Kowal-Bielecka et al, 2016; Barsotti et al, 2014; Harrison's). La fibrosi polmonare è tipica in questa forma. Si osserva più frequentemente negli uomini. Caratteristica è la presenza di positività degli anticorpi anti- topoisomerasi I ed il riscontro capillaroscopico di dilatazione e rarefazione dei capillari periungueali (Harrison's).
- La *sclerosi sistemica sine scleroderma* (5%) è caratterizzata da un variabile coinvolgimento viscerale in assenza di sclerosi cutanea. In tale variante il fenomeno di Raynaud può essere più o meno presente e la sierologia immunitaria può risultare positiva sia per gli anticorpi anti- topoisomerasi I che per gli anticorpi anti-centromero (Kucharz et al, 2017; Harrison's).

Fenomeno di Raynaud

Il fenomeno di Raynaud è presente nella quasi totalità dei pazienti e rappresenta in circa l'80% dei casi (nel l00% dei pazienti di lcSSc) la manifestazione di esordio della malattia. Il Raynaud sclerodermico è più frequentemente bi- o trifasico (fase ischemica e cianotica con o senza la fase iperemica reattiva) (**figura 1**) e condiziona quasi sempre l'insorgenza di alterazioni trofiche ai polpastrelli (necrosi, escare, ulcere) e di cicatrici residue (cosiddette "a morso di ratto") (**figura 2**).

Cute

FIGURA 1
Fasi del fenomeno di Raynaud
(fonte: http://www.chirurgiatoracica.info/images/Raynauds_Syndrome.jpg)

FIGURA 2
ulcere digitali tipiche della SSc
(fonte: https://www.sclerodermia.net/ulcere-sclerodermiche)

Si distinguono classicamente tre fasi evolutive dell'interessamento cutaneo: edematosa, indurativa o sclerotica e atrofica. In una piccola percentuale di pazienti, la sclerosi cutanea è assente, realizzandosi un quadro di SSc sine scleroderma.

Lo *stadio edematoso* non è evidente in tutti i pazienti. Occorre, essenzialmente, in pazienti con dcSSc all'esordio. Il paziente avverte una sensazione di impaccio al movimento, tipicamente delle mani, che si presentano tumefatte ("puffy").

Nella *fase sclerotica* il reperto è tipico. La cute è aumentata di consistenza, tesa, aderente ai piani sottostanti, a tratti lucida. I peli sono diradati o assenti, il volto è amimico, le labbra sono assottigliate (microcheilia), l'apertura della rima orale è ridotta (microstomia) (**figura 3**).

FIGURA 3
microstomia, riduzione della rima orale
(fonte: http://www.unige.ch/cyberdocuments/theses2002/meiriSD/these_body.html)

L'aderenza della cute ai tessuti sottostanti nelle regioni articolari e periarticolari è causa di contratture in flessione alle mani (aspetto ad "artiglio"), ai gomiti ecc. In questi distretti la pressione esercitata dall'osso sottostante sulla cute tesa, con l'eventuale intervento di traumi, può determinare la comparsa di soluzioni di continuo, che possono andare incontro a sovrainfezioni.
La fase *atrofica* tardiva si accompagna a lassità, fragilità e diminuzione di consistenza della cute, che appare assottigliata e aderente ai tessuti sottostanti.
Altre manifestazioni cutanee della SSc sono le alterazioni pigmentarie (melanodermia e pseudovitiligo), caratteristiche della dcSSc, le teleangectasie e le calcificazioni intra- e sotto-cutanee (**figura 4**) più frequenti e vistose nella lcSSc, ma non esclusive di questo sottogruppo.
L'entità e l'estensione della sclerosi variano da paziente a paziente (anche nell'ambito dello stesso subset) e nello stesso paziente in fasi diverse del processo. Sono stati elaborati alcuni sistemi per valutare in modo semiquantitativo l'entità della sclerosi cutanea ("score" di sclerosi), il più utilizzato dei quali è il cosiddetto *Rodnan skin score modificato*

(mRss), che si fonda sulla valutazione dell'ispessimento della cute su una scala da 0 a 3, in 17 distretti (**figura 5**). La valutazione di questo score nel tempo, soprattutto in pazienti con dcSSc in fase precoce (< 3 anni), è utile per seguire l'andamento della malattia e la risposta ad eventuali terapie.

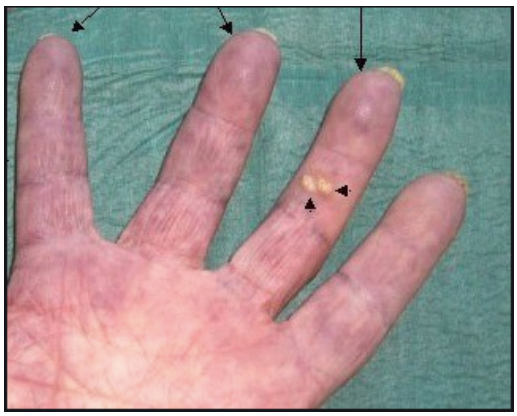
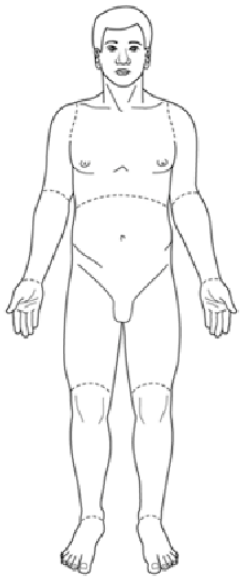


FIGURA 4
Calcificazioni cutanee (punta di freccia)
(fonte: https://www.sclerodermia.net/ulcere-sclerodermiche)

Date of Examination: _____



	Right				Left			
Fingers	0☐	1☐	2☐	3☐	0☐	1☐	2☐	3☐
Hands	0☐	1☐	2☐	3☐	0☐	1☐	2☐	3☐
Forearms	0☐	1☐	2☐	3☐	0☐	1☐	2☐	3☐
Upper Arms	0☐	1☐	2☐	3☐	0☐	1☐	2☐	3☐
Face			0☐	1☐	2☐	3☐		
Anterior Chest			0☐	1☐	2☐	3☐		
Abdomen			0☐	1☐	2☐	3☐		
Thighs	0☐	1☐	2☐	3☐	0☐	1☐	2☐	3☐
Legs	0☐	1☐	2☐	3☐	0☐	1☐	2☐	3☐
Feet	0☐	1☐	2☐	3☐	0☐	1☐	2☐	3☐
Column Totals								
Total:								
Key:	*0 – No Thickening*		*1 – Mild Thickening*		*2 – Moderate Thickening*		*3 – Severe Thickening*	
Notes:								

Examiner:
Printed Name: _____
Signature: _____ Date: _____

FIGURA 5
Rodnan skin score modificato (mRss)

Apparato respiratorio

L'impegno *polmonare* si manifesta con due quadri polmonari distinti ed indipendenti, che possono o meno coesistere. In un'alta percentuale di pazienti (70% circa) si realizza una *interstiziopatia infiammatoria*, frequentemente caratterizzata da un substrato tipo *NSIP* (non specific interstitial pneumonia i.e. lesioni infiammatorie o fibrotiche nella stessa fase evolutiva con distribuzione a chiazze o diffusa); meno frequentemente UIP (usual interstitial pneumonia i.e. coesistenza di lesioni a diverso stadio evolutivo- infiammazione, fibrosi, fibrosi a nido d'ape, foci di fibroblasti- alternate a zone di parenchima normale) o, ancora più raramente con altri substrati, prevalente a livello dei campi polmonari inferiori, ad evoluzione fibrotica. Nel 10% circa dei pazienti di lcSSc, a 10-20 anni dall'esordio della malattia, e in alcuni pazienti di dcSSc, in cui sono evidenziabili nel siero anticorpi antifibrillarina, si realizza un'*ipertensione arteriosa polmonare* (PAH) da vasculopatia delle arterie polmonari di piccolo e medio calibro.

L'interstiziopatia sul piano clinico si esprime nel 60% dei casi, con la comparsa di dispnea da sforzo, meno frequentemente di dispnea a riposo e nel 40% circa dei casi con il reperto, all'esame obiettivo, di crepitii basali bilaterali. La radiografia del torace mette in evidenza una fibrosi bibasale in circa il 40% dei casi. Le prove di funzionalità respiratoria mettono in luce una sindrome disventilatoria restrittiva [i.e. diminuzione consensuale della capacità polmonare totale (TLC), della capacità vitale forzata (FVC), del flusso espiratorio forzato al primo secondo (FEVl), del volume residuo (RV) e della diffusione alveolo-capillare del CO (DLCO)] in circa il 50-60% dei casi. La Tomografia Computerizzata (TC) del torace ad alta risoluzione delinea la presenza (in percentuali fino al 90%) e l'estensione di 3 ordini di reperti fondamentali (vetro smerigliato suggestivo di alveolite attiva, ma consistente anche con fibrosi lieve; fibrosi ad aspetto lineare reticolare; fibrosi a nido d'ape) e permette di distinguere i 2 pattern principali di interstiziopatia. L'esame del liquido di lavaggio broncoalveolare (BAL) precisa la presenza di un processo infiammatorio e ne caratterizza la natura (alveolite eosinofila, neutrofila, linfocitaria, le prime 2 ad evoluzione più severa). La biopsia del polmone costituisce il gold standard per la valutazione del processo infiammatorio. Essa deve essere, però, eseguita solo in casi particolari (sospetto di varietà cosiddetta "bronchiolite obliterante, polmonite organizzata") e per motivi di studio.

L'ipertensione arteriosa polmonare si rende evidente con una dispnea severa progressiva, che evolve in un quadro clinico di scompenso cardiaco congestizio destro a rapida evoluzione verso l'exitus (intorno ai 2 anni dall'insorgenza dei sintomi, nei pazienti non

trattati). Questa condizione va sospettata in caso di sintomi (la già citata dispnea), segni (rinforzo del II tono sul focolaio della polmonare), reperti ecografici (deviazione assiale dx, P polmonare), funzionali (DLCO< 55% del valore predetto associata a TLC o FVC normali). La diagnosi si fonda sul cateterismo cardiaco che mette in evidenza un'ipertensione precapillare (pressione arteriosa polmonare media ≥ 25 mmHg; pressione capillare a catetere bloccato < l 5 mmHg) e permette di escludere l'ipertensione polmonare post-capillare da cardiopatia sinistra. Nei pazienti con fibrosi interstiziale estesa si realizza una PAH precapillare secondaria, fisiopatologicamente distinta dal quadro appena descritto, che peggiora la prognosi dell'interstiziopatia.
Va considerata, infine, la possibile occorrenza di pleurite secca o essudativa, clinicamente evidente nel 15% dei pazienti.

Apparato gastroenterico

L'apparato gastroenterico, in particolare l'esofago, è il distretto viscerale più frequentemente colpito dalla SSc (90%) e va incontro sul piano morfofunzionale a tre fasi sequenziali:
neuropatia autonomica (da vasculopatia);
fibrosi sostitutiva (in particolare della tunica muscolare);
atrofia della parete.
Le manifestazioni a carico di questo apparato sono diverse come pirosi retrosternale da esofagopatia, dilatazione gastrica, ipomotilità intestinale fino a prolassi rettali.

Cuore

La *cardiopatia sclerodermica* è distinta in primitiva e secondaria. Sono primitive le manifestazioni correlate all'interessamento diretto del tessuto cardiaco. Sono secondarie quelle condizioni conseguenti ad un impegno primitivamente extracardiaco (polmonare o renale).
La *pericardite* può essere acuta o cronica essudativa.
L'interessamento del *miocardio* è caratterizzato da fibrosi a carico di entrambi i ventricoli, sostenuta sia da accumulo di collagene nell'interstizio sia dalla vasculopatia delle piccole arterie coronarie intramiocardiche.

Possono essere utili indagini come ECG, ECG Holter, EcoDoppler cardiaco standard, Doppler tissutale pulsato, scintigrafia miocardica, RM (unica indagine adatta a quantizzare la fibrosi miocardica e permette di valutare anche la perfusione).

Rene

La *nefropatia sclerodermica* si esprime essenzialmente con la cosiddetta "crisi renale sclerodermica" o "ipertensione maligna sclerodermica" caratterizzata da insufficienza renale ingravescente ad esordio brusco associata quasi sempre ad ipertensione accelerata o maligna, disturbi visivi da retinopatia ipertensiva, cefalea e possibile sviluppo di ictus cerebrale o edema polmonare acuto. In alcuni casi sono presenti anemia emolitica microangiopatica e piastrinopenia da coagulazione intravascolare. L'esame delle urine mette in evidenza inizialmente la presenza di proteinuria, microematuria e cilindruria. Con il progredire dell'insufficienza renale il paziente non trattato va incontro ad oliguria ed anuria. Un reperto costante è costituito dall'aumento notevole dell'attività reninica plasmatica.

Articolazioni e tendini

L*'artropatia* è una manifestazione molto frequente della SSc (80-90%) e può rappresentare in alcuni casi la manifestazione di esordio della malattia. Il quadro nel l0% dei casi è quello di una poliartrite simmetrica simil-reumatoide, spesso associata a sindrome del tunnel carpale. Più frequentemente, si tratta di poliartralgie con o senza rigidità o di sola rigidità articolare.

La *sinovite sclerodermica* è caratterizzata da infiltrazione infiammatoria mononucleare, diffusa o sotto forma di aggregati, e da depositi di fibrina sulla superficie della membrana sinoviale. Sono stati identificati *3 pattern* mutuamente escludentisi (infiammatorio-similreumatoide, degenerativo-similartrosico e fibrotico periarticolare). La palpazione dei tendini dei polsi, delle caviglie e in altre sedi permette, in alcuni pazienti di dcSSc, di apprezzare sfregamenti patognomonici.

Osso

Il reperto più caratteristico è costituito dalle *acroosteolisi* delle falangi distali su base ischemica. È descritta un'aumentata incidenza di osteoporosi associata a deficit di vitamina D, molto frequente nella SSc.

Muscoli

Si possono realizzare tre tipi di miopatia:

l) *miopatia da disuso*, che si esprime solo con lieve astenia muscolare;

2) *miopatia primitiva*, caratterizzata da astenia muscolare prossimale e da elevazione lieve degli enzimi muscolari (creatinchinasi, latticodeidrogenasi);

3) *polimiosite in overlap*. Quest'ultima è associata alla presenza nel siero di anticorpi specifici, cosiddetti anti-Pm-Scl.

Nel secondo tipo l'esame elettromiografico evidenzia la presenza di potenziali polifasici, ma non segni di denervazione (tipici della polimiosite); l'esame istopatologica mostra un processo infiammatorio con infiltrato di cellule mononucleari associato a reperti di fibrosi perimisiale, epimisiale ed endomisiale. (Unireuma, 2016)

Neoplasie

Le più recenti meta-analisi hanno mostrato che, rispetto alla popolazione generale, il rischio relativo (RR) di sviluppare qualsiasi tumore invasivo nei pazienti con SSc è 1.41-1.75, mentre il rischio relativo per il cancro del *polmone* è 4.35 e per le neoplasie *ematologiche* 2.24 (Bonifazi et al, 2013).

Altre manifestazioni

Nei pazienti affetti da sclerosi sistemica è possibile riscontrare *xerostomia* e/o *xeroftalmia*, insieme ad altre manifestazioni autoimmunitarie come *l'ipotiroidismo* e la *cirrosi biliare primitiva*. Anche la funzione sessuale è spesso compromessa nella sclerodermia indipendentemente dal sesso: fino all'80% dei pazienti maschi riportano *disfunzione erettile*, mentre i cambiamenti fisici generali e del tratto genitale sono i principali fattori che contribuiscono alla *disfunzione sessuale* nelle donne. *Depressione* e *ansia* sono state riscontrate nel 17%-69% dei pazienti e sono spesso correlate a dolore, affaticamento, disabilità e cambiamenti corporei (Ingegnoli et al, 2018).

Lesioni anatomopatologiche

Le lesioni tissutali precoci più importanti nella sclerodermia sono la *microangiopatia* e gli *infiltrati di cellule mononucleate*. Nelle fasi successive invece le alterazioni principali sono gli *accumuli* molto densi di *collagene nel derma*, la *perdita di cellule* e *l'atrofia*.

Il danno vascolare è soprattutto a carico delle arteriole e si verifica in quasi tutti gli organi. Questo danno consiste nell'aumento dello spazio tra le cellule endoteliali e nelle alterazioni delle cellule endoteliali come: vacuolizzazione del citoplasma, apoptosi e cambiamento del fenotipo in assenza di proliferazione. Inoltre, ci sono infiltrati perivascolari di cellule immunitarie mononucleate (con pochi linfociti). La fibrosi sostituisce gradualmente la fase infiammatoria, in questa fase oltre all'eccessiva deposizione di matrice extracellulare (ECM) si osserva anche la rarefazione delle strutture capillari, la proliferazione concentrica dell'intima, l'iperplasia della media e la stenosi e occlusione trombotica o fibrotica del lume vascolare. La progressiva regressione dei capillari fino alla loro completa scomparsa è verosimilmente giustificata da un'aumentata apoptosi della cellula endoteliale sclerodermica.

I periciti hanno il potenziale di differenziare in cellule muscolari lisce vascolari, fibroblasti e miofibroblasti e influenzare la proliferazione delle cellule endoteliali. Nelle lesioni precoci della sclerodermia i periciti sovraesprimono diversi recettori delle citochine compreso il recettore del PDGF (PDGFR). Queste cellule insieme alle cellule muscolari lisce proliferano e contribuiscono ad aumentare lo spessore delle pareti.

I fibroblasti sono i responsabili della produzione, deposizione e rimodellamento del collagene e degli altri componenti della matrice extracellulare come la fibronectina e fibrillina. La sovraproduzione del collagene nella sclerosi sistemica avviene a causa di una maggiore trascrizione o maggiore stabilità del mRNA del collagene nei fibroblasti, questi mantengono questa anomalia anche *in vitro* autonomamente su più passaggi. Inoltre, alcuni fibroblasti possono convertirsi in miofibroblasti che sovraesprimono diverse citochine come il TGF-β e il suo recettore. La disposizione macromolecolare del collagene nella sclerodermia è caratterizzata da legami incrociati che si verificano fisiologicamente nella matrice ossea ma non nella cute, questi legami crociati sono formati dalla lisil-idrossilasi 2, il cui livello è aumentato nella sclerodermia.

La fibrosi della cute inizia nel derma inferiore e nello strato sottocutaneo superiore e si verifica insieme alla rarefazione del microcircolo. La composizione della matrice varia nel corso della patologia, si riscontrano inizialmente una miscela di diversi tipi di

collagene, proteoglicani, e le fibre elastiche compresa la fibrillina, mentre il collagene di tipo I si accumula nelle fasi successive.
Gli infiltrati cellulari della sclerodermia sono costituiti principalmente da linfociti T, macrofagi, linfociti B (anche CD20+) e mastociti. I linfociti T nelle lesioni cutanee sono prevalentemente CD4 + Th2. I linfociti B possono contribuire alla patogenesi della fibrosi attraverso la secrezione di interleuchina-6 (IL-6) e TGF-β e la produzione di autoanticorpi (Gabrielli et al, 2009a).

Patogenesi

Nella patogenesi della sclerosi sistemica sembrano centrali: il danno vascolare, un'anomala attivazione del sistema immunitario, un'eccessiva deposizione di collagene da parte di fibroblasti attivati e la presenza di radicali liberi dell'ossigeno (ROS) che causano stress ossidativo (Pattanaik et al, 2015)

Danno microvascolare e SSc

Il *danno microvascolare* e *l'attivazione dell'endotelio* sono molto probabilmente gli eventi iniziali della SSc.
Nella SSc è stata dimostrata una iperreattività immunitaria nei confronti della membrana basale, soprattutto verso il collagene IV e la laminina. (Gabrielli et al, 1988).
Le cellule endoteliali sono particolarmente sensibili all'azione tossica dei ROS poiché sono prive della catalasi13 (Biondi et al, 2008).
Le chemochine e le molecole di adesione contribuiscono a richiamare cellule nei tessuti colpiti, e fanno sì che il danno sia protratto e peggiori con un conseguente rilascio di fattori di crescita e proinfiammatori oltre a citochine, incluso TGF-β, il fattore di crescita connettivale (CTGF), il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF) e altre interleuchine. Il rilascio di citochine e la presenza di autoanticorpi attivi circolanti contribuiscono all'attivazione dei fibroblasti e/o delle cellule mesenchimali che si differenziano in miofibroblasti e sono responsabili della produzione e deposizione di eccessiva ECM. Questa deposizione è causa di un incremento di fibrosi e rigidità sia cutanea sia viscerale, e contribuisce all'aumento di morbilità e mortalità riportate nella SSc. (Svegliati et al, 2018)

Il Fenomeno di Raynaud (FR) è uno dei primi segni clinici osservati. È caratterizzato da episodi di ischemia delle dita indotti da basse temperature e da stress emotivo. È dovuto ad un vasospasmo delle arterie digitali, delle arteriole e delle anastomosi arterovenose. Questa alterazione microvascolare colpisce prevalentemente le dita di mani e piedi ma può colpire anche gli organi interni. Il Fenomeno di Raynaud è dovuto a una ipossia indotta dalla bassa temperatura ed è caratterizzata da 3 fasi: pallore (riduzione del flusso ematico), cianosi (ipossia tissutale) e rubor (da riperfusione) (Gabrielli et al, 2009a; Varga et al, 2007) e può correlare con la formazione di ulcere digitali (Svegliati et al, 2018).

Stress ossidativo e SSc

In una recente meta-analisi è stato dimostrato come i livelli ematici di molti markers di stress ossidativo, tra cui NO, malondialdeide, dimetilarginina asimmetrica e ROOH, erano superiori nei pazienti affetti da SSc, rispetto ai controlli; al contrario, i livelli di markers antiossidanti, come la superossido dismutasi e la vitamina C, risultavano inferiori nei pazienti sclerodermici, indicando un disequilibrio tra agenti ossidanti e antiossidanti. Gli autori tuttavia sottolineano i limiti del loro lavoro: l'impiego di diversi strumenti di analisi nei diversi studi; eterogeneità dei soggetti studiati in termini di durata di malattia, etnia, area geografica; assenza di studi controllati randomizzati; esclusione degli studi che non riportavano campioni ematici (Luo et al, 2017).

Approfondendo tali risultati sono stati indagati nei pazienti SSc altri campioni biologici per ricercare markers di stress ossidativo. Nell'aria espirata di pazienti SSc si sono riscontrati aumentati livelli di 8-isoprostano, un indicatore di un alterato stato ossidoriduttivo, e di perossido di idrogeno, tuttavia, per quando riguarda il primo, non vi era correlazione con i reperti radiologici (Tufvesson et al, 2010; Łuczyñska et al, 2003).

Nelle urine si sono riscontrati aumentati livelli di 8-Oxo-2'-deossiguanosina (8-oxodG) e isoprostani, prodotti *in vivo* dalla perossidazione dell'acido arachidonico catalizzata dai radicali liberi (Avouac et al, 2010; Cracowski et al, 2001).

È interessante notare che l'autofluorescenza cutanea, un metodo per la determinazione non invasiva dei prodotti finali della glicazione avanzata, ovvero un'evidenza indiretta di stress ossidativo, risulta aumentata nei pazienti con dcSSc rispetto ai pazienti presentanti fenomeno di Raynaud primario e rispetto ai controlli sani (Murray et al, 2012).

Inoltre, l'analisi proteomica delle biopsie cutanee dei pazienti con dcSSc ha rivelato un anomalo incremento di proteine coinvolte nella risposta allo stress ossidativo come la perossiredoxina 1 e la carbonil reduttasi I (Aden et al, 2008).

Modelli sperimentali di sclerosi sistemica sottolineano l'importanza dello stress ossidativo nella patogenesi del processo fibrotico e della sclerosi diffusa. Un anomalo metabolismo del monossido di azoto, espresso come una ridotta espressione della ossidonitrico sintetasi endoteliale (eNOS) ed una diminuita attività dell'ossidonitrico sintetasi (NOS), è stato dimostrato in modelli murini tigh-skin (TSK-1/+) di fibrosi (Dooley et al, 2008).

I radicali superossido e ossidrilici sono stati riprodotti nel modello di fibrosi indotto mediante somministrazione di bleomicina (Oberley et al, 1979), e la terapia antiossidante ha permesso un miglioramento della fibrosi dei tessuti in questi modelli animali, a supporto del ruolo dello stress ossidativo in tale modello sperimentale (Teixeira et al, 2008).

Servettaz et al. tuttavia hanno contribuito maggiormente allo studio del coinvolgimento dei ROS nella SSc. Nel loro studio trattando i topi BALB/c SCID con agenti inducenti ROS sono stati in grado di riprodurre i fenotipi clinici e sierologici di sclerosi sistemica. I perossinitriti hanno indotto la fibrosi cutanea e gli autoanticorpi anti-centromero (anti-CENP-B), come nella lcSSc, mentre l'ipoclorito o i radicali ossidrilici hanno indotto la fibrosi cutanea e polmonare e la produzione di autoanticorpi anti-topoisomerasi I, come nella dcSSc (Servettaz et al, 2009).

Meccanismi responsabili dell'aumento di stress ossidativo nella SSc

Gli eventi di ischemia-riperfusione sono stati considerati responsabili della generazione di stress ossidativo abnorme osservato nel fenomeno di Raynaud.

Tuttavia il loro contributo alla produzione di ROS è ancora controverso poiché:

- lo stress ossidativo anomalo non è stato dimostrato in pazienti con fenomeno di Raynaud primario (Bruckdorfer et al, 1995; Cracowski et al, 2006);
- nei pazienti con SSc manca una risposta attiva da parte delle cellule infiammatorie dopo riperfusione.

Resta da stabilire se queste discrepanze possano essere correlate alla natura cronica, piuttosto che acuta, degli eventi ischemici nel corso della SSc (Svegliati et al, 2018).

Cellule, citochine e fattori di crescita

In prelievi ematici da sangue periferico di pazienti sclerodermici sono stati prelevati *monociti* non stimolati che, una volta coltivati *in vitro*, hanno dimostrato rilasciare superossido, diversamente dai neutrofili. (Sambo et al, 1999). I monociti inoltre si infiltrano

nella cute dei soggetti affetti da SSc ed è ipotizzato che contribuiscano allo sviluppo della fibrosi (Higashi-Kuwata et al, 2010).

Al contrario Barnes et al. hanno dimostrato che i *neutrofili,* prelevati da sangue periferico di pazienti SSc, adeguatamente stimolati, producono un maggior quantitativo di ROS rispetto ai controlli (Barnes et al, 2012).
Secondo questi autori, i neutrofili SSc sono preparati per la generazione di ROS e sono quindi coinvolti nella disfunzione delle cellule endoteliali e nella fibrosi dei tessuti.

I *macrofagi M1* classicamente attivati causano un'abbondante reazione infiammatoria e danno tissutale, mentre i *macrofagi M2* sono di solito implicati nella riparazione delle ferite e nell'induzione della fibrosi. La presenza di entrambi, M1 e M2, è stata rilevata nel sangue periferico e in tessuti prelevati da pazienti SSc e sono probabilmente espressione di cambiamenti che avvengono nel tempo (Stifano et al, 2016) e, per inciso, NOX (NADPH ossidasi) 1 e 2 sono fondamentali per la differenziazione dei monociti in macrofagi, la polarizzazione del tipo profibrotico M2 ma non per il tipo M1(Xu et al, 2016).

Amico et al. hanno dimostrato che i *linfociti T* dei pazienti SSc sono caratterizzati da elevati livelli di ROS, generati dalla NOX, attraverso la fosforilazione delle chinasi regolate dal segnale extracellulare 1/2 (ERK1 / 2). I ROS sono essenziali per l'attivazione, la proliferazione e la produzione di citochine da parte dei linfociti, confermando il loro ruolo centrale nella patogenesi della SSc e suggerendo una correlazione tra ROS e attivazione di linfociti T (Amico et al, 2015).
I ROS sono spontaneamente prodotti *in vitro* dai fibroblasti sclerodermici tramite l'attivazione della NAPDH ossidasi e, agendo come molecole segnale, incrementano l'espressione dei geni del collagene di tipo 1 e dell'α-actina del muscolo liscio (α-SMA) (Sambo et al, 2001; Svegliati et al, 2005).

Inoltre, la produzione di *perossido di idrogeno* (H_2O_2) si è dimostrata più elevata nelle *cellule endoteliali* e nei *fibroblasti* incubati sia con campioni di siero SSc rispetto ai controlli sani, sia con campioni di siero di pazienti SSc con manifestazione grave della malattia rispetto ai sieri prelevati da altri pazienti (Servettaz et al, 2007).

Una moltitudine di citochine e fattori di crescita, implicati nella patogenesi della SSc che interagiscono con i loro recettori cellulari specifici, possono attivare la segnalazione intracellulare che porta alla generazione di ROS. A questo proposito, vale la pena menzionare *l'angiotensina II* (ATII), il *PDGF* e *TGF-β* che interagiscono con i membri della famiglia NOX nelle cellule muscolari lisce vascolari e nei fibroblasti cardiaci, polmonari e cutanei. Il TGF- β è un potente fattore di crescita profibrotico e risulta centrale nella patogenesi della fibrosi nella SSc tramite anche la generazione di ROS (Svegliati et al, 2014)

Il TGF-β incrementa la produzione di ROS in cellule non fagocitiche interagendo con serin/treonin kinasi accoppiate con NOX, modulando la funzione dei mitocondri e dei microsomi (Thannickal et al,1995; Albright et al, 2003) e sopprimendo l'espressione degli enzimi antiossidanti, comprese la catalasi, superossido dismutasi e glutatione perossidasi (Peltoniemi et al, 2004).

Inoltre, i ROS mitocondriali, generati dal complesso della catena di trasporto degli elettroni, sono richiesti per la trascrizione dei geni TGF- β mediata nei fibroblasti umani di polmoni sani e l'interruzione di questa produzione di ROS interrompe l'espressione del TGF- β profibrotico (Jain et al, 2013). Rispetto ai normali fibroblasti polmonari, i fibroblasti di pazienti con fibrosi polmonare stimolati con TGF-β hanno generato più ROS mitocondriali. Il blocco della produzione mitocondriale di ROS con specifici antiossidanti ha ridotto l'espressione genica mediata dal TGF-β.

VEGF, AT II e PDGF esprimono la loro azione ossidativa tramite recettori accoppiati a NOX4 (VEGF) e NOX1 e NOX2 (AT II e PDGF) (Datla et al, 2007).

NADPH ossidasi

Recenti studi sulla NADPH-ossidasi (NOX), una famiglia di 7 enzimi coinvolti nella produzione di ROS, hanno posto ulteriore attenzione sul ruolo dei radicali liberi e del NOX nella sclerosi sistemica e nei disordini fibrotici (Lambeth et al, 2016).

Il NADPH ossidasi gp91phox (NOX2) fagocitica è stato il primo tra i sistemi di generazione di ROS a essere identificato come una funzione cellulare primaria in risposta all'esposizione a microorganismi e ad agenti infiammatori, e non un semplice sottoprodotto (Sumimoto et al, 2008).

Durante gli anni ’90 osservazioni indipendenti hanno suggerito che sistemi enzimatici simili a NOX2 (phagocyte gp91phox) esistono in altri tipi di cellule, ad esempio nei fibroblasti e nelle cellule muscolari lisce vascolari. (Pendyala et al, 2010).

Per quanto riguarda i *meccanismi di attivazione*, l'espressione di NOX2 è inducibile in risposta a condizioni di stress o stimolazione del fattore di crescita (Jiang et al, 2014); l'espressione di NOX1 sembra essere costitutiva in una varietà di tessuti ed è indotta in alcune circostanze, come in presenza di PDGF o AT II nelle cellule muscolari lisce vascolari (Bedard et al, 2007); NOX4 risulta sovraespressa anche nei polmoni e nei reni fibrotici (Paik et al, 2014; Barnes et al, 2011) così come nei fibroblasti sclerodermici (Spadoni et al, 2015).
Infine la sovraespressione cellulare di NOX-2 e NOX-4 è stata documentata sia a livello di proteina sia di mRNA. Il trattamento di fibroblasti sclerodermici con diphenyleneiodonium (DPI), un inibitore non selettivo degli enzimi contenenti flavina, e il silenziamento di NOX2 e NOX4 diminuiscono la produzione di ROS e l’espressione di collagene di tipo 1 e di α -SMA. L'incubazione di fibroblasti di controllo sani con PDGF o con IgG purificate dal siero di pazienti con SSc ha migliorato l'espressione di mRNA di NOX2 e NOX4, tramite ROS, in modo tempo-dipendente. Pertanto, sia NOX2 che NOX4 contribuiscono alla generazione di ROS nei fibroblasti sclerodermici, svolgendo un ruolo fondamentale nell'attivazione cellulare. L'espressione di NOX-2 e NOX-4 nei fibroblasti sclerodermici è stata mantenuta da un loop mediato da ROS (Spadoni et al, 2015).

Effetti dello stress ossidativo sulla sclerosi sistemica

Gli agenti ossidanti possono attivare direttamente i fibroblasti o contribuire al mantenimento della fibrosi alterando l'equilibrio tra proteasi e attività anti-proteasi. Quest'ultimo meccanismo può essere particolarmente attivo e patofisiologicamente rilevante nel polmone, dove l'interruzione dell'architettura normale e la disorganizzazione della vascolarizzazione possono determinare eventi di ischemia-riperfusione localmente persistenti che possono propagare la lesione anche in assenza dell'insulto patogeno scatenante. (Svegliati et al, 2018)

Gli autoanticorpi anti-PDGFR rilevati nel siero dei pazienti con SSc sono agenti a lunga durata d'azione che stimolano il collagene e l'α-SMA tramite Ha-Ras / Erk nei normali fibroblasti cutanei. Una volta che la generazione di ROS supera la difesa antiossidante, i

fibroblasti subiscono apoptosi o senescenza, portando a deposizione di matrice extracellulare, fibrosi e, in definitiva, al declino degli organi.
Il perossido di idrogeno prodotto durante il burst ossidativo può diffondersi e attivare liberamente i fibroblasti e i vasi adiacenti che concorrono alla diffusione della malattia. È stato ipotizzato che la malattia possa diventare sistemica anche in assenza di una significativa produzione di autoanticorpi (Gabrielli et al, 2007a)

I radicali liberi possono stimolare l'espressione e la secrezione di TGF-β in molti tipi di cellule (Zhao et al, 2008) e mediare la differenziazione dei fibroblasti in miofibroblasti indotta dal TGF- β (Cucoranu et al, 2005), oltre a mediare attività pro-fibrotiche (Hecker et al, 2009) e la transizione epiteliale-mesenchimale (Rhyu et al, 2005). Complessivamente, ci sono prove di una stretta interazione tra TGF-β e ROS.
Tsou et al. hanno suggerito che il fenotipo profibrotico dei fibroblasti sclerodermici sarebbe promosso dall'inattivazione ossidativa della tirosina fosfatasi 1B che porterebbe ad una importante attivazione del recettore PDGF (Tsou et al, 2012).
Inoltre, i prodotti dell'ossidazione generati dai ROS, indipendentemente dalla modalità di generazione, innescherebbe un burst respiratorio nei monociti (Sambo et al, 1999; Solans et al, 2000) così da contribuire all'automantenimento del processo.
L'attivazione della sintesi di collagene è indotta dallo stress ossidativo nelle cellule muscolari lisce polmonari umane esposte al siero di pazienti sclerodermici (Boin et al, 2014). In accordo con questo risultato, Svegliati et al. hanno dimostrato che l'esposizione *in vitro* delle cellule muscolari lisce dell'arteria polmonare umana agli autoanticorpi PDGF o anti-PDGFR, ma non alle IgG normali, ha indotto un fenotipo sintetico caratterizzato da un più alto tasso di crescita, una più alta attività migratoria e più elevati livelli del gene del collagene di tipo I; hanno anche dimostrato una concomitante ridotta espressione del marcatori di fenotipo contrattile, come la catena pesante della miosina muscolare liscia e la calponina muscolare liscia (Svegliati et al, 2017).
Questo profilo fenotipico è mediato dall'aumentata generazione di ROS, dall'aumentata espressione di NOX4 e di mTORC1, indicando che gli autoanticorpi anti-PDGFR e lo stress ossidativo possono contribuire alla patogenesi dell'iperplasia intimale SSc.
In sintesi, molte funzioni cellulari nella sclerosi sistemica e nei disturbi fibrotici sono influenzate dai radicali liberi. La natura e la durata dello stress, nonché i tipi di cellule bersaglio, spiegano le diverse conseguenze biologiche innescate dall'eccesso di radicali liberi. (Svegliati et al, 2018)

Il sistema immunitario: linfociti e anticorpi e SSc

Il ruolo patogenetico del sistema immunitario nella sclerosi sistemica, secondo numerosi studi è da attribuire soprattutto ai *linfociti T*.

Nella cute e nel liquido di lavaggio broncoalveolare (BAL) dei pazienti sono presenti sia linfociti T CD4+ sia linfociti T CD8+ (Xie et al, 2008). L'attività di queste cellule potrebbe essere responsabile della fibrosi e del danno endoteliale nei pazienti con SSc, attraverso la produzione di mediatori solubili o effetti citotossici. È noto che, in condizioni normali, i linfociti Th1 producono IFN-γ e IL-2, responsabili della risposta immunitaria cellulomediata, mentre i linfociti Th2 secernono IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 che promuovono una risposta immunitaria di tipo umorale. Nella SSc è stata dimostrata una produzione citochinica prevalentemente di tipo Th2, con aumento significativo di IL- 4 (Famularo et al, 1990). Lo studio del TCR ha evidenziato inoltre nei pazienti sclerodermici una restrizione oligoclonale dei linfociti T, suggerendo l'esistenza di un fattore antigenico attivatorio che potrebbe essere alla base della malattia (Fiocco et al, 1993).

Sembrerebbero coinvolti nella patogenesi della sclerosi sistemica anche i *linfociti B*, questo è dimostrato dalla presenza nel siero di vari tipi di autoanticorpi, per la maggior parte di questi non è stata dimostrata un'attività biologica e sembrerebbero quindi un epifenomeno (Gabrielli et al, 2007b), ma recenti studi hanno individuato autoanticorpi agonisti del recettore del PDGF in pazienti con SSc (Svegliati et al, 2006) e questi ultimi hanno dimostrato di indurre fibrosi *ex vivo* (Luchetti et al, 2016) e convertire *in vitro* fibroblasti normali in cellule simil-sclerodermiche (Chizzolini et al, 2002).

Ci sono inoltre altri autoanticorpi che sono stati ritrovati nel siero di pazienti sclerodermici e potrebbero avere un ruolo patogenetico:

i) gli *anticorpi anti-cellule endoteliali (AECA*). Il loro potenziale ruolo patogeno è stato suggerito dalla loro capacità di indurre l'apoptosi nelle cellule endoteliali umane. *In vivo*, il trasferimento di siero AECA-positivo da polli UCD-200 (un modello animale di SSc), ha indotto l'apoptosi delle cellule endoteliali in embrioni di pollo sani. È stato osservato in alcuni pazienti con SSc che lo stesso autoanticorpo lega una proteina del CMV (Citomegalovirus), facendo ipotizzare un meccanismo di mimetismo molecolare. In uno studio è stato osservato che anticorpi anti-cellule endoteliali prelevati da pazienti con SSc possono attivare cellule endoteliali, aumentandone

l'espressione di molecole di adesione come ICAM-1 e VCAM-1, E-selectina, IL-6, IL-8, CCL2.

ii) *Anticorpi contro il recettore di tipo 1 dell'angiotensina II (AT1R).* Sono stati segnalati per la prima volta nel 1999, in donne con preeclampsia, ma successivamente anche in pazienti con SSc. La loro attività agonistica è stata dimostrata dall'effetto cronotropo indotto su cardiomiociti di topo in coltura che era completamente inibito dall'antagonista del recettore selettivo losartan.

iii) *Anticorpi contro il recettore A dell'endotelina-1 (ETaR).* Sono stati identificati per la prima volta nel siero di pazienti con PAH. Nei sieri di pazienti con SSc, gli anticorpi anti-AT1R e anti-ETAR sono stati rilevati per la prima volta da Riemekasten et al. Anticorpi anti-AT1R e anti-ETAR sono presenti in circa l'85% dei pazienti con SSc. Nei pazienti con SSc, i livelli di anticorpi sono fortemente correlati tra loro e mostrano cross-reattività per entrambi i recettori. Elevati livelli di anticorpi anti-AT1R e anti-ETAR sono stati associati a gravi manifestazioni vascolari della SSc quali ulcere digitali e PAH. Questi autoanticorpi inducono la fosforilazione di ERK1 / 2 e l'aumentata espressione del gene TGF-β nelle cellule endoteliali microvascolari dermiche umane. Inoltre, aumentano la produzione di IL-8 e CCL18 in linfociti T umani periferici, linfociti B e monociti.

Topi sani C57BL-6 trattati con somministrazioni endovenose ripetute di IgG SSc totali positive per anticorpi anti-A T1R e anti-ET AR mostrano all'analisi istologica dei polmoni, eseguita mediante colorazione con ematossilina ed eosina, un ispessimento dei vasi e un'elevata densità cellulare nel tessuto interstiziale. In assenza di anticorpi monoclonali umani anti-AT1R e anti-ETAR, questi risultati devono essere corroborati mediante somministrazione di frazioni di IgG totali SSc arricchite o impoverite di anticorpi anti-AT1R e anti-ETAR, al fine di separare gli effetti specifici degli anticorpi anti-AT1R e anti-ETAR da quelli di IgG SSc totali, che possono contenere altre specie di anticorpi agonisti come autoanticorpi anti- PDGFRα

iv) *Anticorpi contro il recettore muscarinico-3 (M3R).* È stata ipotizzata l'esistenza di questo autoanticorpo per giustificare la frequente dismotilità intestinale che si osserva nei pazienti con SSc, infatti fisiologicamente il recettore muscarinico-3 ha un ruolo centrale nella regolazione della motilità intestinale. Seguendo questa ipotesi, diversi

studi hanno riscontrato un'elevata incidenza di anticorpi anti- mienterici nei sieri di pazienti affetti da SSc con sintomi gastrointestinali e hanno dimostrato che il trasferimento passivo di questi anticorpi in un modello murino ha gravemente alterato l'attività mioenterica. L'antigene in questi studi, tuttavia, era rimasto da determinare. Successivamente tramite un saggio immunoenzimatico si sono identificati anticorpi anti-M3R (Moroncini et al, 2018a).

PDGF/PDGFR

Il PDGF (fattore di crescita derivato dalle piastrine) è una citochina legata alla guarigione delle ferite e alla fibrosi, ha anche un ruolo importante durante lo sviluppo embrionale (dimostrato da studi su topi knockout per questo gene). Questa citochina svolge una funzione mitogena e chemiotattica per le cellule di origine mesenchimale, ed è necessaria alla formazione, espansione, proliferazione e sopravvivenza dei miofibroblasti (Trojanowska, 2008), inoltre favorisce la produzione di collagene da parte dei fibroblasti (Harrison's).

Il PDGF è secreto da vari tipi di cellule come piastrine, monociti e cellule endoteliali (Andrae et al, 2008). Nella cute anche i cheratinociti e le cellule di Langerhans partecipano alla produzione di PDGF, mentre nel polmone è prodotto dalle cellule epiteliali e dai macrofagi alveolari (Klinkhammer et al, 2018).

La stessa citochina *in vivo* riesce a svolgere diversi ruoli come quello di chemiotassi o proliferazione in base alla concentrazione della stessa. Ci sono molte condizioni fisiologiche, come ad esempio la riparazione tissutale o l'angiogenesi, nelle quali si viene a formare un gradiente di fattore di crescita. In base a questo, cellule target distanti dalla sorgente del gradiente percepiscono basse concentrazioni di PDGF. La fosforilazione del recettore è scarsa ma il segnale generato è più persistente in quanto l'internalizzazione del recettore è lenta perché la via di endocitosi seguita è quella mediata da clatrina. Questa stimolazione non è sufficiente ad indurre un fenotipo cellulare proliferativo ma favorisce la migrazione. Invece ad alte concentrazioni di PDGF la fosforilazione recettoriale è elevata, il segnale generato più intenso ma molto meno duraturo per via di una rapida internalizzazione, in questo caso infatti l'endocitosi è mediata dalla caveolina associata. Questo stimolo induce un fenotipo cellulare proliferante e non migrante. Quindi nel momento in cui la cellula, migrando lungo la "direzione crescente" del gradiente, arriva a un punto nel quale la concentrazione del PDGF raggiunge una precisa soglia, si arresta ed entra in mitosi, passando perciò dal fenotipo migrante a quello proliferante come richiesto ad esempio nella riparazione tissutale.

Strutturalmente il PDGF è composto da un dimero di catene polipeptidiche legate da ponti disolfuro, esistono 4 catene polipeptidiche: il PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C, e PDGF-D, che possono formare sia omodimeri che eterodimeri. Il PDGF-B è prevalentemente secreto dalle cellule endoteliali, svolgendo un ruolo paracrino nelle cellule muscolari lisce della parete del vaso che esprimono il recettore. Anche il PDGF-A è secreto dalle cellule

epiteliali e ha un ruolo essenziale nella proliferazione e mantenimento delle cellule mesenchimali del derma. Una disfunzione nei segnali del PDGF sembra essere implicata nell'aterosclerosi, nell'ipertensione polmonare e nella fibrosi d'organo (tra cui la fibrosi del fegato e rene). Nei soggetti sani sia il ligando sia il recettore a livello vascolare sono quasi indosabili ma nelle patologie vascolari sono spesso iperespressi (Trojanowska, 2008).

Recettore del PDGF

Il PDGF agisce andando ad attivare il suo recettore, inducendo un omo- o etero-dimerizzazione delle 2 isoforme di tirosin-chinasi, il PDGFRα e il PDGFRβ, che una volta dimerizzate si autofosforilano (Trojanowska, 2008) nei domini intracitoplasmatici e in vari punti di questi si creano i siti di attacco per le diverse molecole coinvolte nella via di trasduzione intracellulare del segnale (Kazlauskas et al, 1989).

L'attivazione del recettore dà il via a diversi pathway che si estrinsecano nella proliferazione cellulare, nella chemiotassi e nella riorganizzazione dell'actina (Trojanowska, 2008).

Le 2 diverse isoforme mappano su cromosomi diversi: il PDGFRα sul cromosoma 4 mentre il PDGFRβ sul 5 (Kazlauskas, 2017).

Entrambe sono composte da:

1. una porzione extracellulare all'estremità N-terminale ricca di residui di cisteina che interagisce col PDGF
2. una porzione transmembrana formata da 25-30 amminoacidi idrofobici
3. una regione intracellulare all'estremità C-terminale, organizzata in due domini tirosin-chinasici separati tra loro da una sequenza di circa 100 amminoacidi.

Tra i geni del PDGFR α e β c'è una forte omologia, infatti sono uguali per il 44% e presentano lunghe sequenze sovrapponibili (Claesson-Welsh et al, 1989).

I pattern di espressione delle varie isoforme del PDGF e del PDGFR sono diversi nei vari tessuti e i loro livelli di espressione risultano regolati in corso di infiammazione, in risposta ad una serie di stimoli e in altre condizioni fisiopatologiche.

I due recettori differiscono nella loro affinità di legame nei confronti dei diversi ligandi: il PDGFRα lega le isoforme AA, BB, AB e CC del PDGF, mentre il PDGFRβ lega le isoforme BB, DD e con minore affinità l'isoforma AB (Trojanowska, 2008).

I principali pathway a valle dell'attivazione del PDGFR attualmente conosciuti sono:

- Fosforilazione di chinasi citosoliche appartententi alla via delle MAP chinasi, come RAS, ERK1 e ERK2, che comporta il reclutamento di fattori di trascrizione coinvolti nella crescita e nel differenziamento cellulare;

- Attivazione della fosfatidil-inositolo 3-chinasi (PI3K) che fosforila vari substrati tra i quali il fosfatidil inositolo 4,5 bifosfato (PIP2) che viene fosforilato a fosfatidil inositolo 3,4,5 trifosfato PIP3 il quale rimane sulla membrana plasmatica ed attiva Akt libera nel citoplasma. Akt, una volta attivata, fosforila disattivando vari bersagli proteici cellulari e producendo come effetto finale la promozione della riorganizzazione dell'actina che favorisce la mobilità cellulare, stimola la crescita delle cellule e ne inibisce l'apoptosi;

- Attivazione della fosfolipasi C (PLC). Questa tramite il legame della tirosina fosforilata in posizione 1009 del PDGFR, diviene in grado di idrolizzare il fosfatidilinositolo 4,5-bifosfato (PIP2) in 1,2-diacilglicerolo (DAG) e in inositolo 1,4,5-trifosfato (IP3). Attraverso l'attivazione della fosfochinasi C (PKC), l'enzima fosfolipasi C influenza inoltre la crescita e la mobilità cellulare;

- Attivazione delle chinasi della famiglia Src che si legano tramite il loro dominio SH2 con i recettori PDGF autofosforilati. Src sembra essere importante per la risposta mitogenica del PDGF poiché la somministrazione di anticorpi neutralizzanti inibisce la crescita cellulare;

- Attivazione della famiglia delle STAT. Si è infatti scoperto che le STAT possono essere legate al recettore del PDGF ed essere fosforilate quando questo lega il suo ligando, tramite fosforilazione e dimerizzazione; in questo stato le STAT sono attive e possono passare nel nucleo fungendo da fattore di trascrizione (Heldin et al, 1999).

Esistono anche modalità indipendenti dal PDGF per attivare questi recettori, è stato infatti osservato che il PDGFRα può essere stimolato da altri fattori di crescita, questa modalità prevede un'attivazione protratta della forma monomerica del recettore, la persistenza del

segnale è da attribuirsi a una stabilità maggiore della forma monomerica del recettore, che viene internalizzato e degradato molto più lentamente. L'attivazione aspecifica del recettore è stata osservata per la prima volta in forme patologiche e gioca un ruolo centrale nella sopravvivenza dei fibroblasti nella vitreoretinopatia proliferativa (Kazlauskas, 2017).

Ruolo del PDGF nella sclerodermia

Ci sono numerose prove a favore del coinvolgimento del PDGF anche nella patogenesi della sclerosi sistemica:

- topi transgenici con sovraespressione di PDGF vanno incontro a fibrosi viscerale;
- topi transgenici per il recettore PDGFRα con guadagno di funzione, portano a un'iperplasia del tessuto mesenchimale. In alcuni modelli questa iperplasia è tanto importante da far morire già alla nascita questi topi (Claesson-Welsh et al, 1989);
- la presenza di anticorpi stimolanti il PDGFR nel siero di pazienti con sclerodermia;
- la forte stimolazione da parte del PDGF alla transizione da periciti a fibroblasti;
- gli effetti benefici degli inibitori selettivi della segnalazione di PDGF sulla fibrosi del derma (Gabrielli et al, 2009b);
- la presenza di alti livelli di PDGF e del suo recettore β nelle lesioni cutanee e nei lavaggi broncoalveolari dei pazienti (Heldin et al, 1999) e nei fibroblasti (Zheng et al, 1998);
- iniezioni di PDGF-B in modelli animali di fibrosi, come quello con uso della bleomicina, peggiorano la fibrosi (John et al, 2016);

Ci sono inoltre altre interessanti osservazioni emerse da recenti studi, che cercano di spiegare i meccanismi tramite i quali il PDGF e i suoi recettori possano impattare nella patologia:

- Il signaling del PDGF sembra lavorare in sinergia con quello del TGF -β nello sviluppo della fibrosi (Bonner, 2004);
- A differenza dei normali fibroblasti quelli della sclerodermia rispondono al TGF- β con una iperespressione del PDGFRα (Yamakage et al, 1992);
- È stato dimostrato che via PDGFR si assiste all'attivazione di ERK1/2 e alla produzione finale di ROS; sia i radicali che la chinasi contribuiscono vicendevolmente alla stabilizzazione della proteina Ras. Questo circuito, che nella SSc sembra

automantenersi, conduce nei fibroblasti a eccessiva produzione di collagene di tipo I, danno al DNA e aumentata senescenza cellulare (Svegliati et al, 2005);

- L'infiammazione che si verifica soprattutto nelle prime fasi della sclerodermia, può aumentare l'espressione del PDGFR nei fibroblasti tramite aumento delle citochine (Bonner, 2004);
- È anche ipotizzabile che il PDGF abbia un ruolo nella vasculopatia e nell'occlusione vascolare, infatti nei pericíti dei pazienti sclerodermici si trova una sovrespressione del PDGF-β. È da notare che questo avviene anche nei pericíti dei vasi linfatici e che anche questi vanno incontro a rarefazione nella SSc;
- Imatinib tramite l'inibizione delle tirosin-chinasi tra cui PDGFR riduce la fibrosi nel modello murino di fibrosi indotta da bleomicina, riduce anche la proliferazione e la produzione di matrice nei fibroblasti prelevati da cute di pazienti sclerodermici. Trial clinici su pazienti sclerodermici con questo farmaco hanno dimostrato un miglioramento della funzionalità polmonare e della fibrosi cutanea, però spesso il trattamento è risultato poco tollerabile (Klinkhammer et al, 2018);
- È stato osservato che topi transgenici per il gene PDGFR-β con guadagno di funzione sviluppano una complessa condizione infiammatoria, e questo può far ipotizzare che tale signaling possa essere coinvolto anche nella SSC (Iwayama et al, 2013; Klinkhammer et al, 2018);
- Il PDGF-C prodotto da macrofagi M2 induce l'espressione di α-SMA in fibroblasti dermici *in vitro* e potrebbe anche promuovere la differenzazione in miofibroblasto nella fibrosi cutanea. I siRNA che silenziano l'espressione di PDGFRα, inibiscono la transdifferenzazione dei fibroblasti (Liu et al, 2013; Glim et al, 2013).

Autoanticorpi monoclonali umani ricombinanti anti- PDGFRα

Recenti studi hanno rilevato e isolato autoanticorpi stimolanti rivolti contro il recettore del PDGFα nel siero dei pazienti affetti da sclerodermia (Svegliati et al, 2006).
Questi anticorpi agonisti del PDGFR inducono *in vitro* un fenotipo pro-fibrotico in fibroblasti e cellule muscolari lisce dei vasi con aumento dell'espressione di collagene di tipo1 e conversione in miofibroblasti (Svegliati et al, 2017).

Per confermare il rilevamento dell'autoanticorpo, sono stati isolati i linfociti B memoria dal sangue periferico di un paziente da cui erano state isolate le immunoglobuline. Questi

sono stati seminati mediante Limiting dilution in centinaia di piastre di coltura cellulare e il risultante di ciascun pozzetto è stato sottoposto a screening per la presenza di IgG anti-PDGFRα. Questa metodologia ha permesso l'identificazione di alcuni cloni di linfociti B che producevano anticorpi leganti il PDGFRα. In seguito, è stato estratto da queste stesse cellule l'RNA totale, retrotrascritto e amplificato per analizzare il repertorio genico delle IgG umane. Il cDNA delle catene pesanti e leggere identificate è stato clonato in un vettore di espressione e trasferito in cellule CHO per produrre 3 anticorpi monoclonali umani. Si è poi dimostrato che questi 3 mAb differiscono solo nella regione variabile delle catene leggere e hanno affinità di legame e attività funzionali distinte (Moroncini et al, 2015; Moroncini et al, 2017).

L'uso di una grande libreria peptidica conformazionale del PDGFRα ha permesso il riconoscimento degli epitopi legati da questi anticorpi:

- Il VH_{PAM}-V_K16F4 (un anticorpo capace sia di legare che di stimolare il PDGFR, con produzione di ROS e aumentare la trascrizione di geni per il collagene I), riconosce un epitopo del PDGFRα umano sovrapponibile a quello del PDGF-BB (un epitopo conformazionale, cioè un motivo discontinuo che comprende 3 distinti sequenze attraverso il secondo e il terzo dominio).
- Il VH_{PAM}-*Vλ16F4* (capace di legare il recettore e indurre la produzione di ROS), riconosce un epitopo compreso tra il primo e il secondo dominio extracellulare del PDGFRα umano, distinto da quello riconosciuto dal VHPAM- Vκ13B8.
- Il VH_{PAM}-*Vκ13B8* (un anticorpo capace di legare il recettore ma privo di attività stimolatoria), riconosce una sequenza lineare amminoacidica nel primo dominio del PDGFRα.

Il VH_{PAM}-Vλ13B8 è risultato incapace sia di legare che di stimolare il PDGFR (Moroncini et al, 2015).

Attualmente è in corso di validazione un test di riconoscimento dei soli autoanticorpi agonisti basato sull'epitopo da loro legato, mentre è già presente un test ELISA atto a rilevare tutti gli anticorpi anti-PDGFR. Tramite quest'ultimo test possiamo osservare che in 66 su 70 pazienti con SSc vengono riscontrati anticorpi anti-PDGFRα (94,3%) e in 63 su 130 controlli sani (48,5%). Gli anticorpi sierici VH_{PAM}-V_K16F4 sono stati trovati in 24 su 34 pazienti con SSc, ma non in controlli sani.

È importante sottolineare che le IgG purificate dai campioni di siero dei pazienti con SSc positivi all'ELISA si sono dimostrati positivi anche in saggio biologico sui ROS, mentre le IgG purificate dai controlli sani positivi all'ELISA sono risultati negativi al test biologico, suggerendo che l'anti-PDGFRα non agonista può essere presente anche nei controlli sani, mentre gli anticorpi anti-PDGFRα agonista sono specifici per SSc (Moroncini et al, 2015).
Per dimostrare indirettamente un'attività *in vivo* di questi anticorpi si è attuato un trial clinico su pazienti con SSc non rispondenti a terapia. Si è somministrato loro 4 cicli di rituximab che ha migliorato la condizione clinica, si è poi valutata l'attività dei loro anticorpi nello stimolare la produzione di ROS e collagene di tipo I *in vitro* su cellule provenienti da biopsie cutanee. In questo studio si è potuto osservare che anche l'attività degli anticorpi era diminuita, rafforzando l'ipotesi di un ruolo importante dei linfociti B e degli anticorpi agonisti nello sviluppo della patologia (Fraticelli et al, 2015).
È stata poi ottenuta un'evidenza diretta tramite un modello murino con trapianto di cute umana bioingegnerizzata. Più precisamente si sono ottenuti cheratinociti e fibroblasti da biopsie di cute di pazienti sani, si è poi ricostruita una cute tridimensionale bioingegnerizzata e si è trapiantata sul dorso di topi SCID. La cute trapiantata è stata poi sottoposta alle iniezioni di IgG totali dei pazienti con SSc e con anticorpo monoclonale agonista del PDGFR ponendo come controllo le IgG dei pazienti sani. Solo con le IgG dei soggetti malati o con gli anticorpi monoclonali si osserva l'aumento del collagene e l'attivazione dei fibroblasti (Luchetti et al, 2016).

I fibroblasti non sono l'unico target degli anticorpi anti-PDGFRα agonisti, infatti è stato dimostrato che possono indurre la proliferazione e la migrazione delle cellule muscolari lisce vascolari polmonari *in vitro* (Svegliati et al, 2017). È lecito quindi ipotizzare un ruolo patogenetico anche nel danno vascolare della SSc e nella grave complicanza dell'ipertensione arteriosa polmonare (Moroncini et al, 2018a).

Come precedentemente esposto è anche stato dimostrato che questi autoanticorpi hanno un ruolo cruciale nella patogenesi della patologia, agendo da agonisti del PDGFR possono infatti fosforilare RAS, che fosforila ERK1 e ERK2, con aumento della produzione di ROS e dell'espressione genica della catena di collagene α1 tipo I, induzione della proliferazione e dell'attività migratoria. Questa ipotesi è stata dimostrata tramite la stimolazione *in vitro* di cellule muscolari lisce dell'arteria polmonare con questi

autoanticorpi, usando come controllo IgG di pazienti sani. Gli autoanticorpi agiscono tramite l'aumento dell'espressione del gene NOX4 codificante per la NADPH ossidasi4; è stato anche dimostrato che mTOR è una segnalazione cruciale a valle degli effetti degli autoanticorpi tramite PDGFR (Svegliati et al, 2017).

Eziologia

Sebbene l'eziologia e i meccanismi patologici di SSc non siano stati completamente chiariti, la malattia sembra essere il risultato di un processo multiplo e multifattoriale comprendente fattori genetici e ambientali oltre ad alterazioni del sistema immunitario e disfunzione microvascolare che alla fine portano alla fibrosi e alle manifestazioni cliniche della SSc.

A supporto dell'importanza della *genetica* nell'eziopatogenesi ci sono i dati dell'aggregazione familiare, questa è presente nel 1,2% -1,5% dei casi (2,6% nei fratelli), il dato in sé può sembrare basso, ma in realtà consiste in un cospicuo aumento della prevalenza rispetto alla popolazione generale (Tan et al, 2000). Infatti, il rischio di sviluppare la SSc è stato stimato essere 13 volte più alto nei parenti di primo grado dei pazienti e 15 volte più alto nei fratelli rispetto a quello nella popolazione generale (Korman et al, 2015). Gli studi condotti su gemelli mostrano concordanze relativamente basse nello sviluppo di malattia (4.2% nei monozigotici e 5,6% nei dizigotici), ma concordanze ben più elevate per quanto riguarda la presenza di autoanticorpi (Feghali-Bostwick et al, 2003). Recenti studi hanno individuato alcuni dei fattori di suscettibilità genetica, i primi a essere stati scoperti sono stati alcuni alleli del complesso maggiore di istocompatibilità HLA tipo II. In un ampio studio caso-controllo, la SSc è stata maggiormente associata in caucasici e ispanici con gli alleli DRB1 * 1104, DQA1 * 0501 e DQB1 * 0301 e negli afroamericani con alleli DRB1 * 0804, DQA1 * 0501 e DQB1 * 0301. L'allele DPB1 * 1301 invece è associato alla probabilità di sviluppare anti-topo 1 con un rapporto di probabilità rispetto alla popolazione generale (OR) di 14 volte. La probabilità di sviluppare anticorpi anti-centromero sono maggiori per chi possiede gli alleli DQB1 * 0501 e DQB1 * 26. Anche i soggetti con polimorfismi per geni che codificano per proteine implicate nella regolazione dell'immunità e dell'infiammazione, nella trascrizione, e nella scissione e riparazione del DNA risultano più suscettibili alla malattia. In particolare, si è riscontrata una prevalenza più alta di malattia rispetto alla popolazione generale in chi presenta specifici polimorfismi per i seguenti geni: CD247, TBX21, PTPN22, TNFSF4, IL23R, IL-21, C8orf13-BLK, PLD4, NLRP1, PLCL2, NFkB, IRF8, IRF4, CSK, IRAK1, TNIP1, FAS, MIF, HGF, OPN, IL-6, CXCL8, CCR6, CTGF, ITGAM, CAV1, MECP2, SOX5, PPAR-γ, XRCC1, XRCC4, GRB10 NOTCH4, RHOB, PSD3, PSOR1C1. (Arnett et al, 2010)

Attualmente si presta particolare attenzione al ruolo delle molecole regolatrici, come i microRNA (miRNA), nello sviluppo e nel decorso delle malattie autoimmuni (Chouri et al, 2018).
Le mutazioni genetiche scoperte finora però non sembrano essere correlate alla fibrosi, e questo potrebbe far pensare che la fibrosi possa essere secondaria a una risposta immunitaria aberrante.

Le modificazioni *epigenetiche* sono ulteriori candidate nell'eziopatogenesi della sclerodermia, infatti l'ipometilazione di alcuni promoter favorirebbe l'espressione di molecole co-stimolatorie (come il CD70 nei linfociti T CD8+) che sembrerebbero promuovere *l'autoimmunità* (Hewagama et al, 2009).

Esiste inoltre un'*ipotesi infettiva* avvalorata dalla correlazione statistica di alcune infezioni con lo sviluppo della malattia. Lo sviluppo della SSc solo in una piccola parte dei pazienti che hanno riportato l'infezione potrebbe essere giustificata dalla necessità di un background genetico (Grossman et al, 2011).
Gli agenti virali per i quali sono presenti in letteratura maggiori evidenze sono il CMV, il Parvovirus B19, l'EBV. Recentemente, l'interesse di alcuni gruppi di studio si sta spostando anche verso gli adenovirus (Moroncini et al, 2013).
Per gli agenti batterici invece, l'unico che sembra rilevante è l'Helicobacter Pylorii la cui incidenza pare essere circa l'81% nei soggetti con SSc e che sembra stimoli la produzione della HSP 60, proteina implicata in diversi pathway proflogistici.
Si ritiene che la carenza di vitamina D sia importante nello sviluppo di SSc. Ricerche recenti hanno dimostrato che anche fattori come l'acido lisofosfatidico (LPA) o la sfingosina 1-fosfato (S1P) svolgono un ruolo nel danno della parete vascolare e nella fibrosi nella SSc (Tokumura et al, 2009).

Ipotesi virale

Virus e autoimmunità

Meccanismo

Studi epidemiologici sull'uomo e studi sperimentali su animali hanno dimostrato che le infezioni virali possono indurre o proteggere dalle patologie autoimmuni in base a diversi fattori tra cui background genetico, risposte immunitarie indotte dall'ospite, tipo di ceppo virale, carico virale e tempo di insorgenza dell'infezione. Tuttavia, i dati che delineano la chiara interazione meccanicistica tra il virus e il sistema immunitario per indurre autoreattività sono scarsi. I dati disponibili indicano che l'autoimmunità indotta da virus può essere attivata attraverso molteplici meccanismi tra cui *mimetismo molecolare*, *diffusione dell'epitopo, attivazione bystander* e *immortalizzazione delle cellule B infette*. Al contrario, gli effetti protettivi possono essere raggiunti attraverso risposte immunitarie regolatorie che portano alla soppressione dei fenomeni autoimmuni. (Smatti et al, 2019)
Sebbene le eziologie di diversi disturbi autoimmuni rimangano poco comprese, molteplici fattori sono stati collegati a risposte autoimmuni, tra cui la genetica, l'età, l'ambiente e le infezioni virali. I virus sono stati considerati i principali fattori ambientali che innescano i fenomeni autoimmuni negli individui geneticamente sensibili (Arleevskaya et al, 2017; Lerner et al, 2017).

Sono stati proposti molteplici meccanismi per spiegare la perdita di self-tolerance causata da infezioni virali.

Tradizionalmente, si riteneva che i virus trasportassero antigeni strutturalmente simili agli autoantigeni, che attivano le cellule B e T conducendo a una risposta cross-reattiva contro entrambi gli auto- e non-auto-antigeni, un meccanismo noto come *mimetismo molecolare* (Kim et al, 2006).
Un altro meccanismo suggerito è *l'attivazione policlonale*. L'attivazione policlonale si verifica quando i virus linfotropi infettano le cellule B. Questa infezione porterà alla proliferazione delle cellule B causando una maggiore produzione di anticorpi, con conseguente accumulo di complessi immunitari circolanti che possono causare danni ai tessuti stessi (Ferri et al, 2000).
I superantigeni virali causano *reazioni autoimmuni* quando attivano una serie di cellule T, indipendentemente dalla loro specificità. Ciò si verifica a causa della loro capacità di

legarsi al dominio variabile della catena β del recettore delle cellule T, nonché della loro capacità di legarsi a una varietà di importanti molecole, come il complesso maggiore di istocompatibilità HLA di tipo 2 (Scherer et al, 1993).

Per *attivazione bystander* si intende un meccanismo per cui una risposta immunitaria antivirale non specifica e iper-reattiva crea un ambiente pro-infiammatorio localizzato, insieme al rilascio di autoantigeni dal tessuto danneggiato. Questi autoantigeni vengono successivamente ripresi e presentati dalle cellule presentanti l'antigene (APC) per stimolare le cellule T precedentemente non reattive, ma autoreattive nelle vicinanze, innescando l'autoimmunità (Fujinami 2006; Murali-Krishna et al, 1998).

Un meccanismo correlato si chiama *diffusione dell'epitopo*, in cui un'infezione virale innesca il rilascio di più autoantigeni e l'attivazione de novo di cellule autoreattive, che di conseguenza si diffondono per colpire ulteriori autoepitopi (Getts et al, 2013; Lehmann et al, 1992)

Virus

Gli enterovirus sono considerati i principali candidati virali per causare il diabete di tipo 1 nell'uomo (Filippi et al, 2008).

Il virus Coxsackie B (CVB) è l'enterovirus più diffuso nei pazienti pre-diabetici e diabetici (Filippi et al, 2008). Numerosi studi hanno riportato la presenza di CVB RNA nel sangue dei pazienti con diabete di tipo 1 (Clements et al, 1995; Andréoletti et al, 1997; Andréoletti et al, 1998; Oikarinen et al, 2011).

D'altra parte, altri studi hanno dimostrato che l'infezione da CVB durante il primo anno di vita può avere un effetto protettivo contro tale patologia (Juhela et al, 2000).

Tuttavia, non è stato ancora determinato con quale frequenza il CVB può indurre l'autoimmunità e quali sono i fattori che contribuiscono alla distruzione delle cellule β e allo sviluppo o alla protezione del diabete (Filippi et al, 2008).

Sulla base dell'analisi sierologica degli anticorpi anti-rotavirus e degli autoanticorpi delle isole, Honeyman et al. hanno suggerito che l'infezione da rotavirus potrebbe innescare l'autoimmunità nelle isole pancreatiche nei bambini ad alto rischio (Honeyman et al, 2000). Al contrario, una coorte di studio più ampia ha mostrato che è improbabile che le infezioni da rotavirus scatenino l'autoimmunità delle cellule β nei bambini geneticamente sensibili (Blomqvist et al, 2002).

I virus dell'influenza si replicano principalmente nel tratto respiratorio; tuttavia, la replicazione virale nelle isole pancreatiche e in altri organi interni è stata anche segnalata e collegata all'attivazione del sistema immunitario. Nel 1990, Roman et al hanno riferito che il virus dell'influenza ha indotto l'insulite e il diabete nei topi transgenici che esprimono emoagglutinina nelle cellule β del pancreas (Roman et al, 1990).
In uno studio sull' insorgenza del diabete di tipo 1 nei bambini ricoverati con il virus dell'influenza pandemica A (H1N1) del 2009, è stato riscontrato che tre bambini (7%) avevano chetoacidosi come indicazione del diabete di tipo 1, suggerendo che il virus H1N1 può essere coinvolto nello sviluppo della malattia (Nenna et al, 2011). Inoltre, uno studio recente con una vasta coorte ha scoperto che i bambini piccoli con infezioni respiratorie come la malattia simil-influenzale avevano un rischio aumentato di sviluppare l'autoimmunità nelle isole pancreatiche (Lönnrot et al, 2017).

Grandi studi epidemiologici hanno suggerito che la suscettibilità alla sclerosi multipla (SM) si ottiene nella prima infanzia, con infezioni virali che agiscono come un fattore scatenante. Di conseguenza, gli herpesvirus che sono infezioni infantili sono considerati candidati idonei che contribuiscono allo sviluppo della SM (Virtanen et al, 2012). Gli herpesvirus persistono anche nell'ospite come infezione latente e quando riattivati contribuiscono alla patogenesi della malattia osservata nelle malattie autoimmuni sistemiche (Draborg et al, 2012a; Draborg et al, 2013).

Si sospetta che l'infezione da virus di Epstein-Barr (EBV) abbia un ruolo centrale nella patogenesi delle malattie sistemiche autoimmuni (Draborg et al, 2013). In effetti, nel sangue dei pazienti con lupus eritematoso sistemico (LES) sono stati rilevate elevate quantità di DNA di EBV (Yu et al, 2005; Moon et al, 2004). Inoltre, nei pazienti con LES è stato riportato un aumento dell'espressione di mRNA virali di EBV (Gross et al, 2005). Altre segnalazioni collegavano LES a EBV sulla base di analisi sierologiche. Titoli più elevati di IgG e IgA "anti-antigene precoce" (EA) sono stati trovati nei pazienti con LES rispetto ai portatori sani di EBV (Draborg et al, 2012; Draborg et al, 2012b).
Nei pazienti con artrite reumatoide (AR), con LES e con sindrome di Sjögren (SS) sono stati osservati un'abnorme risposta cellulo-mediata diretta contro l'EBV, elevati titoli anticorpali anti-EBV e un'aumentata carica virale. (Draborg et al, 2012a)

Inoltre, è stata riscontrata un'infezione persistente da CMV associata all'induzione di anticorpi contro le cellule insulari (Rickinson et al, 1987).
Le infezioni erpetiche e gastrointestinali virale sono state collegate all'induzione della celiachia (CD), un'altra malattia cronica autoimmune (Lerner et al, 2017; Kemppainen et al, 2017).
Contrariamente agli studi di cui sopra, è interessante notare che alcuni altri report hanno mostrato un'associazione protettiva tra infezioni da herpesvirus e autoimmunità (Lerner et al, 2017; Christen et al, 2005; Plot et al, 2009). Gli anticorpi sierici per CMV, EBV sono risultati inferiori nei pazienti con malattia celiaca (CD) rispetto ai controlli sani (Plot et al, 2009).
Jansen et al. hanno scoperto che i livelli di IgG anti-CMV, EBV e HSV-1 erano inversamente correlati con i livelli di anticorpi anti-transglutaminasi tipo 2 (TG2A), suggerendo un impatto protettivo di questi virus nella patogenesi della malattia celiaca (Jansen et al, 2016; Jansen et al, 2017).
Il ruolo protettivo delle infezioni nell'autoimmunità supporta l' "ipotesi igienica", che propone che un ambiente di vita più pulito porti a una maggiore incidenza di disturbi autoimmuni (Christen et al, 2005). Oltre alla modulazione del sistema immunitario verso il Th2, le infezioni virali, comprese le infezioni prodotte da CMV ed EBV, possono causare apoptosi delle cellule immunitarie, attenuando così la risposta del sistema immunitario e minimizzando la progressione della malattia autoimmune (Lerner et al, 2017).

Le infezioni da molteplici altri virus come il virus del morbillo e della parotite (famiglia Paramyxoviridae) e della rosolia (famiglia Togaviridae) sono state collegate a disturbi autoimmuni. In particolare, le infezioni da parotite e rosolia erano legate all'insorgenza del diabete di tipo 1 (Ramondetti et al, 2012). Entrambi i virus hanno la capacità di infettare e crescere nelle cellule β (Vuorinen et al, 1992; Numazaki et al, 1990). Inoltre, entrambi i virus provocano la malattia da demielinizzazione del SNC (Virtanen et al, 2012).
I virus della famiglia delle Flaviviridae, come il virus Zika (ZIKV) e il virus dengue (DENV), sono stati anche associati a disturbi autoimmuni, tra cui la sindrome Guillain – Barré indotta da ZIKV, oltre al LES e alla nefrite lupica indotte da DENV (Pinto-Diaz et al, 2017; Talib et al, 2013). Il virus HTLV-1 della famiglia Retroviridae è stato associato all'autoimmunità del SNC, causando mielopatia e paraparesi spastica tropicale (Getts et al, 2013).

Notevole, da questo punto di vista, è il lavoro fondamentale dei gruppi Stappenbeck e Virgin (Cadwell et al, 2010) sull'eziopatogenesi multifattoriale della malattia di Crohn. Questo studio rappresenta un paradigma della complessa interazione tra i diversi componenti alla base di una malattia infiammatoria cronica immuno-mediata, in cui agenti specifici e non specifici concorrono all'insorgenza e alla progressione della malattia e chiarisce come fattori ambientali tra cui le infezioni possono selezionare, in un pool di individui con background genetici comuni, (Romano et al, 2011) coloro che svilupperanno la malattia da coloro che rimarranno inalterati.

La **tabella 1** riassume gli studi che hanno riportato fenomeni di autoimmunità indotta da virus in differenti organismi secondo i meccanismi proposti.

TABELLA 1:

Esempi di infezioni virali risultate connesse a patologie autoimmune (Smatti et al., 2019)

Patologia	**Virus**	**Meccanismo**	**Fonte**
Encefalomielite disseminata acuta	Influenza	Mimetismo molecolare/attivazione bystander	Sanderson et al., 2017
AIDS	HIV	Attivazione bystander	Root-Bernstein et al.,2017
Encefalite autoimmune	HSV	Mimetismo molecolare	Bradshaw et al., 2015
Epatite autoimmune	EBV	Mimetismo molecolare	Cabibi et al., 2008
Tiroidite autoimmune	HHV-6a	/	Caselli et al., 2017
Crioglobulinemia	HCV	/	Ogishi et al., 2016
Encefalite	HSV	Mimetismo molecolare	Armangue et al., 2014
Encefalite e sequele croniche	HSV	/	Kothur et al., 2017
Morbo di Grave	EBV	/	Nagata et al., 2017
Sindrome di Guillain-Barrè	Zika virus	Mimetismo molecolare	Lucchese e Kanduc et al., 2016
Malattia di Hashimoto	EBV	/	Janegova et al., 2015
Trombocitopenia immune, epatite autoimmune	HCV	/	Tampaki e Koskinas et al., 2014
Autoimmunità insulare	Enterovirus	Mimetismo molecolare	Honkaken et al., 2017
Sclerosi Multipla	EBV	Mimetismo molecolare	Guan et al., 2019
Sclerosi Multipla	Theiler's virus	/	Miller et al., 2001
Sclerosi Multipla	HZV	/	Sotelo e Corona et al., 2011
Sclerosi Multipla	Morbillo	/	Tucker e Andrew Paskauskas, 2008
Sclerosi Multipla	CMV	Mimetismo molecolare	Vanheusden et al., 2017
Miastenia gravis	West Nile virus	Mimetismo molecolare	McBride et al., 2006
Mielopatia/ paraparesi spastica tropicale	HTLV-1	/	Bangham et al., 2015
Poliartrite	HCV	/	Zuckerman et al., 2000

Artrite reumatoide	EBV	Diffusione dell'epitopo	Dostàl C et al., 1997
Artrite reumatoide	CMV	Diffusione dell'epitopo	Pera et al., 2017
Sindrome di Sjogren	HCV	Attivazione Bystander	Ramos-Casals et al., 2005
Cheratite stromale	HSV	/	Deshpande et al., 2001
Cheratite Stromale	HSV	/	Farook e Shukla, 2012
Poliartrite simmetrica	Chikungunya	Diffusione dell'epitopo	Goupil e Mores, 2016
LES	CMV	Diffusione dell'epitopo	Chen et al., 2015
LES in porfiria cutanea tarda	HCV	Diffusione dell'epitopo	Stolzel et al., 2002
LES	Parvovirus B19	/	Ribeiro et al., 2015
LES/nefrite lupica	Dengue	Diffusione dell'epitopo	Steed e Stappenbeck, 2014
Trombocitopenia	HCV	/	Dahal et al.,2017
Tiroidite	HCV	Attivazione bystander	Ferri et al., 2017
Diabete Mellito 1	Coxsackievirus	Mimetismo molecolare	Eizirik e Op de Beeck, 2018
Diabete Mellito 1	Coxsackievirus	Mimetismo molecolare	Laitinen et al., 2014
Diabete Mellito 1	CMV	/	Pak et al., 1998
Diabete Mellito 1	Enterovirus	/	Stene e Rewers, 2012
Vasculite	HCV	/	Cacoub et al., 2014

Virus e sclerodermia

Gli agenti virali, dato il loro tropismo per molti sottotipi cellulari, comprese le cellule immunitarie, e la loro capacità di trasformare praticamente qualsiasi cellula in cellule presentanti l'antigene, sono stati tradizionalmente considerati potenziali fattori eziopatogenici della SSc.

Da uno studio effettuato da Arnson et al. (Arnson et al, 2009), risulta che, sul totale degli antigeni esaminati, è più elevata la presenza di anticorpi contro toxoplasma, CMV, capside dell'EBV e contro il core-antigen dell'HBV nei pazienti SSc rispetto ai controlli.

Precedenti report correlano la SSc all'infezione da Parvovirus B19 (Ferri et al, 1999b), da CMV (White, 1996), da EBV (Tsukamoto et al, 2000), ERV (Dang et al, 1991) e Helicobacter Pilorii (Kalabay et al, 2002).

EBV

Il DNA di EBV è stato riscontrato nei polmoni di pazienti con SSc. (Tsukamoto et al, 2000).

È interessante notare che, dopo mononucleosi infettiva, anticorpi anti-p542, un peptide sintetico rappresentate le ripetizioni di glicina/alanina nell'antigene nucleare dell'EBV-1 (EBNA-1), cross-reagiscono con l'RNP umana. (Rhodes et al, 1997).

Inoltre, Arnson et al. hanno riscontrato elevati titoli di IgM anti-capside dell'EBV nel siero di pazienti SSc, confermando una forte associazione tra SSc e infezione da EBV. (Arnson et al, 2009)

CMV

Vi sono alcuni report epidemiologici a supporto del fatto che le infezioni croniche da CMV nell'uomo possono svolgere un ruolo importante nella patogenesi di malattie vascolari come l'aterosclerosi (Nieto et al, 1996) e la sclerosi sistemica (Pandey et al, 1998; Neidhart et al, 1999).

Hamamdzic et al. riportano un possibile meccanismo patogeno alla base del danno da CMV delle pareti vascolari. (Hamamdzic et al, 2001)

Nel loro studio hanno utilizzato come modello animale di arterite sperimentale innescata dall'infezione da citomegalovirus murino (mCMV) topi privi di IFN-γR sottoposti a irradiazione di tutto il corpo. I topi IFN-γR - / -, irradiati due mesi dopo l'infezione, hanno sviluppato una grave vasculopatia caratterizzata da un massivo infiltrato avventiziale e mediale e una significativa deposizione di neointima, una caratteristica importante delle

vasculopatie autoimmuni nell'uomo. Al contrario, nessuna patologia vascolare è stata osservata in nessuno dei gruppi controllo immunodeficienti, suggerendo che l'infezione da mCMV era il fattore critico. Gli animali immunocompetenti infetti presentavano solo infiammazione perivascolare, suggerendo che l'infezione e l'immunosoppressione erano co-requisiti della neoformazione di intima. L'apoptosi e la proliferazione attiva di miofibroblasti e di cellule infiltranti sono state rilevate nello strato intimale di vasi aortici colpiti in questi topi. Per corroborare ulteriormente l'analogia di questo quadro patologico con la SSc umana, il modello di malattia sperimentale è stato caratterizzato dalla sovraregolazione dei fattori di crescita (TGF-β1, PDGF-A e B), classicamente coinvolti nella patogenesi della SSc.

L'induzione del TGF-β1, la citochina pro-fibrotica canonica (Leask et al, 2005), da parte del CMV umano (hCMV) è stata segnalata da altri autori (Michelson et al, 1994), implicando che un'infezione primaria delle cellule endoteliali da hCMV può indurre l'attivazione dei miofibroblasti nella parete del vaso per effetto di questa citochina. Inoltre, la proliferazione delle cellule muscolari lisce vascolari contribuisce notevolmente all'aumento dello spessore della parete vascolare nella SSc. Queste cellule possono essere infettate e attivate dall'hCMV, con conseguente induzione di mediatori proinfiammatori come l'interleuchina-1-β (Dengler et al, 2000) e il leucotriene LTB4 (Qiu et al, 2008). In particolare, i primi prodotti genici immediati dell'hCMV, tra cui il recettore delle chemochine US28 (Streblow et al, 1999), aumentano la migrazione e la proliferazione delle cellule muscolari lisce vascolari e l'espressione del recettore PDGF β (Zhou et al, 1999), un recettore sovraespresso e iperattivato nella vasculopatia da SSc (Overbeek et al, 2011)

CMV e autoimmunità in SSc

Poiché sono stati descritti gli autoanticorpi patogeni diretti contro cellule endoteliali e contro i fibroblasti (Carvalho et al, 1996; Bordron et al, 1998; Chizzolini et al, 2002), l'hCMV può essere coinvolto nella patogenesi della SSc non solo attraverso l'infezione diretta delle cellule endoteliali o dei fibroblasti, ma anche attraverso gli eventi autoimmuni innescati dal mimetismo molecolare, che, come già detto, è uno dei meccanismi che collegano le infezioni e l'autoimmunità (Di Rosa et al, 1998; Wucherpfennig et al, 1995; Zhao et al, 1998). Lunardi et al. hanno riportato un notevole paradigma di mimetismo molecolare coinvolto nella patogenesi della SSc (Lunardi et al, 2000); essi hanno infatti identificato nel siero dei pazienti con SSc delle IgG che riconoscono in modo specifico la proteina di CMV UL94

e il complesso proteico integrina-NAG-2 superficiale delle cellule endoteliali, inducendo così l'apoptosi delle cellule endoteliali stesse. Successivamente, lo stesso gruppo ha mostrato che gli anticorpi anti-hCMV possono essere collegati alla patogenesi della SSc non solo inducendo l'attivazione e l'apoptosi delle cellule endoteliali, ma anche provocando l'attivazione dei fibroblasti.

Malattie simili a CMV e SSc

L'infezione da hCMV e la sua riattivazione sono associate ad un aumentato rischio per lo sviluppo e il peggioramento di cGVHD cronico esteso (Lonnqvist et al, 1984; Larsson et al, 2004), caratterizzato da lesioni cutanee e viscerali simili a quelle tipiche di SSc associate alla presenza nel siero di autoanticorpi SSc-specifici come anti-topoisomerasi I (Bell et al, 1996).

CMV transizione epitelio-mesenchimale nella SSc.

Le cellule epiteliali prelevate da zone diverse possono passare a fibroblasti e miofibroblasti in risposta al TGF-β e ad altri fattori di crescita / citochine. Questo si chiama transizione epiteliale-mesenchimale (EMT) (Postlethwaite et al, 2004; Hu et al, 2013). Insieme alle cellule endoteliali, ai fibroblasti e alle cellule muscolari lisce, le cellule epiteliali sono gli obiettivi predominanti per la replicazione del virus CMV (Sinzger et al, 2008), che potrebbe indurre EMT.

Inoltre il CMV è in grado di infettare sia le cellule endoteliali sia i monociti/macrofagi attraverso una upregolazione delle citochine fibrogeniche e un'induzione della disregolazione immunitaria (Pandey ey al, 1998; Vaughan et al, 2000).

Il CMV come possibile trigger per la SSc è stato suggerito dall'aspetto sclerosi-like che si manifesta dopo episodi di infezione acuta (Ferri et al, 2002b). L'infezione da CMV delle cellule endoteliali altera l'espressione di alcune integrine in particolare riducendo l'espressione delle integrine $\alpha_5\beta_1$ e $\alpha_2\beta_1$, e aumentando l'espressione delle integrine $\alpha_6\beta_1$ e $\alpha_3\beta_1$ (Shahgasempour et al, 1997). Induce inoltre l'espressione di citochine fibrogeniche (come il TGF-β1), e contribuisce alla disregolazione immunitaria e probabilmente all' autoimmunità contro epitopi selettivi come centromero, Scl-70, RNP e RNA-polimerasi. (Pandey et al, 1998). È interessante notare che gli autoanticopri Scl-70, maggiormente presenti nella forma diffusa cutanea di SSc, cross-reagiscono con una sequenza peptidica della proteina UL70 di CMV, come dimostrato da Muryoi. (Muryoi et al, 1992).

Nella coorte studiata da Arnson et al., i campioni di siero di pazienti SSc contenevano titoli significativamente elevati di IgG e di IgM anti-CMV rispetto al gruppo controllo. Inoltre titoli elevati di IgM anti-CMV sono stati associati alla variante dcSSc, che ha l'esordio più aggressivo (Arnson et al, 2009).
Questi risultati differiscono da quelli registrati nel diabete, dove più bassi tassi di reattività contro il CMV sono stati riscontrati, rispetto ai controlli sani: questi dati suggeriscono, di nuovo, che gli anticorpi diretti contro alcuni agenti infettivi possono facilitare lo sviluppo di alcune malattie autoimmuni e prevenire l'insorgenza di altre. (Krause et al, 2008)

Parvovirus B19

In pazienti con SSc, Ferri et al. hanno dimostrato la presenza di Parvovirus B19 in campioni di biopsia del midollo osseo e / o cutanei di un numero significativo di soggetti non selezionati (Ferri et al, 1999a; Ferri et al, 2002a). È interessante notare che gli stessi autori hanno trovato alti livelli di DNA di Parvovirus B19 e espressione di TNF-α nell'endotelio e nei fibroblasti di pazienti con SSc utilizzando una tecnica RT-PCR in situ (Zakrzewska et al, 2005).
L'infezione da Parvovirus B19 è stata associata alla produzione di anticorpi diretti contro una vasta gamma di autoantigeni, tra cui antigeni nucleari, fattore reumatoide, antigeni citoplasmatici dei neutrofili, antigeni mitocondriali, muscolo liscio, antigeni della parete gastrica e fosfolipidi (Meyer et al, 2003; Von Landenberg et al, 2007; Lehmann et al, 2008; Lunardi et al, 1998).
Inoltre, l'infezione da ParvovirusB19 e da hCMV nel midollo osseo (Ferri et a, 1999a; Taichman et al, 1997) può essere responsabile della alterata vasculogenesi presente nella SSc, a causa della loro capacità mielosoppressiva (Brown et al, 1996; Simmons et al, 1990). Infatti una delle principali ipotesi patogenetiche afferma che la produzione o il reclutamento di cellule progenitrici ematopoietiche endoteliali dal midollo possa essere alterato nei pazienti affetti da SSc contribuendo quindi alle alterazioni vascolari tipiche di questa patologia. (Nevskaya et al, 2008; Mok et al, 2010; Manetti et al, 2010)

AAV5

I virus Adeno Associati (AAV) sono virus a DNA a singolo filamento appartenenti alla famiglia Parvoviridae. Essi richiedono la coinfezione con un "virus helper" (adenovirus, herpes virus, vaccini virali o papillomavirus umano) per la loro replicazione e per l'espressione genica. In assenza del virus helper, l'AAV dà luogo ad un'infezione latente nella cellula ospite. Fino ad oggi si conoscono 9 sierotipi diversi di AAV e più di 100 varianti di cui soltanto 3 sembrerebbero di origine umana (AAV2, AAV3, AAV5), dato basato sulla prevalenza di anticorpi neutralizzanti nella popolazione umana, mentre i restanti sierotipi sono associati a varie specie animali (Zhijian et al, 2006; Tobiasch et al, 1998).
Inoltre, è da notare come la maggior parte dei sierotipi sia stata isolata come contaminanti di preparati adenovirali in laboratorio, con l'eccezione dell'AAV5, l'unico isolato da un campione umano (lesione condilomatosa peniena) (Zhijian et al, 2006).
Lo studio di questi virus ha acquistato particolare interesse nel campo della terapia genica: l'assenza di patogenicità, il tropismo per un ampio numero di cellule e la capacità di dare luogo ad una duratura espressione genica, hanno stimolato la ricerca di vettori virali basati sugli AAV (Zhijian et al, 2006; Arbetman et al, 2005; Hildinger et al, 2001).

Il più studiato di questi è l'AAV2, il cui genoma consiste di DNA a singolo filamento composto da 4680 nucleotidi. L'AAV5 è invece costituito da 4642 nucleotidi; il suo genoma virale può essere suddiviso in tre regioni: una *regione ITRs* (inverted terminal repeats) (nucleotidi 1-359), che serve per l'origine della replicazione del DNA virale ed è unica e diversa da quella dell'AAV2; una *regione rep* (nucleotidi 359-2191) le cui proteine regolano la replicazione, la trascrizione e l'accumulo del DNA virale; una *regione cap* (nucleotidi 2207-4381) responsabile della sintesi delle proteine del capside virale (VP1,VP2,VP3), meno conservata rispetto alla regione rep nei vari sierotipi. Il genoma di AAV5 presenta un'organizzazione simile a quello di AAV2 e la sua regione rep presenta un grado di omologia con l'AAV2 pari al 67%, peraltro inferiore a quella degli altri sierotipi AAV.

L'elevato grado di conservazione dell'"open reading frame" (ORF) della regione rep tra AAV2, AAV3, AAV5 e AAV6 enfatizza l'importanza di questo gene nella biologia del virus.
Gli AAV presentano un capside di forma poliedrica, la cui conformazione cambia nei vari

sierotipi e che determinerebbe il tropismo tissutale, la risposta anticorpale e l'attività emo-agglutinante; il capside di AAV5 sembrerebbe il più originale, come indicato dalla cristallografia a raggi X e dallo studio della sequenza della regione cap.

L'ingresso dei virus AAV nelle cellule sembra iniziare con l'interazione tra le proteine del capside e i recettori glicosilati di superficie cellulare: mentre AAV2 richiede il legame con l'eparan solfato, AAV5 lega l'acido sialico (Kaludov et al, 2001; Walters et al, 2001). Il tropismo tissutale sembra dipendere, oltre che dal legame di superficie, anche dall'ausilio di co-recettori, dalla processazione intracellulare e dalla modalità di integrazione nucleare del genoma virale; si pensa che ognuno di questi eventi sia modulato dall'interazione specifica tra capside e varie componenti cellulari (Lunardi et al, 2008). Esperimenti di cotrasduzione *in vitro* ed *in vivo* hanno dimostrato il tropismo di AAV5 per la superficie apicale dell'epitelio delle vie aeree, a differenza di AAV2 (Zabner et al, 2000).

Negli ultimi anni sono state individuate mediante PCR sequenze genomiche di AAV5 nelle cellule del sangue, della cervice uterina, dell'endometrio e nel materiale proveniente da aborti spontanei; in aggiunta a questi, anche altri organi possono essere infettati da AAV5, in particolare il polmone, il sistema nervoso centrale, il muscolo e l'occhio (Mingozzi et al, 2011).

AAV5 e PDGFRα

Chiorini et al. in uno studio hanno identificato il PDGFRαcome potenzialmente associato alla trasduzione di AAV-5 ed è stato confermato negli esperimenti di follow-up come un fattore cruciale per la mediazione della trasduzione di AAV-5 (confrontato con AAV-2). L'AAV-5 può effettivamente trasdurre il sistema nervoso centrale, le cellule oculari e polmonari, che si correla bene con la distribuzione tissutale del PDGFRα.
(Di Pasquale et al, 2003)

Precedenti lavori hanno suggerito che il virus dell'herpes simplex potrebbe funzionare come un virus di supporto per AAV-5, che ha anche tropismo per questi tessuti, e ulteriori analisi hanno confermato l'associazione tra sieroconversione per AAV-5 e l'infezione da herpes virus simplex (Georg-Fries et al, 1984).

Il legame inefficiente e la trasduzione scarsa da parte di AAV-5 nelle cellule che non esprimono PDGFR suggeriscono che PDGFR potrebbe mediare il legame e l'ingresso di AAV-5, tuttavia resta da stabilire se questa interazione è sufficiente o se altri eventi sono necessari per l'ingresso del virus. La trasduzione è un processo complesso. Sebbene i dati pubblicati da Chiorini et al. mostrino un'interazione diretta tra PDGFR e AAV-5, potrebbero essere necessari altri fattori per una trasduzione efficiente. (Di Pasquale et al, 2003)

Il traffico intracellulare del PDGFR assomiglia, inoltre, a quella dell'AAV5. Il PDGFR può essere internalizzato da vescicole rivestite di clatrina che si condensano vicino al nucleo e si associano all'apparato di Golgi. (Kapeller et al, 1993)

In modo simile, come indicato da alcuni studi con cellule HeLa, anche il virus AAV5 entra tramite vescicole rivestite di clatrina e attraversa il citoplasma per formare strutture cap-link nella parte trans dell'apparato di Golgi, vicino al nucleo (Bantel-Schaal et al, 2002).

La caratterizzazione del PDGFR come fattore cruciale che media la trasduzione è un passo importante nella comprensione di come l'AAV-5 si associ alle cellule e aiuterà inoltre a dirigere la ricerca sull'applicazione e l'uso ottimale dell'AAV-5 per la terapia genica. (Di Pasquale et al, 2003)

Basandosi sul lavoro di Di Pasquale et al., ed essendo stato evidenziato il ruolo centrale del signaling intracellulare PDGFR-dipendente innescato da autoanticorpi stimolanti diretti contro il recettore stesso (Svegliati et al, 2006), in una precedente fase del lavoro si è ipotizzato che la produzione di tali autoanticorpi possa essere legata all'infezione da parte di AAV5.

Il complesso dei dati ottenuti nello studio di prevalenza e le correlazioni descritte nel lavoro hanno permesso di affermare che esiste una relazione statisticamente significativa tra fenotipo sclerodermico e presenza di AAV5 nei campioni biologici dei pazienti.
Sulla base di questa evidenza, e dal momento che AAV5 e autoanticorpi agonisti condividono il bersaglio recettoriale (PDGFR), Moroncini et al. hanno condotto una ulteriore serie di esperimenti finalizzati a dimostrare una relazione tra infezione da AAV5 e la risposta autoimmunitaria diretta contro il PDGFR autologo. I dati preliminari ottenuti sembrano confermare la presenza di un nesso causale tra infezione da AAV5 e presenza di autoanticorpi stimolanti il PDGFRα. Infatti, l'autoanticorpo monoclonale umano VH_{PAM}-V_K16F4, generato a partire dalle sequenze immunoglobuliniche di un paziente sclerodermico e dimostratosi in grado di legare e stimolare il PDGFRα, ha anche dimostrato attività immunoprecipitante nei confronti del capside di AAV5. Questa proprietà non è condivisa da altri anticorpi umani anti-PDGFRα non agonisti clonati dai linfociti B dei pazienti, né da anticorpi anti-PDGFR disponibili in commercio.

Nello studio il PDGFR e il capside di AAV5 sono stati co-espressi in cellule eucariotiche umane (epitelio renale), al fine di riprodurre *in vitro* una situazione analoga a quella ipotizzabile in corso di infezione *in vivo*.
Mediante esperimenti di immunoprecipitazione, hanno verificato che l'autoanticorpo monoclonale umano VH_{PAM}-V_K16F4 sia il solo reagente in grado di legare con efficienza entrambi gli antigeni, PDGFR e capside di AAV5, dimostrando una bispecificità che né autoanticorpi anti-PDGFR non agonisti né anticorpi monoclonali murini anti-PDGFR e anti-capside possiedono.

Gli autori hanno confermato la peculiare bispecificità di VH_{PAM}-V_K16F4 mediante un saggio di legame indipendente in cui questo autoanticorpo è stato cimentato a turno contro il PDGFR e contro il capside di AAV5, dopo che questi due antigeni sono stati individualmente immobilizzati in fase solida alla superficie di un biosensore.
Infine, un terzo saggio (predizione *in silico*) suggerisce la presenza di un legame a ponte stabilito dall'autoanticorpo VH_{PAM}-V_K16F4 nei confronti dei due antigeni bersaglio (PDGFR e capside di AAV5), che darebbe luogo alla formazione di un complesso trimolecolare, la cui cinetica è ancora da definire.

I dati forniti suggeriscono che l'infezione da AAV5, mediata dal legame di questo agente virale al PDGFR, possa determinare la formazione di un "neoantigene" complesso, composto in parte da sequenze proteiche recettoriali e in parte da sequenze proteiche virali.

Questo neoantigene potrebbe essere il risultato della processazione di queste strutture da parte della machinery cellulare, dopo l'internalizzazione di PDGFR e capside di AAV5 conseguente al legame di superficie.

Il neoantigene verrebbe esposto al sistema immunitario, determinando la produzione di anticorpi diretti contro di esso, e dunque in grado di riconoscere sia il PDGFR che il capside virale.

Questa risposta immunitaria non solo sarebbe inefficiente nel neutralizzare il virus o innescarne la clearance (dati epidemiologici dimostrano che AAV-5 è, tra i vari sierotipi di questa famiglia, quello caratterizzato dalla più bassa percentuale di risposte anticorpali neutralizzanti) (Boutin et al, 2010) ma avrebbe anche l'effetto indesiderato di attivare il PDGFR, in particolare stimolandone il segnale pro-fibrosante, e contribuendo alla patogenesi della sclerodermia.

Modelli animali sperimentali

I modelli animali sono strumenti importanti per esplorare la patogenesi delle malattie autoimmuni umane. Tali modelli possono essere classificati in due gruppi, il gruppo di modelli inducibili, in cui la malattia è indotta dall'immunizzazione, dal trasferimento di componenti autoimmuni o da fattori ambientali e il gruppo di modelli spontanei in cui i topi sviluppano malattie a causa delle mutazioni o modificazioni genetiche senza ulteriori manipolazioni sperimentali. Finora sono stati creati più di venti diversi modelli murini per la SSc, ognuno dei quali è caratteristico di almeno un segno distintivo di SSc (**tabella 2**)

Classificazione	Nome del modello	Autoimmunità	Infiammazione	Vasculopatia	Fibrosi
Modelli spontanei	TigTsk/+	ATA, ANA, anti-DNA	cute	-	cute
	Tsk2/+	ATA, ANA, ACA, anti-DNA	cute	-	cute
	Topi transgenici per Fra2	-	cute, polmoni, cuore	cute, polmoni, cuore	cute, polmone, cuore
	Topi transgenici per Wnt-10b	-	polmone	-	cute
	Topi con deficit di caveolina 1	-	polmone	-	cute, polmoni
	topi Fli-1 ko	-	-	-	cute
	Topi Fli1+/– Klf5+/–	ANA	polmone	Cute, polmoni	cute, polmoni
	Topi Fli-1 ko nelle cellule endoteliali	-	-	cute	-
	Topi Fli-1 ko nelle cellule epiteliali	ANA	cute, polmone	-	cute, polmoni, esofago
	Topi uPAR ko	-	cute, polmone	cute, cuore	cute, polmoni, cuore
	Topi SIRT3 ko	-	-	polmoni	polmoni, cuore, reni, fegato
	Topi con iperespressione di VEGF	-	-	cute	cute
	Topi PTEN ko	-	-	-	cute, polmoni
Modelli indotti	Topi trattai con bleomicina	ANA	cute, polmoni	cute	cute, polmoni
	Modello basato sulla GVHD	ANA	cute	-	cute, polmoni
	Topi trattati con HOCl	ATA, ACA	cute, polmoni, reni	reni	cute, polmoni, reni
	Modello indotto da angiotensina 2	-	cute	-	cute
	Topi immunizzati contro la Topoisomerasi-1	ATA	cute, polmoni	-	cute, polmoni
	Topo con trapianto di cute bioingegnerizzata	-	-	cute	-

TABELLA 2:

Riassunto delle manifestazioni patologiche degli attuali modelli murini SSc.

Generazione di un nuovo modello murino sperimentale di fibrosi cutanea

Un precedente progetto del nostro gruppo di ricerca ha generato un nuovo modello sperimentale di sclerodermia attraverso I) la generazione di un topo caratterizzato da espressione ubiquitaria del PDGFRα umano, e II) l'induzione della fibrosi cutanea in questo nuovo modello animale mediante l'inoculo intradermico di anticorpi anti-PDGFRα umano.

Il topo C57BL/6-hPDGFRα è un animale geneticamente modificato in modo tale da esprimere il PDGFRα umano accanto a quello murino.

Analogamente a quanto avviene nell'uomo in corso di sclerodermia, l'iniezione intradermica di autoanticorpi monoclonali anti-PDGFRα umano in topi C57BL/6-hPDGFRα ha indotto un significativo ispessimento della cute e un'aumentata deposizione di collagene a livello del derma. I dati ottenuti confermano quindi l'attività pro-fibrotica, già dimostrata sia *in vitro* sia *ex vivo*, degli anticorpi anti-PDGFRα umano presenti nel siero dei pazienti sclerodermici.

Tale attività pro-fibrotica risulta inoltre specificamente legata alla presenza del recettore umano, in quanto la fibrosi cutanea non è stata indotta nei topi appartenenti al ceppo wild type C57BL/6, dotati del solo PDGFRα murino.

OBIETTIVO

L'eziopatogenesi della Sclerosi Sistemica non è ancora del tutto chiarita.

Essendo una patologia a carattere multifattoriale, vi sono diverse componenti che portano al suo sviluppo, ovvero componenti genetiche, epigenetiche, immunitarie e ambientali, tra le quali le infezioni giocano un ruolo importante.

L'identificazione della causa primaria di malattia rappresenta un quesito fondamentale da risolvere al fine di ottenere terapie mirate che riducano la morbilità e la mortalità di questa rara ma grave patologia sistemica.

Studi precedenti, citati nei paragrafi introduttivi, hanno evidenziato che:

- il PDGFRα e il suo ligando giocano un ruolo fondamentale nello sviluppo della patologia, soprattutto in termini di deposizione di collagene che porta allo sviluppo di fibrosi;

- il virus AAV5 utilizza il PDGFRα per l'ingresso nella cellula;

- pneumociti di tipo II che difettano di PDGFRα, coltivati *in vitro*, sono infettati meno efficacemente da AAV5 in confronto alle cellule wild-type;

- mediante predizione *in silico*, esiste la presenza di un legame a ponte stabilito dall'autoanticorpo VH_{PAM}-V_K16F4 nei confronti dei due antigeni bersaglio (PDGFR e capside di AAV5) che darebbe luogo alla formazione di un complesso trimolecolare;

- in topi transgenici C57BL/6-hPDGFRα, che esprimono quindi il recettore del PDGF umano, la stimolazione con anticorpi monoclonali stimolatori diretti contro tale recettore genera fibrosi a livello del sito di inoculo (intradermico).

Partendo da queste evidenze lo scopo del presente studio è stato quindi quello di analizzare il ruolo i) del PDGFRα nell'infezione da AAV5 e ii) dell'infezione da AAV5 nell'induzione di fibrosi cutanea e polmonare mediante l'utilizzo di un nuovo modello sperimentale di topo transgenico C57BL/6-hPDGFRα.

MATERIALI E METODI

Modello murino

La genotipizzazione dei topi è stata effettuata mediante PCR eseguita su DNA genomico estratto da biopsie di coda, utilizzando il KAPA Mouse Genotyping Kit (KAPA Biosystems) secondo le istruzioni del produttore. Per confermare la corretta trasmissione genetica dell'intera cassetta di espressione del PDGFRα umano sono state disegnate quattro diverse coppie di primer in grado di amplificare specificamente le differenti regioni dell'allele knocked-in:

Regione1 forward 5'-GTTCGGCTTCTGGCGTGTGA- 3';
Regione1 reverse, 5'-AAGCTGGCAGAGGATTAGGCTCA-3';
Regione2 forward, 5'-TCTGAGTTGTTATCAGTAAGGGAGCT-3';
Regione2 reverse, 5'- TGTCGCAAATTAACTGTGAATCAT-3';
Regione3 forward, 5'- GAACAGACACAGCTCGCAGACCTC-3';
Regione3 reverse, 5'- AACGCACACCGGCCTTATTCCA-3';
Regione4 forward, 5'- A TCACA TGGTCCTGCTGGAGTTC-3';
Regione4 reverse, 5'- GGATATGAAGTACTGGGCTCTT-3' (**figura 6**).

Una ulteriore coppia di primer è stata usata per distinguere tra l'allele Rosa26 wild type e l'allele knocked-in (i.e topi transgenici eterozigoti vs omozigoti):

Rosa26 forward, 5'- TCAGTAAGGGAGCTGCAGTGGAGT-3';
Rosa26 reverse, 5'- GGAGCGGGAGAAATGGATATGAA-3'.

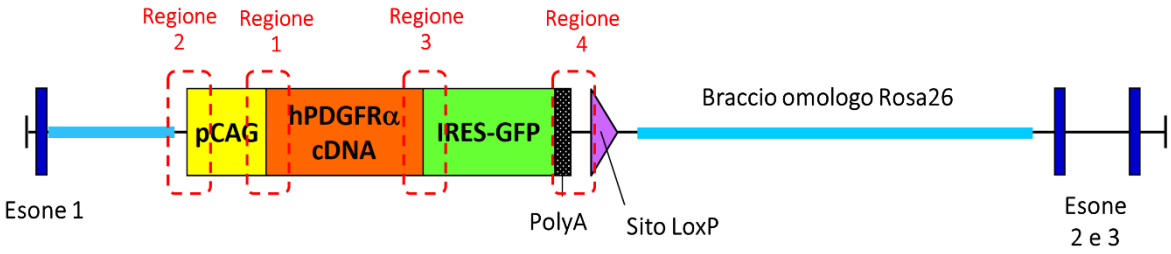


FIGURA 6
Strategia per la genotipizzazione dei topi. I riquadri tratteggiati mostrano le 4 diverse regioni (Regione 1, 2, 3 e 4) dell'allele knocked-in specificamente amplificate dalle 4 coppie di primer utilizzate in PCR per lo screening dei topi.

Iniezione endovenosa di AAV5

In questo studio sono stati utilizzati topi transgenici C57BL/6-hPDGFRα eterozigoti di 20 settimane di età. Sono stati impiegati sia topi maschi sia topi femmine.

Topi C57BL/6 wild type (Charles River Laboratories) corrispondenti per età e sesso sono stati utilizzati come controllo negativo.

I topi sono stati sottoposti a due inoculi, al giorno 0 (T0) e al giorno 180 (T180) (Zincarelli et al, 2008), tramite iniezione endovenosa nella vena della coda (**Figura 7**): un gruppo di animali è stato inoculato con 5 x 10^9 PFU di AAV5 in 50 µl di PBS e un secondo gruppo con 5 x 10^9 PFU di AAV2 in 50 µl di PBS. Come controllo della soluzione veicolo, un ulteriore gruppo di animali è stato iniettato con un volume equivalente (50 µl) di PBS. Medesimo trattamento è stato riservato per i topi transgenici e per quelli wild type.

Per ridurre al minimo la sofferenza degli animali, le iniezioni sono state eseguite in anestesia generale attraverso l'applicazione di una maschera facciale con un flusso continuo di isoflurano all'1,5%; i topi sono stati inoltre adagiati su tappetini riscaldanti per mantenere una temperatura stabile di 37 °C durante tutto l'esperimento (Moroncini et al, 2018b). Inoltre, dopo ogni trattamento, i topi sono stati osservati due volte al giorno, per monitorare il loro stato di salute e rilevare precocemente qualsiasi segno di sofferenza o aspetto patologico.

Gli animali sono stati sacrificati 240 giorni dopo la prima iniezione endovenosa, mediante eccesso di anestetico.

Ad ogni time-point T0 (giorno del primo inoculo), T36, T180 (giorno del secondo inoculo) e T240 (giorno del campionamento) è stato effettuato un prelievo siero-ematico.

Al momento del campionamento il campione ematico è stato prelevato a livello intracardiaco; sono stati prelevati i polmoni, una parte dei quali è stata immediatamente congelata in azoto liquido e conservata a -80°C mentre le altre sono state insufflate e fissate in formalina e successivamente incluse in paraffina; infine sono state effettuate biopsie cutanee in 4 zone del dorso posteriormente alle scapole da entrambi i lati della colonna vertebrale; una parte di esse è stata immediatamente congelata in azoto liquido e conservata a -80 °C per le successive analisi molecolari, mentre altre sono state fissate in formalina e incluse in paraffina.

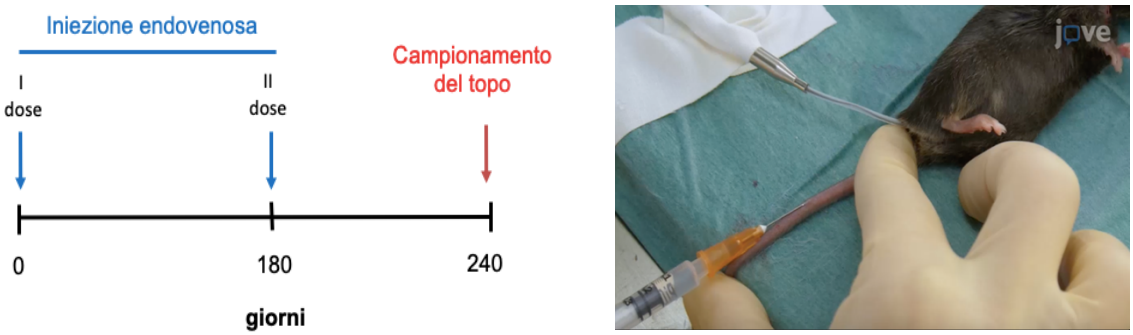


FIGURA 7
Rappresentazione schematica del protocollo sperimentale.
I topi sono stati sottoposti a due inoculi endovenosi successivi al giorno 0 e al giorno 180, quindi sacrificati al giorno 240; immagine rappresentativa di somministrazione endovenosa mediante vena della coda

Analisi istologica

I blocchi di tessuto cutaneo e polmonare inclusi in paraffina sono stati tagliati in serie in sezioni spesse 5 µm ed elaborati come descritto (Montironi et al, 2008).
Le sezioni cutanee seriali sono state colorate con ematossilina ed eosina (H&E) (Bio-Optica, Milano, Italia) e con colorazione tricromica di Masson. Le sezioni polmonari seriali sono state colorate con ematossilina ed eosina (H&E), con colorazione tricromica di Masson e con l'immunoistochimica.

Per l'immunoistochimica, lo smascheramento dell'antigene è stato eseguito con una pentola a pressione (90 ° C, 20 minuti), immergendo le sezioni in un tampone di citrato di sodio 0,01 M pH 6,0. Dopo un risciacquo in PBS, le sezioni sono state trattate con H_2O_2 al 3% in H_2O a temperatura ambiente per 10 minuti per bloccare l'attività della perossidasi endogena, lavatecon PBS e incubate con siero normale al 5% (Vector Laboratories) in una camera umidificata a temperatura ambiente per 25 minuti.

I macrofagi murini sono stati colorati con anticorpo monoclonale murino Anti- Arginasi I murina (1: 200, sc-271430, Santa Cruz Biotechnology) in una camera umidificata a 4 ° C overnight.

Dopo opportuni lavaggi in PBS, le sezioni sono state incubate con anticorpo secondario di cavallo biotinilato anti-IgG murine (1: 200; Vector Laboratories) in una camera umidificata a temperatura ambiente per 30 minuti.
L'immunoreattività è stata sviluppata utilizzando il kit perossidasi VECTASTAIN ABC (Vector Laboratories) e SIGMA FAST 3,3′-Diaminobenzidine Tablets (Sigma-Aldrich).
Le sezioni sono state contrastate con ematossilina, disidratate e montate con Eukitt Quick-Hardening Mounting Medium (Sigma-Aldrich).

Le sezioni di cute e di polmone sono state osservate al microscopio ottico Nikon Eclipse E800 e le immagini digitali sono state acquisite con una fotocamera Nikon DXM 1220.
In ciascuna sezione, l'area positiva alla colorazione Tricromica di Masson è stata misurata in cinque campi scelti casualmente utilizzando il software ImageJ (http://rsbweb.nih.gov/ij), espressa in percentuale dell'area osservata nei topi controllo e utilizzata per analisi statistiche.
Lo spessore cutaneo è stato calcolato con un ingrandimento microscopico di 10× misurando la distanza (μm) tra la giunzione epidermico-dermica e la giunzione di grasso dermico-sottocutaneo in cinque campi selezionati casualmente per ciascuna sezione cutanea di H&E (Manetti et al, 2014
Le cellule immunoreattive sono state contate in cinque campi ad alto ingrandimento scelti casualmente per ogni sezione con il software Nikon LUCIA IMAGE (versione 4.61; Laboratory Imaging, Praha, Repubblica Ceca). Il conteggio delle cellule è stato eseguito da due osservatori indipendenti in cieco. Il numero medio di cellule colorate positive per campione è stato utilizzato per analisi statistiche.

Score istologico di infiammazione polmonare

Per l'analisi quantitativa dei cambiamenti infiammatori nei polmoni del topo, sono state osservate sezioni di polmone colorate con ematossilina eosina al microscopio ottico ed è stato utilizzato un sistema di punteggio infiammatorio istopatologico basato sull'infiltrazione infiammatoria intorno a bronchioli, bronchi, vasi sanguigni e interstizio polmonare (Cimolai et al, 1992). Le variazioni infiammatorie in ciascun campione polmonare sono state valutate come un punteggio medio di gravità in campi microscopici ad alto ingrandimento osservati per sezione ed espressi su una scala numerica da 0 a 26

(dal meno al più grave). Ogni campione polmonare è stato valutato da due osservatori indipendenti in cieco.

Determinazione dell'espressione genica di collagene nella cute e nei polmoni di topo mediante RT-PCR quantitativa

I campioni di cute e polmone sono stati omogeneizzati nel reagente TRI (Sigma-Aldrich) e l'RNA totale è stato estratto secondo le istruzioni del produttore. L'RNA è stato ulteriormente elaborato come descritto (Moroncini et al, 2015). L'espressione genica del collagene murino è stata valutata utilizzando i seguenti primers:

Col1A1 forward, 5'-ACATGTTCACGTTTGTGG ACC-3';
Col1A1 reverse: 5'-TAGGCCATTGTGTATGCAGC-3';
Cyclophilin forward, 5'-GTGTTCTTCGACATCACGGC-3';
Cyclophilin reverse, 5'-GTGTT CTTCGACATCACGGC-3';
18S rRNA forward, 5'-AGTCCCTGCCCT TTGTACACA-3';
18S rRNA reverse, 5'-CGATCCGAGGGCCTCACTA-3';
GAPDH umano / murino forward, 5'-CAGCGACACCCACTCCTCCAC CTT-3';
GAPDH umano / murino reverse, 5'-CATGAGGTCCACCACCCTG TTGCT-3'.

Le reazioni sono state eseguite in triplicato per ciascun campione, in un volume di 25 µl contenente 50 nanogrammi di cDNA, 12,5 µl iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) e 400 nM di primer.

I parametri ciclici impostati sono stati i seguenti: denaturazione a 95 ° C per 15 secondi e ricottura a 60 ° C per 1 minuto, per 40 cicli. Dopo aver normalizzato i dati con GAPDH, ciclofilina e rRNA 18S, l'espressione genica relativa ai topi controllo trattati con PBS è stata calcolata con il metodo ΔΔCt.

Analisi statistica

Tutti i dati quantitativi sono stati espressi come media ± SEM. I dati sono stati analizzati utilizzando il test di Mann-Whitney per valori non parametrici, il t test di Student a due code per valori parametrici e il test ANOVA ad una via per confrontare più di due gruppi. Tutte le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il software

GraphPad Prism 5 (California, USA). Valori di probabilità inferiori a 0,05 sono stati considerati significativi.

RISULTATI

Induzione di fibrosi mediante somministrazione endovenosa di Virus Adeno-Associato 5 (AAV5)

Cute

L'analisi delle biopsie di cute prelevate al giorno 240 (8 mesi) dal primo inoculo di topi transgenici *C57BL/6-hPDGFR*α con 5 x 10^9 PFU di AAV5 ha mostrato un doppio effetto: aumento dello spessore del derma e incrementata deposizione di tessuto connettivo.

I risultati evidenziano una differenza statisticamente significativa in termini di spessore (**figura 8**) e di intensità di colorazione del connettivo tra le sezioni di cute di topi C57BL/6-hPDGFRα inoculati con AAV5 (**figura 9B**) rispetto alle sezioni di cute di topi C57BL/6-hPDGFRα inoculati con PBS (**figura 9A**) o con AAV2 (**figura 9C**). Viceversa, i topi C57BL/6 wild type inoculati con la stessa quantità di PBS, AAV5 e AAV2 non hanno mostrato alcun cambiamento significativo della cute.

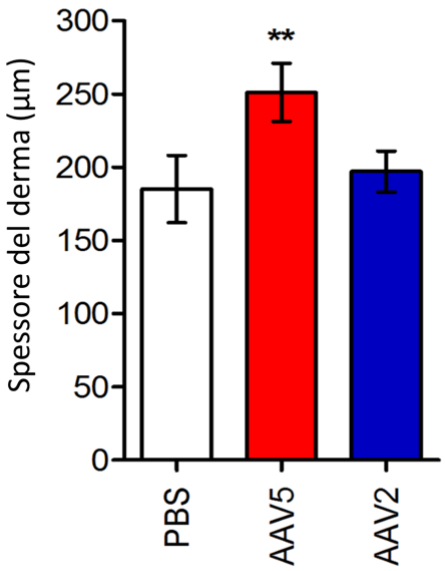


FIGURA 8
Spessore del derma misurato in cinque campi (ad ingrandimento 4x) per ciascuna delle sezioni di cute colorata con Tricromica di Masson di topi transgenici C57BL/6-hPDGFRα inoculati con PBS, AAV5 o AAV2.
Lo spessore medio per ciascuna coorte di topi è stato espresso in µ.
*** = P < 0.01.*

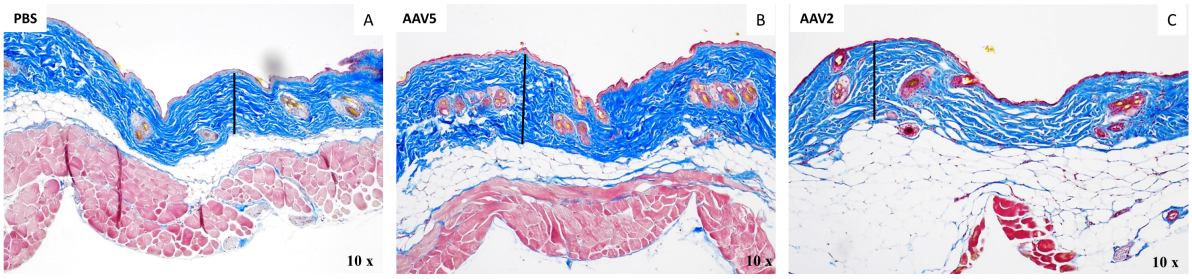


FIGURA 9 A-C
*Sezioni istologiche (ad ingrandimento 4 x) di cute del dorso prelevate al giorno 240 da topi C57BL/6-hPDGFRα in seguito a doppia somministrazione di PBS (**A**), di AAV5 (**B**), AAV2(**C**).*
Le sezioni sono state colorate con la colorazione Tricromica di Masson.
Le barre indicano lo spessore del derma, misurato come distanza tra la giunzione epidermide-derma e la giunzione derma-tessuto adiposo sottocutaneo.
Le immagini mostrate sono rappresentative di tre esperimenti indipendenti.

Inoltre, è stata analizzata l'espressione del gene Col1A1 mediante real-time PCR da mRNA estratto dalla cute, per determinare se l'aumento di deposizione di tessuto connettivo fosse correlata a un'aumentata sintesi del collagene tipo 1A1. Come mostrato in **figura 10,** l'espressione del mRNA del gene Col1A1 estratto dalla cute dei topi *C57BL/6-hPDGFR*α transgenici in seguito a doppia somministrazione di AAV5 risulta aumentata rispetto ai topi *C57BL/6-hPDGFR*α transgenici inoculati con PBS o AAV2.

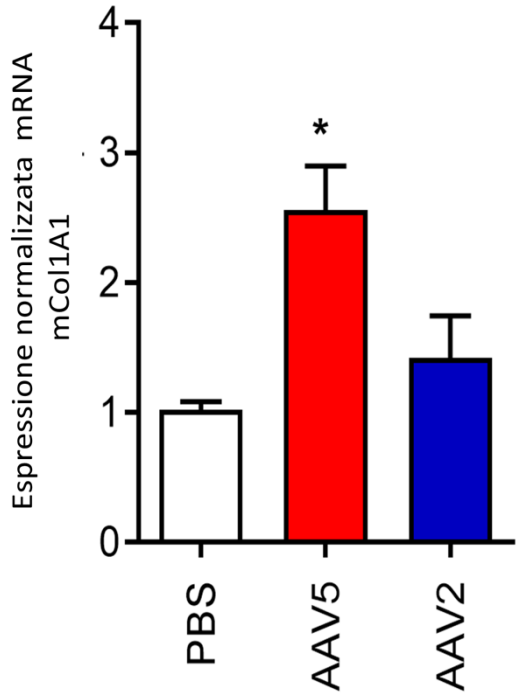


FIGURA 10
*Analisi mediante real time PCR quantitativa, dell'espressione dell'mRNA del gene murino Col1A1 estratto dalla cute, prelevata al giorno 240, da topi C57BL/6-hPDGFRα transgenici sottoposti ad iniezione endovenosa con PBS, AAV5 e AAV2. I valori medi per ciascuna coorte di topi sono stati espressi in percentuale rispetto a quello dei topi controllo trattati con PBS e sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti condotti in triplicato. * = P < 0,01*

Polmoni

L'analisi istologica, mediante colorazione con Ematossilina-Eosina (H&E), delle biopsie polmonari prelevate da topi transgenici C57BL/6-hPDGFRα inoculati con AAV5, ha evidenziato un notevole infiltrato cellulare alveolare, perivascolare e peribronchiale oltre a un maggiore spessore della trama interstiziale (**figura 11C**), tutti significativamente incrementati rispetto sia ai topi controllo transgenici C57BL/6-hPDGFRα inoculati con AAV2 (**figura 11E**) o con PBS (**figura 11A**) sia ai topi C57BL/6 wild type che hanno ricevuto il medesimo trattamento (**figura 11B-D-F**).

Le differenze rilevate a livello di infiltrato cellulare alveolare, perivascolare, peribronchiale e di ispessimento interstiziale tra AAV5, AAV2 e PBS nei topi C57BL/6-hPDGFRα transgenici sono visibili a maggior ingrandimento in **figura 12 A-F**

In f**igura 13 A-D** vengono poste a confronto le differenze, visibili con colorazione Ematossilina-Eosina, tra le sezioni provenienti dai topi C57BL/6-hPDGFRα transgenici e quelle provenienti dai topi C57BL/6 wild type.

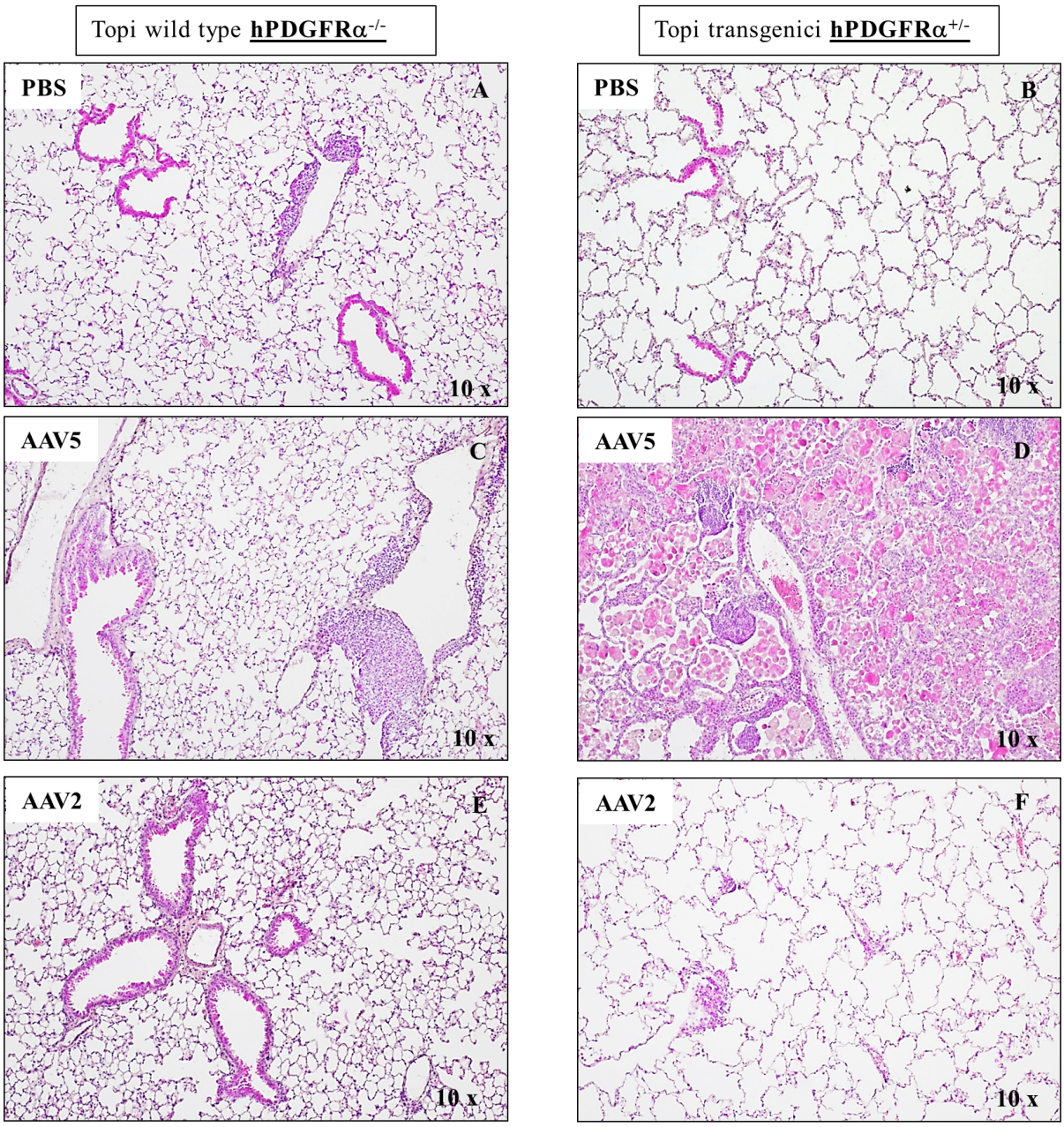


FIGURA 11 A-F

*Sezioni istologiche (ad ingrandimento 10x) di polmone prelevato al giorno 240 da topi C57BL/6 wild type dopo doppia somministrazione di PBS (**A**), di AAV5 (**C**), AAV2 (**E**) e da topi C57BL/6-hPDGFR*α transgenici *dopo doppia somministrazione di PBS (**B**), AAV5 (**D**), AAV2 (**F**).*

Le sezioni sono state colorate con Ematossilina-Eosina (H&E).

Le immagini mostrate sono rappresentative di tre esperimenti indipendenti.

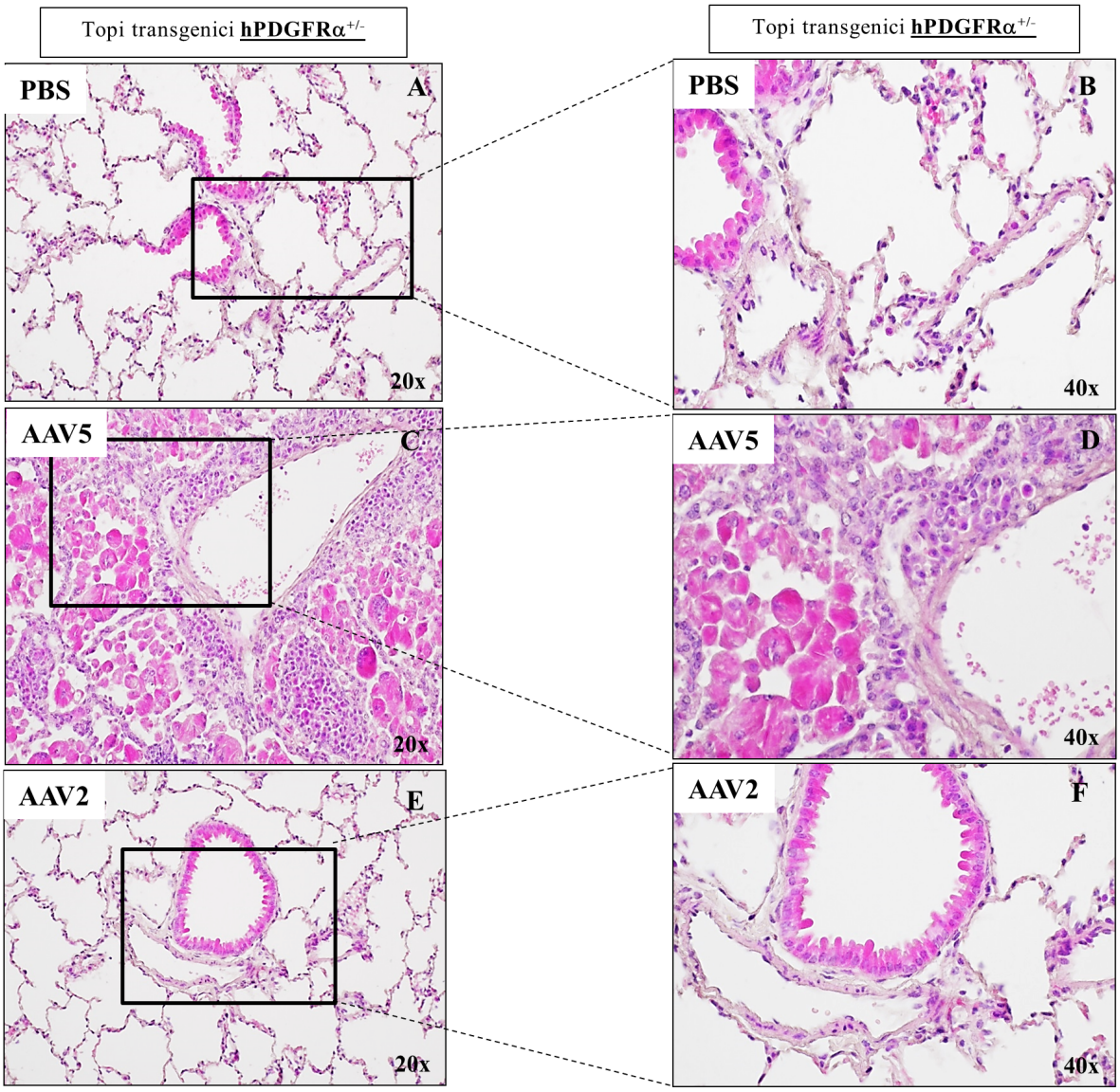


FIGURA 12 A-F

*Sezioni istologiche (ad ingrandimento **20x / 40x**) di polmone prelevato al giorno 240 da topi C57BL/6-hPDGFR*α transgenici *dopo doppia somministrazione di PBS (**A / B**), di AAV5 (**C / D**), AAV2 (**E / F**).*

Le sezioni sono state colorate con Ematossilina-Eosina

Le immagini mostrate sono rappresentative di tre esperimenti indipendenti.

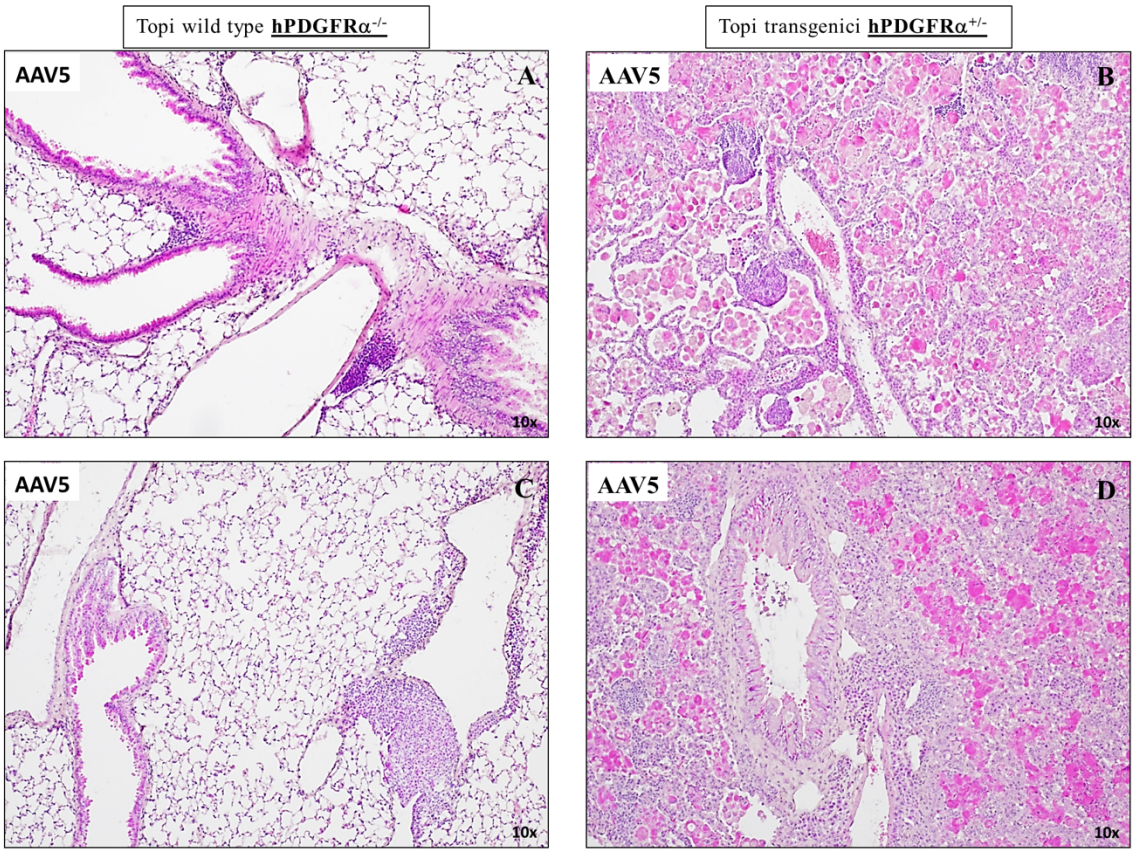


FIGURA 13 A-D
*Sezioni istologiche (ad ingrandimento 10x) di polmone prelevato al giorno 240 da topi C57BL/6 wild type dopo doppia somministrazione di AAV5 (**A**, **C**) e da topi C57BL/6-hPDGFR*α transgenici *dopo doppia somministrazione di AAV5 (**B**, **D**).*
Le sezioni sono state colorate con Ematossilina-Eosina. Le immagini mostrate sono rappresentative di tre esperimenti indipendenti.

È stato calcolato lo score istopatologico di infiammazione polmonare delle sezioni provenienti dai topi *C57BL/6-hPDGFR*α transgenici inoculati con PBS, AAV5 e AAV2 (**figura 14**), a conferma di quanto visibile nelle immagini istologiche.

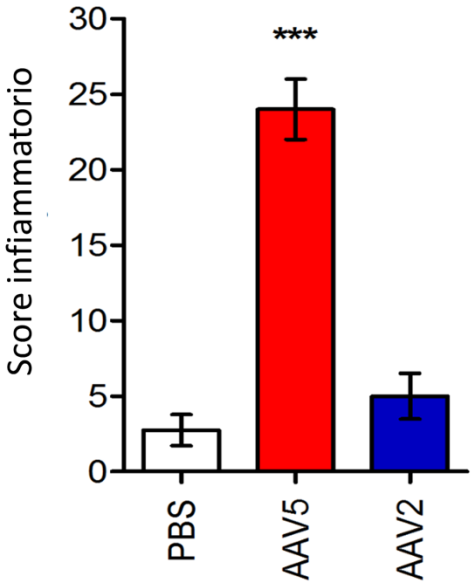


FIGURA 14
Score *infiammatorio polmonare calcolato per sezioni di polmone ottenute da topi C57BL/6-hPDGFRα transgenici che hanno ricevuto i trattamenti sopra citati.*
*I risultati ottenuti sono i valori medi ± DS (n = 8 per gruppo) e sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti. *** = P < 0.05*

Per visualizzare meglio la fibrosi perivascolare e interstiziale a livello polmonare è stata poi effettuata la colorazione delle sezioni mediante Tricromica di Masson.
Si è nuovamente rilevato un elevato infiltrato cellulare alveolare e un deposito di tessuto connettivo perivascolare e peribronchiale maggiore nelle sezioni di polmone di topi transgenici *C57BL/6-hPDGFR*α inoculati con AAV5 (**figura 15C**) rispetto sia alle sezioni di polmone di topi transgenici *C57BL/6-hPDGFR*α inoculati con AAV2 (**figura 15E**) o PBS (**figura 15A**) sia rispetto alle sezioni di topi *C57BL/6* wild type che hanno ricevuto il medesimo trattamento (**figura 15B-D-F**)

In **figura 16 A-F** è possibile osservare le differenze di infiltrato cellulare alveolare, perivascolare, peribronchiale e di ispessimento interstiziale tra i topi inoculati con AAV5 rispetto ai topi inoculati con PBS e AAV2.

Le differenze tra le sezioni provenienti dai topi *C57BL/6-hPDGFR*α transgenici e quelle provenienti dai topi *C57BL/6* wild type sono meglio visualizzate in **figura 17 A-D**.

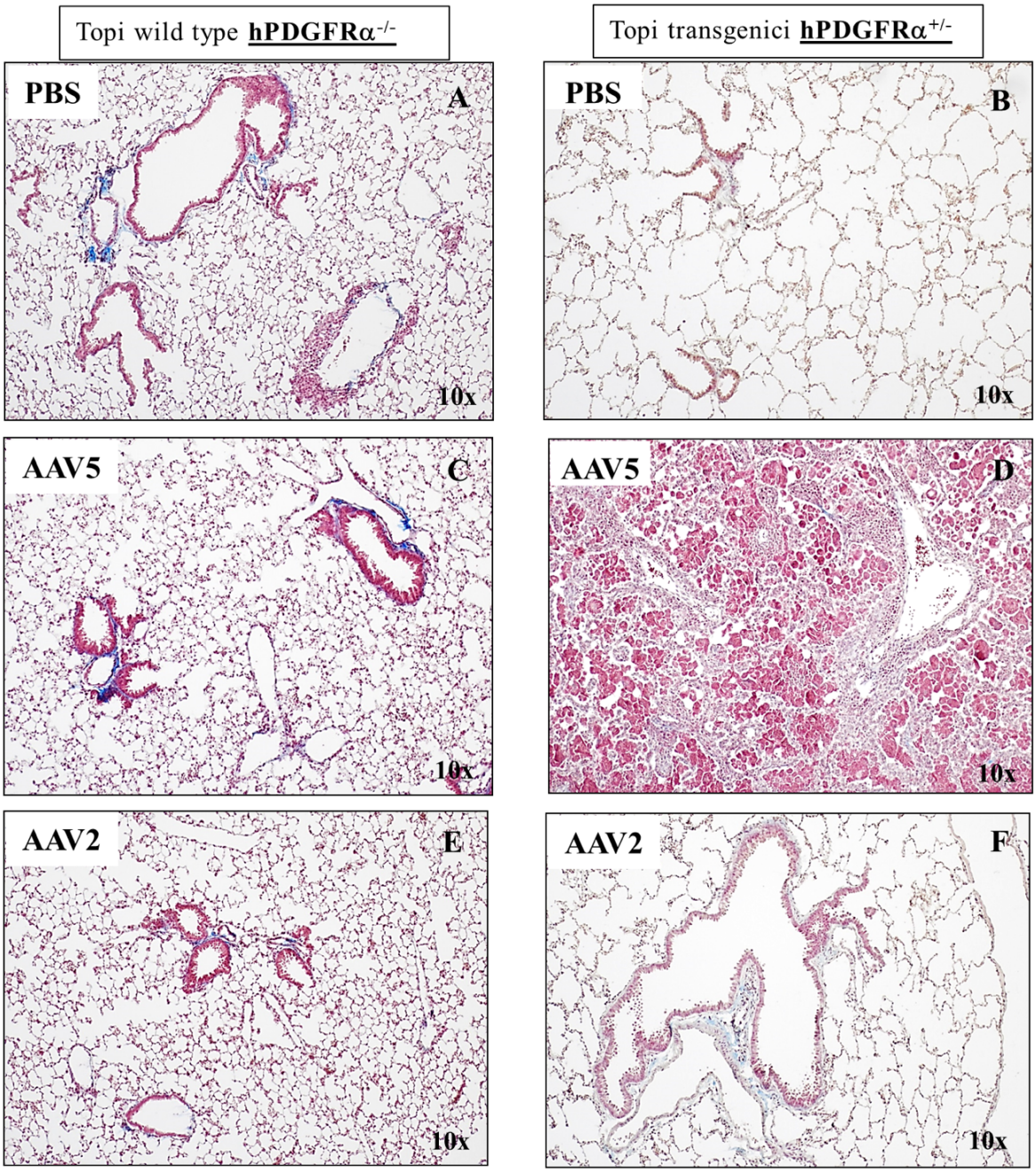


FIGURA 15 A-F

*Sezioni istologiche (ad ingrandimento 10x) di polmone prelevato al giorno 240 da topi C57BL/6 wild type dopo doppia somministrazione di PBS (**A**), di AAV5 (**C**), AAV2 (**E**) e da topi C57BL/6-hPDGFRα* transgenici *dopo doppia somministrazione di PBS (**B**), AAV5 (**D**), AAV2 (**F**).*

Le sezioni sono state colorate con Tricromica di Masson (MT).

Le immagini mostrate sono rappresentative di tre esperimenti indipendenti.

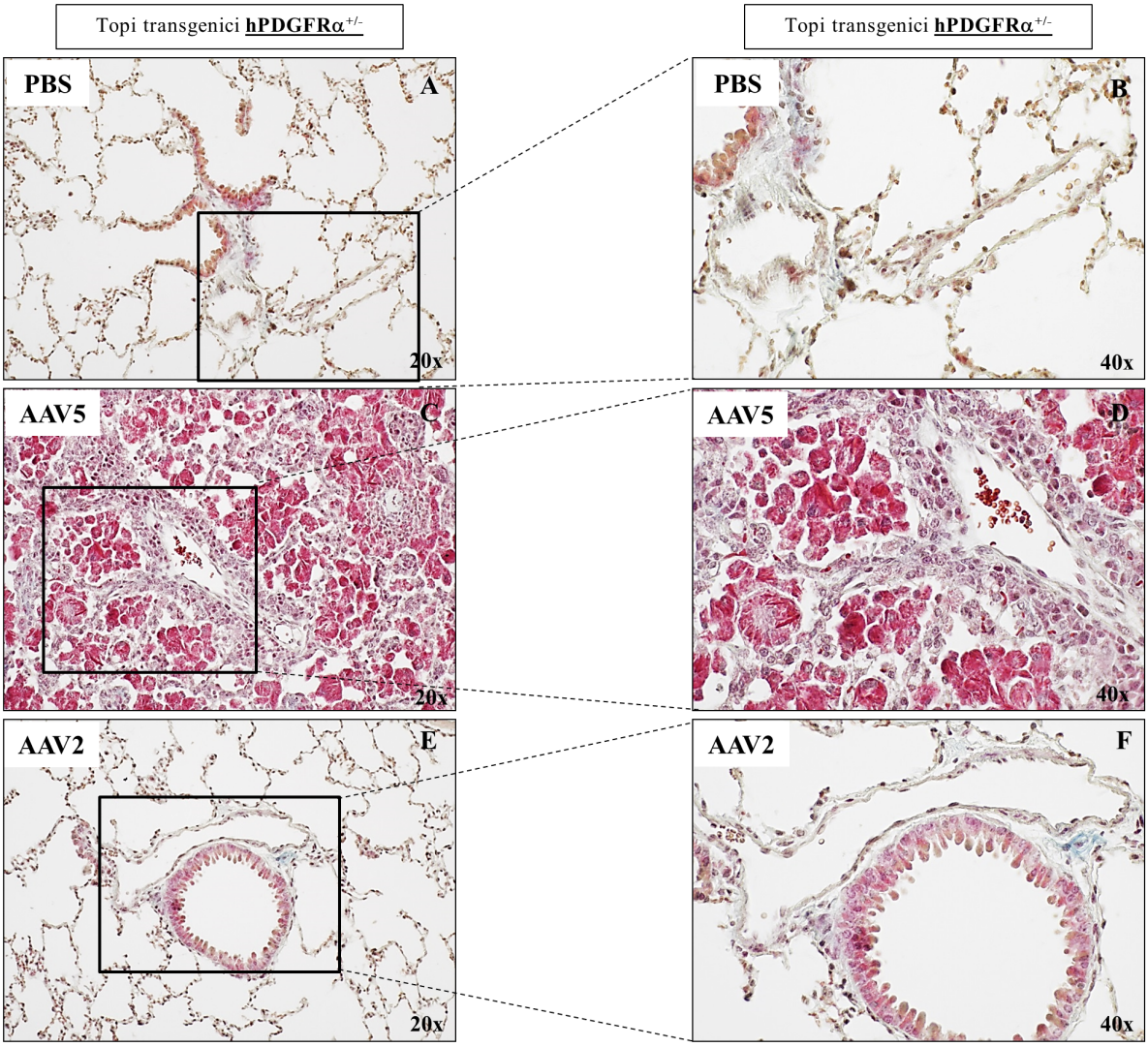


FIGURA 16 A-F

*Sezioni istologiche (ad ingrandimento **20x / 40x**) di polmone prelevato al giorno 240 da topi C57BL/6-hPDGFRα* transgenici *dopo doppia somministrazione di PBS (**A / B**), di AAV5 (**C / D**), AAV2 (**E / F**).*

Le sezioni sono state colorate con Tricromica di Masson

Le immagini mostrate sono rappresentative di tre esperimenti indipendenti.

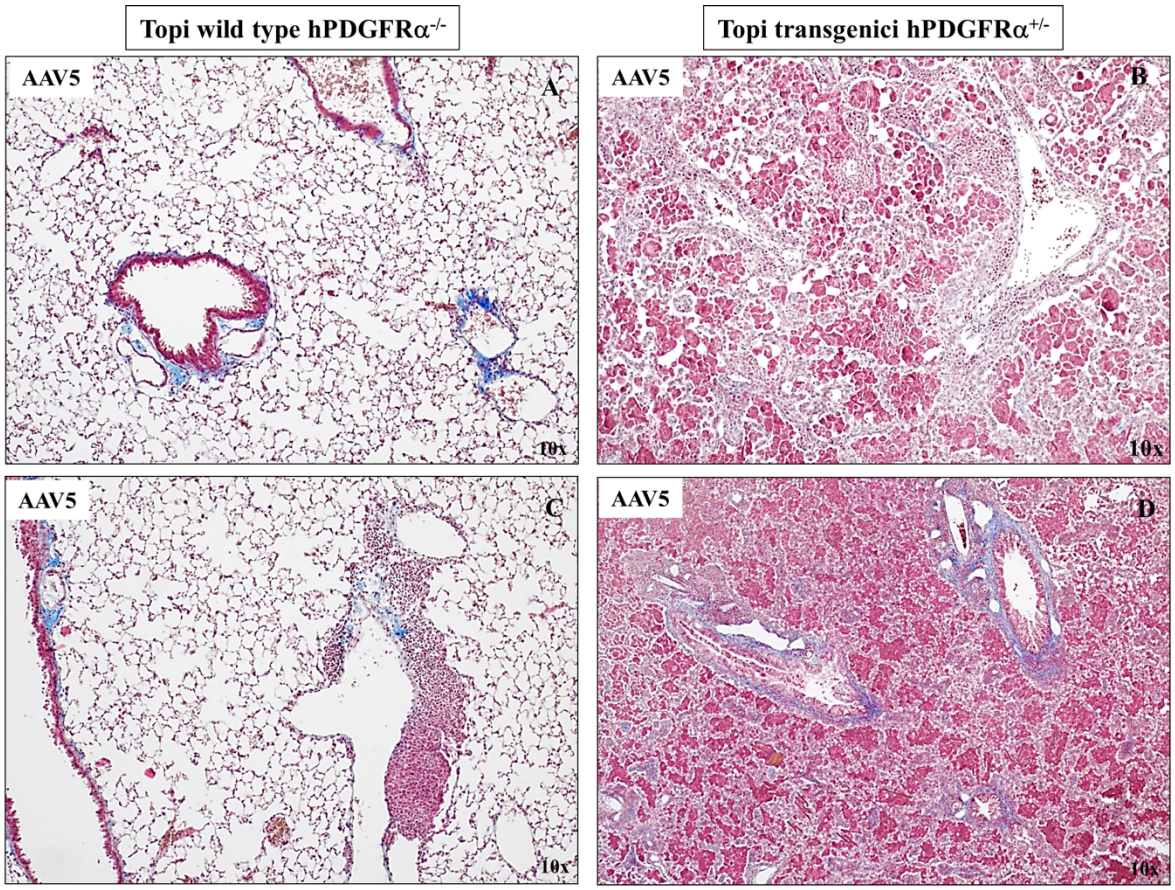


FIGURA 17 A-D

*Sezioni istologiche (ad ingrandimento 10x) di polmone prelevato al giorno 240 da topi C57BL/6 wild type dopo doppia somministrazione di AAV5 (**A, C**) e da topi C57BL/6-hPDGFR*α transgenici *dopo doppia somministrazione di AAV5 (**B, D**).*
Le sezioni sono state colorate con Tricromica di Masson
Le immagini mostrate sono rappresentative di tre esperimenti indipendenti.

Per caratterizzare l'infiltrato infiammatorio cellulare nelle sezioni di polmone di topi *C57BL/6-hPDGFR*α transgenici inoculati con PBS, AAV5 o AAV2, è stata inoltre effettuata la colorazione immunoistochimica per l'arginasi 1 (Anti-Arg I), anticorpo in grado di marcare i macrofagi a fenotipo M2.

Come mostrato in **figura 18**, le sezioni provenienti dai topi inoculati con AAV5 (**C/D**) hanno riportato una spiccata positività alla colorazione rispetto ai topi inoculati con PBS (**A**) o AAV2 (**B**)

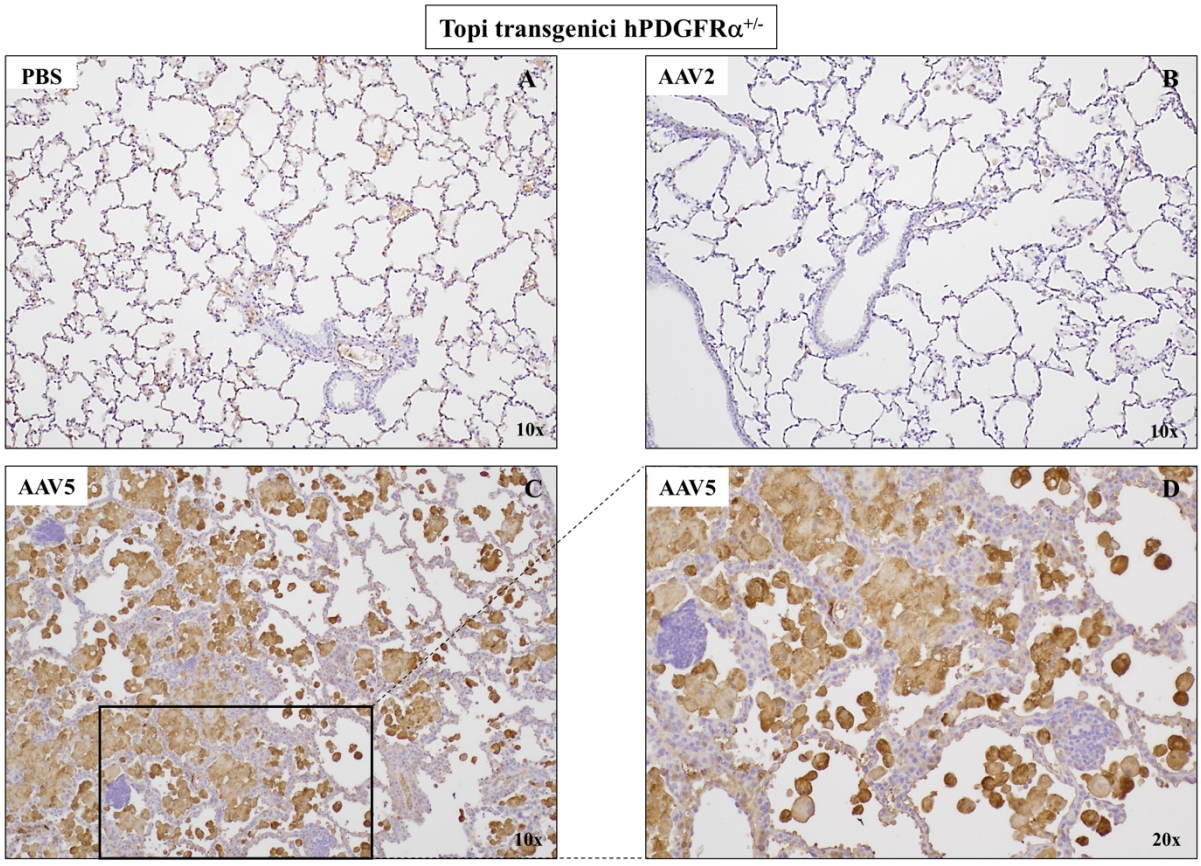


FIGURA 18 A-D
*Sezioni istologiche di polmone prelevato al giorno 240 da topi C57BL/6-hPDGFR*α transgenici *dopo doppia somministrazione di AAV5 (**C/D**), PBS (**A**) e AAV2 (**B**) con cellule positive per l'arginasi I a distribuzione alveolare, in particolare nelle sezioni di polmone di topi inoculati con AAV5 (**C/D**).*
Le sezioni sono state sottoposte a immunoistochimica con anticorpo anti-Arginasi I.
Le immagini mostrate sono rappresentative di tre esperimenti indipendenti.

Infine, come mostrato in **figura 19** l'espressione del gene Col1A1, analizzata mediante RT-PCR quantitativa in mRNA estratto dal tessuto polmonare, ha mostrato un incremento nelle biopsie di polmoni prelevati da topi *C57BL/6-hPDGFR*α transgenici dopo doppia somministrazione di AAV5 rispetto ai topi *C57BL/6-hPDGFR*α transgenici inoculati con PBS o AAV2.

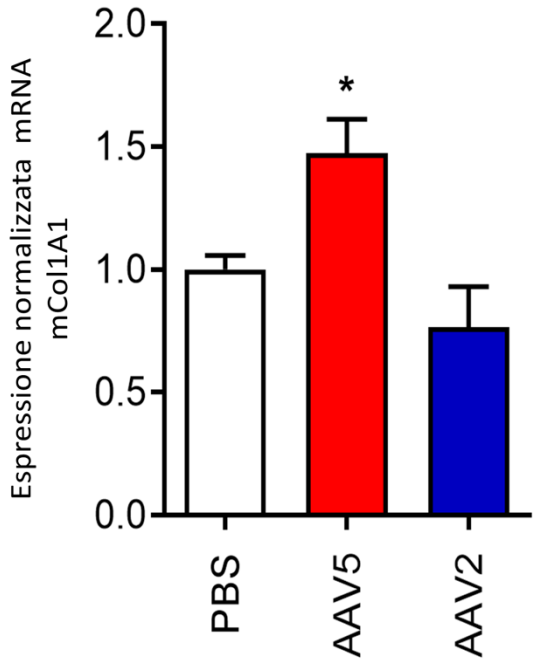


FIGURA 19
*Analisi mediante real-time PCR quantitativa dell'espressione del mRNA del gene Col1A1 estratto dai polmoni, prelevati al giorno 240, di topi C57BL/6-hPDGFRα transgenici sottoposti a doppia somministrazione di PBS, AAV5 e AAV2. I valori medi per ciascuna coorte di topi sono stati espressi in percentuale rispetto al valore medio dei topi controllo trattati con PBS e sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti condotti in triplicato. * = P < 0,01*

DISCUSSIONE

Il nostro gruppo di ricerca ha generato un nuovo modello murino sperimentale, il topo C57BL/6-*h*PDGFRα, geneticamente modificato in modo tale da esprimere il PDGFRα umano accanto a quello murino. La sua caratterizzazione, nel corso di almeno 3 generazioni, ha mostrato un fenotipo stabile e non sofferente. Il transgene viene inoltre espresso in maniera stabile e ubiquitaria, sia come trascritto che come proteina, senza in alcun modo alterare la fisiologia dell'animale.

I dati precedentemente ottenuti hanno mostrato che questo nuovo modello murino è prono all'attività pro-fibrotica degli anticorpi monoclonali anti-PDGFRα umano ottenuti da un paziente sclerodermico. Tale attività pro-fibrotica risulta specificamente legata alla presenza del recettore umano, in quanto la fibrosi cutanea non è stata indotta nei topi appartenenti al ceppo wild type C57BL/6, dotati del solo PDGFRα murino.

Partendo da questi risultati, si è sfruttato questo modello murino per studiare il ruolo del virus Adeno-Associato 5 come possibile fattore patogenetico di sclerosi sistemica.

L'inoculo per via sistemica del virus AAV5 nei topi C57BL/6-hPDGFRα transgenici ha determinato importanti variazioni del fenotipo murino sia a livello cutaneo sia, soprattutto, a livello polmonare. In entrambi i tessuti analizzati è stata, in particolare, evidenziata fibrosi simile a quella presente in altri modelli sperimentali di sclerosi sistemica. Tale fibrosi appare mediata, a livello del tessuto polmonare, da un imponente processo infiammatorio endoalveolare ed interstiziale coinvolgente i macrofagi M2. Da notare che questo risultato è stato ottenuto solo nei topi transgenici, il che indica il riconoscimento specifico del PDGFRα umano da parte di AAV5 e il ruolo di questo recettore nell'infezione cutanea e polmonare da parte di questo agente virale. Inoltre, nessun tipo di lesione è stata ottenuta nel modello transgenico in seguito ad inoculo di AAV2, un virus molto simile ad AAV5 per sequenza aminoacidica e struttura proteica. Questo dato indica ulteriormente la specificità dell'interazione AAV5-PDGFRα umano.

Tale interazione potrebbe avere un ruolo nell'induzione di alveolite fibrosante e fibrosi cutanea anche nei soggetti affetti da sclerosi sistemica. Questa ipotesi andrà verificata mediante ulteriori studi su tessuti e campioni biologici umani.

BIBLIOGRAFIA

Aden, N; Shiwen, X; Aden, D; Black, C; Nuttall, A; Denton, CP; Leask, A; Abraham, D; Stratton, R. Proteomic analysis of scleroderma lesional skin reveals activated wound healing phenotype of epidermal cell layer. Rheumatol 47: 1754-1760; 2008

Albright, CD; Salganik, RI; Craciunescu, CN; Mar, MH; Zeisel, SH. Mitochondrial and microsomal derived reactive oxygen species mediate apoptosis induced by transforming growth factor-beta1 in immortalized rat hepatocytes. J Cell Biochem 89: 254-261; 2003.

Alharbi S, Ahmad Z, Bookman A, Touma Z1, Sanchez-Guerrero J, Mitsakakis N, Johnson S. Epidemiology and Survival of Systemic Sclerosis-Systemic Lupus Erythematosus Overlap Syndrome J Rheumatol. 2018;45(10):1406-1410

Amico, D; Spadoni, T; Rovinelli, M; Serafini, M; D'Amico, G, Campelli, N; Svegliati Baroni, S; Gabrielli, A. Intracellular free radical production by peripheral blood T lymphocytes from patients with systemic sclerosis: role of NADPH oxidase and ERK1/2. Arthritis Res Ther 17: 68; 2015.

Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. Genes Dev. 2008; 22:1276–312

Andréoletti L.; Hober, D.; Hober-Vandenberghe, C.; Fajardy, I.; Belaich, S.; Lambert, V.; Vantyghem, M.C.; Lefebvre, J.; Wattre, P. Coxsackie B virus infection and beta cell autoantibodies in newly diagnosed IDDM adult patients. *Clin. Diagn. Virol.* **1998**, *9*, 125–133

Andréoletti, L.; Hober, D.; Hober-Vandenberghe, C.; Belaich, S.; Vantyghem, M.-C.; Lefebvre, J.; Wattré, P.; Hober-Vandenberghe, C.; Vantyghem, M. Detection of Coxsackie B Virus RNA sequences in whole blood samples from adult patients at the onset of type I diabetes mellitus. *J. Med. Virol.* **1997**, *52*, 121–127

Arbetman AE, Lochrie M, Zhou S, et al.: Novel Caprine Adeno- associated Virus (AAV) Capside (AAV-Go.1) Is Closely Related to the Primate AAV-5 and Has Unique Tropism and Neutralization Properties. Journal of Virology, dec. 2005,p. 15238-15245.

Arleevskaya, M.I.; Manukyan, G.; Inoue, R.; Aminov, R. Editorial: Microbial and Environmental Factors in Autoimmune and Inflammatory Diseases. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 243

Armangue,T.;Leypoldt,F.;Málaga,I.;Raspall-Chaure,M.;Martì,I.;Nichter,C.;Pugh,J.;Vicente-Rasoamalala,M.; Lafuente-Hidalgo, M.; Macaya, A.; et al. Herpes Simplex Virus Encephalitis is a Trigger of Brain Autoimmunity. *Ann. Neurol.* **2014**, *75*, 317–323.

Arnett F.C., Gourh P., Shete S., Ahn C.W., Honey R.E., Agarwal S.K., et al. Major histocompatibility complex (MHC) class II alleles, haplotypes and epitopes which confer susceptibility or protection in systemic sclerosis: analyses in 1300 Caucasian, African-American and Hispanic cases and 1000 controls. Ann Rheum Dis. 2010; 69: 822-827.

Arnson Y., Aital H., Guiducci S., Matucci-Cerinic M., Valentini G., Barzilai O., Maya R. and Shoenfeld Y.; The Role of Infections in the Immunopathogensis of Systemic Sclerosis–Evidence from Serological Studies, 2009

Arora-Singh R.K., S. Assassi, D.J. del Junco, F.C. Arnett, M. Perry, U. Irfan, et al. Autoimmune diseases and autoantibodies in the first degree relatives of patients with systemic sclerosis. J Autoimmun. 2010; 35 (1): 52-57

Avouac, J; Borderie, D; Ekindjian, OG; Kahan, A; Allanore, Y. High DNA oxidative damage in systemic sclerosis. J Rheumatol 37: 2540-2547; 2010

Bangham, C.R.M.; Araújo, A.; Yamano, Y.; Taylor, G.P. HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2015**, *1*, 15012.

Bantel-Schaal, U., Hub, B. & Kartenbeck, J. Endocytosis of adeno-associated virus type 5 leads to accumulation of virus particles in the Golgi compartment. *J. Virol.* **76**, 2340–2349 (2002)

Barnes, JL; Gorin, Y. Myofibroblast differentiation during fibrosis: role of NAD(P)H oxidases. Kidney Int 79: 944-956; 2011

Barnes, TC; Anderson, ME; Edwards, SW; Moots, RJ. Neutrophil-derived reactive oxygen species in SSc. Rheumatol 51: 1166–1169; 2012

Barsotti S, Bellando Randone S, Guiducci S, et al. Systemic sclerosis: a critical digest of the recent literature. Clin Exp Rheumatol 2014; 32: S194-S205

Bedard, K; Krause, KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. Physiol Rev 87: 245-313; 2007

Bell SA, Faust H, Mittermuller J, Kolb HJ, Meurer M: Specificity of antinuclear antibodies in scleroderma-like chronic graft- versus-host disease: clinical correlation and histocompatibility locus antigen association. *Br J Dermatol* 1996; 134: 848-854

Biondi R, Coaccioli S, Lattanzi S, Puxeddu A, Papini M. Oxidant/antioxidant status in patients with Raynaud's disease. Clin Ter 2008; 159:77–81

Black CM, Welsh KI, Maddison PJ, Jayson MI, Bernstein RM. HLA antigens, autoantibodies and clinical subsets in scleroderma. Br J Rheumatol. 1984; 23:267- 71

Blomqvist, M.; Juhela, S.; Erkkilä, S.; Korhonen, S.; Simell, T.; Kupila, A.; Vaarala, O.; Simell, O.; Knip, M.; Ilonen, J. Rotavirus infections and development of diabetes-associated autoantibodies during the first 2 years of life. *Clin. Exp. Immunol.* **2002**, *128*, 511–515.

Boin, F; Erre, GL; Posadino, AM; Cossu, A; Giordo, R; Spinetti, G; Passiu, G; Emanueli, C; Pintus, G. Oxidative stress-dependent activation of collagen synthesis is induced in human pulmonary smooth muscle cells by sera from patients with scleroderma- associated pulmonary hypertension. Orphanet J Rare Dis 9: 123; 2014

Bonifazi M Tramacere., I., Pomponio G., Gabrielli B., Avvedimento E.V., La Vecchia C., et al. Systemic sclerosis (scleroderma) and cancer risk: systematic review and meta-analysis of observational studies. Rheumatology. 2013; 52:143-154

Bonner JC. Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases. Cytokine Growth Factor Rev 2004;15:255–73

Bordron A, Dueymes M, Levy Y *et al.*: The binding of some human antiendothelial cell antibodies induces endothelial cell apop- tosis. *J Clin Invest* 1998; 101: 2029-35

Boutin S, Monteilhet V, Veron P, Leborgne C, Benveniste O, Montus MF, Masurier C. : Prevalence of serum IgG and neutralizing factors against adeno-associated virus types 1, 2, 5, 6, 8 and 9 in the healthy population: implications for gene therapy using AAV vectors. Hum Gene Ther. Jun2010 21(6):704-12

Bradshaw,M.J.;Pawate,S.;Lennon,V.A.;Bloch,K.C.;Brown,K.M.Herpessimplexvirus1encephalitis associated with voltage-gated calcium channel autoimmunity. *Neurology* **2015**, *85*, 2176–2177.

Brown KE, Young NS: Parvoviruses and bone marrow failure. *Stem Cells* (Dayton, Ohio) 1996; 14: 151-63

Bruckdorfer, KR; Hillary, JB; Bunce, T; Vancheeswaran, R; Black, CM. Increased susceptibility to oxidation of low-density lipoproteins isolated from patients with systemic sclerosis. Arthritis Rheum 38: 1060-1067; 1995.

Cabibi, D. Autoimmune hepatitis following Epstein–Barr virus infection. *BMJ Case Rep.* **2008**, *2008*, bcr0620080071.

Cacoub,P.;Terrier,B.;Saadoun,D.HepatitisCvirus-inducedvasculitis:Therapeuticoptions.*Ann.Rheum.Dis.* **2014**, *73*, 24–30.

Cadwell K, Patel KK, Maloney NS *et al.*: Virus-plus-susceptibility gene interaction determines Crohn's disease gene Atg16L1 phe- notypes in intestine. *Cell* 2010; 141: 1135-45

Carvalho D, Savage CO, Black CM, Pearson JD: IgG antiendothelial cell au- toantibodies from scleroderma patients in- duce leukocyte adhesion to human vascular endothelial cells *in vitro*. Induction of adhe- sion molecule expression and involvement of endothelium-derived cytokines. *J Clin Invest* 1996; 97: 111-9

Caselli,E.;D'Accolti,M.;Soffritti,I.;Zatelli,M.C.;Rossi,R.;DegliUberti,E.;DiLuca,D.HHV-6Ainvitro infection of thyrocytes and T cells alters the expression of miRNA associated to autoimmune thyroiditis. *Virol. J.* **2017**, *14*, 3.

Chagai Grossman, Zamir Dovrish, Yehuda Shoenfeld, Howard Amital. Do infections facilitate the emergence of systemic sclerosis? Autoimmunity Reviews 2011; 10:244- 247

Chen, J.; Zhang, H.; Chen, P.; Lin, Q.; Zhu, X.; Zhang, L.; Xue, X. Correlation between systemic lupus erythematosus and cytomegalovirus infection detected by different methods. *Clin. Rheumatol.* **2015**, *34*, 691–698.

Chizzolini C, Raschi E, Rezzonico R, Testoni C, Mallone R, Gabrielli A, Facchini A, Del Papa N, Borghi MO, Dayer JM, Meroni PL. Autoantibodies to fibroblasts induce a proadhesive and proinflammatory fibroblast phenotype in patients with systemic sclerosis. Arthritis Rheum. 2002; 46(6):1602-13

Chouri E, Servaas NH, Bekker CPJ, et al. Serum microRNA screening and functional studies reveal miR-483-5pas a po- tential driver of fibrosis in systemic sclerosis. J Autoimmun 2018; 89: 162-170

Christen, U.; Von Herrath, M.G. Infections and Autoimmunity—Good or Bad? *J. Immunol.* **2005**, *174*, 7481–7486

Cimolai N, Taylor GP, Mah D, Morrison BJ. Definition and application of a histopathological scoring scheme for an animal model of acute Mycoplasma pneumoniae pulmonary infection. Microbiol Immunol. 1992; 36(5):465–78. PMID: 1513263

Claesson-Welsh L., Eriksson A., Westermark B. and Heldin C.H. cDNA cloning and expression of the human A-type platelet-derived growth factor (PDGF) receptor establishes structural similarity to the B-type PDGF receptor. Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America 1989; 86: 4917-4921

Clements PJ, Hurwitz EL, Wong WK, et al. Skin thickness score as a predictor and correlate of outcome in systemic sclerosis. Arthritis Rheum 2000; 43: 2445-2454

Clements G.; Galbraith, D.; Taylor, K. Coxsackie B virus infection and onset of childhood diabetes. *Lancet* **1995**, *346*, 221–223

Cracowski, JL; Marpeau, C; Carpentier, PH; Imbert, B; Hunt, M; Stanke-Labesque, F; Bessard, G. Enhanced in vivo lipid peroxidation in scleroderma spectrum disorders. Arthritis Rheum 44: 1143-1148; 2001

Cracowski, JL; Kom, GD, Salvat-Melis, M; Renversez, JC; McCord, G; Boignard, A; Carpentier, PH; Schwedhelm, E. Postocclusive reactive hyperemia inversely correlates with urinary 15-F2t-isoprostane levels in systemic sclerosis. Free Radic Biol Med 40: 1732- 1737; 2006.

Cucoranu, I; Dikalova, A; Phelan, PJ; Ariyan, S; Dikalov, S; Sorescu, D. NADPH oxidase 4 mediates transforming growth factor-β-induced differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts. Circulation Research 97: 900-907; 2005

Cutolo M, Pizzorni C, Tuccio M, et al. Nailfold videocapillaro- scopic patterns and serum autoantibodies in systemic sclerosis. Rheumatology (Oxford) 2004; 43: 719-726.

Dahal,S.;Upadhyay,S.;Banjade,R.;Dhakal,P.;Khanal,N.;Bhatt,V.R.ThrombocytopeniainPatientswith Chronic Hepatitis C Virus Infection. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* **2017**, *9*, e2017019.
Dang, H., M.J. Dauphinee, N. Talal, *et al*. 1991. Serum antibody to retroviral gag proteins in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* **34:** 1336–1337

Datla, SR; Peshavariya, H; Dusting, GJ; Mahadev, K; Goldstein, BJ; Jiang, F. Important role of Nox4 type NADPH oxidase in angiogenic responses in human microvascular endothelial cells in vitro. Arterioscler Thromb Vasc Biol 27: 2319-2324; 2007

Dengler TJ, Raftery MJ, Werle M, Zimmermann R, Schonrich G: Cytomegalovirus infection of vascular cells induces expression of pro-inflammatory adhesion molecules by paracrine action of secreted interleukin- 1beta. *Transplantation* 2000; 69: 1160-8

Deshpande,S.P.;Lee,S.;Zheng,M.;Song,B.;Knipe,D.;Kapp,J.A.;Rouse,B.T.HerpesSimplexVirus-Induced Keratitis: Evaluation of the Role of Molecular Mimicry in Lesion Pathogenesis. *J. Virol.* **2001**, *75*, 3077–3088.

Di Pasquale G, Davidson BL, Stein CS, Martins I, Scudiero D, Monks A & Chiorini JA: "Identification of PDGFR as a receptor for AAV-5 transduction" Volume 9 | Number 10 | October 2003 Nature Medicine

Di Rosa F, Barnaba V: Persisting viruses and chronic inflammation: understanding their relation to autoimmunity. *Immunol Rev* 1998; 164: 17-27

Dooley, A; Low, SY; Holmes, A; Kidane, AG; Abraham, DJ; Black, CM; Bruckdorfer, KR. Nitric oxide synthase expression and activity in the tight-skin mouse model of fibrosis. Rheumatol 47: 272-278; 2008

Dostál,C.;Newkirk,M.M.;Duffy,K.N.;Palecková,A.;Bosák,V.;Cerná,M.;Zd'arský,E.;Zvárová,J.Herpes viruses in multicase families with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1997**, *815*, 334–337.

Draborg, A.H.; Duus, K.; Houen, G. Epstein-Barr Virus and Systemic Lupus Erythematosus. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**, *2012*, 1–10. (a)

Draborg, A.; Jørgensen, J.; Muller, H.; Nielsen, C.; Jacobsen, S.; Iversen, L.; Theander, E.; Nielsen, L.; Houen, G.; Duus, K. Epstein–Barr virus early antigen diffuse (EBV-EA/D)-directed immunoglobulin A antibodies in systemic lupus erythematosus patients. *Scand. J. Rheumatol.* **2012**, *41*, 280–289 (b)

Draborg, A.H.; Duus, K.; Houen, G. Epstein-Barr Virus in Systemic Autoimmune Diseases. *Clin. Dev. Immunol.* **2013**, *2013*, 1–9

Eizirik, D.L.; De Beeck, A.O. Coxsackievirus and Type 1 Diabetes Mellitus: The Wolf's Footprints. *Trends Endocrinol. Metab.* **2018**, *29*, 137–139.

Famularo G, Procopio A, Giacomelli R, et al. Soluble interleukin-2 receptor, interleukin-2 and interleukin-4 in sera and supernatants from patients with progressive systemic sclerosis. Clin Exp Immunol 1990; 81:368–372

Farooq, A.V.; Shukla, D. Herpes Simplex Epithelial and Stromal Keratitis: An Epidemiologic Update. *Surv. Ophthalmol.* **2012**, *57*, 448–462.

Feghali-Bostwick C, Medsger T Jr, Wright TM. Analysis of systemic sclerosis in twins reveals low concordance fordisease and high concordance for the presence of antinuclear antibodies. Arthritis Rheum 2003; 48: 1956–63.

Ferri C, Zakrzewska K, Longombardo G *et al.*: Parvovirus B19 infection of bone marrow in systemic sclerosis patients. *Clin Exp Rheumatol* 1999; 17: 718-20 (a)

Ferri, C., G. Longombardo, A. Azzi & K. Za- krzewska. 1999. Parvovirus B19 and systemic scle- rosis. *Clin. Exp. Rheumatol.* **17:** 267–268. (b)

Ferri C, Zignego AL. Relation between infection and autoimmunity in mixed cryoglobulinemia. Curr Opin Rheumatol 2000; 12:53–60

Ferri C, Giuggioli D, Sebastiani M *et al.*: Parvovirus B19 infection of cultured skin fibroblasts from systemic sclerosis patients: comment on the article by Ray *et al. Arthritis Rheum* 2002; 46: 2262-3 author reply 2263-4 (a)

Ferri, C., M. Cazzato, D. Giuggioli, *et al*. 2002. Systemic sclerosis following human cytomegalovirus in- fection. *Ann. Rheum. Dis.* **61:** 937–938. (b)

Ferri,C.;Colaci,M.;Fallahi,P.;Ferrari,S.M.;Antonelli,A.;Giuggioli,D.ThyroidInvolvementinHepatitisC Virus-Infected Patients with/without Mixed Cryoglobulinemia. *Front. Endocrinol.* **2017**, *8*, 159.

Filippi, C.M.; von Herrath, M.G. Viral trigger for type 1 diabetes: Pros and cons. *Diabetes* **2008**, *57*, 2863–2871

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

Fraticelli P., De Vita S., Franzolini N., Svegliati S., Scott C.A., Tonnini C., Spadoni T., Gabrielli B., Pomponio G., Moroncini G., Gabrielli A., Reduced type I collagen gene expression by skin fibroblasts of patients with systemic sclerosis after one treatment course with rituximab, Clin. Exp. Rheumatol. 2015; 33:S160–S167

Freire M., Rivera A., Sopena B., Tolosa Vilella C., Guillen-Del Castillo A., Colunga Arguelles D., et al. Clinical and epidemiological differences between men and women with systemic sclerosis: a study in a Spanish systemic sclerosis cohort and literature review. Clin Exp Rheumatol. 2017; 106:89-97

Fujinami, R.S.; Von Herrath, M.G.; Christen, U.; Whitton, J.L. Molecular Mimicry, Bystander Activation, or Viral Persistence: Infections and Autoimmune Disease. *Clin. Microbiol. Rev.* **2006**, *19*, 80–94

Furue M, Mitoma C, Mitoma H, et al. Pathogenesis of systemic sclerosis – current concept and emerging treatments. Immunol Res 2017; 65: 790-797

Gabrielli A, Montroni M, Rupoli S, Caniglia ML, DeLustro F, Danieli G. A retrospective study of antibodies against basement membrane antigens (type IV collagen and laminin) in patients with primary and secondary Raynaud' s phenomenon. Arthritis Rheum 1988; 31:1432–1436

Gabrielli, A; Svegliati, S; Moroncini, G; Luchetti, MM; Tonnini, C; Avvedimento, EV. Stimulatory autoantibodies to the PDGF receptor: a link to fibrosis in scleroderma and a pathway for novel therapeutic targets. Autoimmun Rev 7: 121-126; 2007 (a)

Gabrielli A, Svegliati S, Moroncini G, Avvedimento EV. Pathogenic autoantibodies in systemic sclerosis. Curr Opin Immunol 2007; 19:640–645. (b)

Gabrielli A, Avvedimento EV, Krieg T. Scleroderma. N Engl J Med. 2009; 360(19):1989-2003 (a)

Gabrielli, A; Moroncini, G; Svegliati, S; Avvedimento, EV. Autoantibodies against the platelet-derived growth factor receptor in scleroderma: comment on the articles by Classen et al and Loizos et al. Arthritis Rheum 60: 3521-3522; 2009 (b)

Georg-Fries, B., Biederlack, S., Wolf, J. & zur Hausen, H. Analysis of proteins, helper dependence, and seroepidemiology of a new human parvovirus. *Virology* **134**, 64–71 (1984)

Getts, D.R.; Chastain, E.M.L.; Terry, R.L.; Miller, S.D. Virus infection, antiviral immunity, and autoimmunity. *Immunol. Rev.* **2013**, *255*, 197–209

Glim, J.E., Niessen, F.B., Everts, V., van Egmond, M., Beelen, R.H. Platelet derived growth factor-CC secreted by M2 macrophages induces alpha-smooth muscle actin expression by dermal and gingival fibroblasts. Immunobiology 2013; 218 (6), 924- 929

Goupil, B.A.; Mores, C.N. A Review of Chikungunya Virus-induced Arthralgia: Clinical Manifestations, Therapeutics, and Pathogenesis. *Open Rheumatol. J.* **2016**, *10*, 129–140.

Gross, A.J.; Hochberg, D.; Rand, W.M.; Thorley-Lawson, D.A. EBV and Systemic Lupus Erythematosus: A New Perspective. *J. Immunol.* **2005**, *174*, 6599–6607

Guan,Y.;Jakimovski,D.;Ramanathan,M.;Weinstock-Guttman,B.;Zivadinov,R.TheroleofEpstein-Barr virus in multiple sclerosis: From molecular pathophysiology to in vivo imaging. *Neural Regen. Res.* **2019**, *14*, 373–386.

Hamamdzic D, Harley RA, Hazen-Martin D, Leroy EC: MCMV induces neointima in IFN-gammaR-/- mice: intimal cell apoptosis and persistent proliferation of myofibroblasts. *BMC Musculoskelet Disord* 2001; 2: 3

Harrison's Principles of Internal Medicine, 19th edition, McGraw Hill education

Hecker, L; Vittal, R; Jones, T; Jagirdar, R; Luckhardt, TR; Horowitz, JC; Pennathur, S; Martinez, FJ; Thannickal, VJ. NADPH oxidase-4 mediates myofibroblast activation and fibrogenic responses to lung injury. Nat Med 15: 1077-1081; 2009

Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. Physiol Rev. 1999; 79:1283–316

Hewagama A, Richardson B. The genetics and epigenetics of autoimmune diseases. J Autoimmun. 2009; 33:3–11

Higashi-Kuwata, N; Jinnin, M; Makino, T; Fukushima, S; Inoue, Y; Muchemwa, FC; Yonemura, Y; Komohara, Y; Takeya, H; Mitsuya, H; Inn, H. Characterization of monocyte/macrophage subsets in the skin and peripheral blood derived from patients with systemic sclerosis. Arthritis Res. Ther. 12; R128; 2010

Hildinger M, Auricchio A, Gao G, et al.: Hybrid Vectors Based on Adeno-Associated Virus Serotypes 2 and 5 for Muscle-Directed Gene Transfer. Journal of virology,July 2001, p. 6199-6203.

Honeyman, M.C.; Coulson, B.S.; Stone, N.L.; Gellert, S.A.; Goldwater, P.N.; Steele, C.E.; Couper, J.J.; Tait, B.D.; Colman, P.G.; Harrison, L.C. Association between rotavirus infection and pancreatic islet autoimmunity in children at risk of developing type 1 diabetes. *Diabetes* **2000**, *49*, 1319–1324

Honkanen, H.; Oikarinen, S.; Nurminen, N.; Huhtala, H.; Lehtonen, J.; Ruokoranta, T.; Lecouturier, V.; Tauriainen, S.; Ilonen, J.; Veijola, R.; et al. Detection of enteroviruses in stools precedes islet autoimmunity by several months: Possible evidence for slowly operating mechanisms in virus-induced autoimmunity. *Diabetologia* **2017**, *60*, 424–431.

Hu B, Phan SH: Myofibroblasts. *Curr Opin Rheumatol* 2013; 25: 71-7

Ingegnoli F, Ughi N, Mihai C. Update on the epidemiology, risk factors, and disease outcomes of systemic sclerosis. Best Pract Res Clin Rheumatol. 2018; 32:223-240

Iwayama T, Olson LE. Involvement of PDGF in fibrosis and scleroderma: recent insights from animal models and potential therapeutic opportunities. Curr Rheumatol Rep. 2013;15(2):304

Janegova,A.;Janega,P.;Rychly,B.;Kuracinova,K.;Babal,P.TheroleofEpstein-Barrvirusinfectioninthe development of autoimmune thyroid diseases. *Endokrynol. Pol.* **2015**, *66*, 132–136.

Jansen, M.A.; Beth, S.A.; Van Den Heuvel, D.; Kiefte-de Jong, J.C.; Raat, H.; Jaddoe, V.W.; van Zelm, M.C.; Moll, H.A. Ethnic differences in coeliac disease autoimmunity in childhood: The Generation R Study. *Arch. Dis. Child.* **2017**, *102*, 529–534

Jansen, M.A.; van den Heuvel, D.; van der Zwet, K.V.; Jaddoe, V.W.; Hofman, A.; Escher, J.C.; Fraaij, P.L.; Hooijkaas, H.; van Zelm, M.C.; Moll, H.A. Herpesvirus Infections and Transglutaminase Type 2 Antibody Positivity in Childhood: The Generation R Study. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2016**, *63*, 423–430

Jiang, F; Liu, GS; Dusting, GJ; Chan, EC. NADPH oxidase-dependent redox signaling in TGF-β-mediated fibrotic responses. Redox Biol 2: 267-272; 2014

John S. Cho, Terry C. Fang, Taylor L. Reynolds, Daniel J. Sofia, Stefan Hamann, and Linda C. Burkly1. PDGF-BB Promotes Type I IFN-Dependent Vascular Alterations and Monocyte Recruitment in a Model of Dermal Fibrosis PLoS One. 2016; 11(9): e0162758

Juhela, S.; Hyoty, H.; Roivainen, M.; Härkönen, T.; Putto-Laurila, A.; Simell, O.; Ilonen, J. T-cell responses to enterovirus antigens in children with type 1 diabetes. *Diabetes* **2000**, *49*, 1308–1313

Kalabay, L., B. Fekete, L. Czirjak, *et al*. 2002. Helicobacter pylori infection in connective tissue disorders is associated with high levels of antibodies to mycobacterial hsp65 but not to human hsp60. *Helicobacter*. **7:** 250–256

Kaludov N, Brown KE, Walters RW, Zabner J and Chiorini JA: Adeno-Associated Virus Serotype 4 (AAV4) and AAV5, Both Require Sialic Acid Binding for Hemagglutination and Efficient Transduction but Differ in Sialic Acid Linkage Specificity. Journal of Virology, Aug. 2001,p.6884-6893.

Kapeller, R., Chakrabarti, R., Cantley, L., Fay, F. & Corvera, S. Internalization of activated platelet-derived growth factor receptor- phosphatidylinositol-3′ kinase complexes: potential interactions with the microtubule cytoskeleton. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 6052–6063 (1993)

Kazlauskas A. and Cooper J.A. Autophosphorylation of the PDGF receptor in the kinase insert region regulates interactions with cell proteins. Cell 1989; 58: 1121- 1133

Kazlauskas A. PDGFs and their receptors. Gene. 2017; 614:1-7

Kemppainen, K.M.; Lynch, K.F.; Liu, E.; Lönnrot, M.; Simell, V.; Briese, T.; Koletzko, S.; Hagopian, W.; Rewers, M.; She, J.X.; et al. Factors That Increase Risk of Celiac Disease Autoimmunity after a Gastrointestinal Infection in Early Life. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2017**, *15*, 694–702

Kim, B.; Kaistha, S.D.; Rouse, B.T. Viruses and autoimmunity. *Autoimmunity* **2006**, *39*, 71–77

Klinkhammer BM, Floege J, Boor P. PDGF in organ fibrosis. Mol Aspects Med. 2018 Aug; 62:44-62

Korman B.D., Criswell L.A.. Recent advances in the genetics of systemic sclerosis: toward biological and clinical significance. Curr Rheumatol Rep. 2015; 17(3):21

Kothur, K.; Gill, D.; Wong, M.; Mohammad, S.S.; Bandodkar, S.; Arbunckle, S.; Wienholt, L.; Dale, R.C. Cerebrospinal fluid cyto-/chemokine profile during acute herpes simplex virus induced anti-*N*-methyl-d -

aspartate receptor encephalitis and in chronic neurological sequelae. *Dev. Med. Child Neurol.* **2017**, *59*, 806–814.

Kowal-Bielecka O, Kuryliszyn-Moskal A. Twardzina układowa. Reumatologia 2016; Suppl 1: 51-55

Krause, I.A., J.M. Anaya, J. Fraser, *et al.* 2008. Anti- infectious antibodies and autoimmune-associated autoantibodies in patients with type I diabetes mellitus and their close family members. submitted for publication. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* In Press.

Kucharz EJ, Kopeć-Mędrek M. Systemic sclerosis sine scleroderma. Adv Clin Exp Med 2017; 26: 875-880

Laitinen,O.H.;Honkanen,H.;Pakkanen,O.;Oikarinen,S.;Hankaniemi,M.M.;Huhtala,H.;Ruokoranta,T.; Lecouturier, V.; André, P.; Harju, R.; et al. Coxsackievirus B1 is associated with induction of β-cell autoimmunity that portends type 1 diabetes. *Diabetes* **2014**, *63*, 446–455.

Lambeth, JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. Nat Reviews 4: 181- 189; 2004

Larsson K, Aschan J, Remberger M, Ringden O, Winiarski J, Ljungman P: Reduced risk for extensive chronic graft-versus- host disease in patients receiving transplants with human leukocyte antigen-identical sib- ling donors given polymerase chain reaction- based preemptive therapy against cytomegalovirus. *Transplantation* 2004; 77: 526-531

Leask A, Abraham DJ: TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J* 2004; 18: 816-27

Lehmann HW, Plentz A, Von Landenberg P, Kuster RM, Modrow S: Different patterns of disease manifestations of parvovirus B19-associated reactive juvenile arthritis and the induction of antiphospholipid-anti- bodies. *Clin Rheumatol* 2008; 27: 333-8

Lehmann PV, Forsthuber T, Miller A, Sercarz EE. Spreading of T-cell auto- immunity to cryptic determinants of an autoantigen. Nature 1992; 358:155– 157

Lerner, A.; Arleevskaya, M.; Schmiedl, A.; Matthias, T. Microbes and Viruses Are Bugging the Gut in Celiac Disease. Are They Friends or Foes? *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1392

LeRoy EC, Medsger TA Jr. Criteria for the classification of early systemic sclerosis. J Rheumatol 2001; 28:1573–6

Liu, T., Zhang, J., Mu, X., Su, H., Hu, X., Liu,W., Zhao, E., Li,W.,. RNA interference against platelet-derived growth factor receptor alpha mRNA inhibits fibroblast transdifferentiation in skin lesions of patients with systemic sclerosis. PLoS One. 2013; (4), e60414

Lo Monaco A, Bruschi M, La Corte R, Volpinari S, Trotta F. Epidemiology of systemic sclerosis in a district of northern Italy. Clin Exp Rheumatol. 2011 Mar- Apr;29(2 Suppl 65):S10-4. Epub 2011 May 12

Lonnqvist B, Ringden O, Wahren B, Gahrton G, Lundgren G: Cytomegalovirus infection associated with and preceding chronic graft-versus-host disease. *Transplan- tation* 1984; 38: 465-8

Lönnrot, M.; Lynch, K.F.; Larsson, H.E.; Lernmark, Å.; Rewers, M.J.; Törn, C.; Burkhardt, B.R.; Briese, T.; Hagopian, W.A.; She, J.X.; et al. Respiratory infections are temporally associated with initiation of type 1 diabetes autoimmunity: The TEDDY study. *Diabetologia* **2017**, *60*, 1931–1940

Lucchese,G.;Kanduc,D.Zikavirusandautoimmunity:FrommicrocephalytoGuillain-Barrésyndrome, and beyond. *Autoimmun. Rev.* **2016**, *15*, 801–808.

Luchetti, MM; Moroncini, G; Jose Escamez, M; Svegliati Baroni, S; Spadoni, T; Grieco, A; Paolini, C; Funaro, A; Avvedimento, EV; Larcher, F; Del Rio, M; Gabrielli, A. Induction of scleroderma fibrosis in skin-humanized mice by administration of anti-Platelet Derived Growth Factor Receptor agonistic autoantibodies. Arthritis Rheumatol 68: 2263- 2273; 2016

Łuczyñska, M; Szkudlarek, U; Dziankowska-Bartkowiak, B; Waszczykowska, E; Kasielski, M; Sysa-Jedrzejowska, A; Nowak, D. Elevated exhalation of hydrogen peroxide in patients with systemic sclerosis. Eur J Clin Invest 33: 274-279; 2003

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: 1183-6

Lunardi C, Tinazzi E, Bason C, Dolcino M, Corrocher R, Puccetti A.: Human parvovirus B19 infection and autoimmunity. Autoimmun Rev 2008;8(2):116–20.

Lunardi C, Tiso M, Borgato L *et al.*: Chronic parvovirus B19 infection induces the production of anti-virus antibodies with au- toantigen binding properties. *Eur J Immunol* 1998; 28: 936-48
Luo JY; Liu, X; Jiang, M; Zhao, HP; Zhao, JJ. Oxidative stress markers in blood in systemic sclerosis: A meta-analysis. Mod Rheumatol 27: 306-314; 2017.
Manetti M, Guiducci S, Ibba-ManneSchi L, Matucci-Cerinic M: Mechanisms in the loss of capillaries in systemic sclerosis: angiogenesis versus vasculogenesis. *J Cell Mol Med* 2010; 14: 1241-54

Manetti M, Rosa I, Milia AF, Guiducci S, Carmeliet P, Ibba-Manneschi L, et al. Inactivation of urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) gene induces dermal and pulmonary fibrosis and peripheral microvasculopathy in mice: a new model of experimental scleroderma? Ann Rheum Dis. 2014;73(9):1700-9. PubMed PMID: 23852693

McBride,W.;Gill,K.R.;Wiviott,L.WestNileVirusinfectionwithhearingloss.*J.Infect.***2006**,*53*,e203–e205.

Meier F.M.,. Frommer K.W, Dinser R., Walker U.A., Czirjak L., Denton C.P., et al. Update on the profile of the EUSTAR cohort: an analysis of the EULAR Scleroderma Trials and Research group database. Ann Rheum Dis, 2012; 1355-1360

Meyer O: Parvovirus B19 and autoimmune diseases. *Joint Bone Spine*: revue du rhumatisme 2003; 70: 6-11

Michelson S, Alcami J, Kim SJ *et al.*: Human cytomegalovirus infection induces transcription and secretion of transforming growth factor beta 1. *J Virol* 1994; 68: 5730-7

Miller,S.D.;Katz-Levy,Y.;Neville,K.L.;VanderLugt,C.L.Virus-inducedautoimmunity:Epitopespreading to myelin autoepitopes in theiler's virus infection of the central nervous system. *Adv Virus Res* **2001**, *56*, 199–217.

Mingozzi F. and K.A. High, Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. Nat Rev Genet, 2011. 12(5): p. 341-55.

Mok MY, Yiu KH, Wong CY *et al.*: Low circulating level of CD133+KDR+cells in patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 2010; 28: S19-25

Montironi R, Cheng L, Mazzucchelli R, Morichetti D, Stramazzotti D, Santinelli A, et al. Immunohistochemical detection and localization of somatostatin receptor subtypes in prostate tissue from patients with bladder outlet obstruction. Cell Oncol. 2008;30(6):473-82. PubMed PMID: 18936524

Moon, U.Y.; Park, S.J.; Oh, S.T.; Kim, W.U.; Park, S.H.; Lee, S.H.; Cho, C.S.; Kim, H.Y.; Lee, W.K.; Lee, S.K. Patients with systemic lupus erythematosus have abnormally elevated Epstein–Barr virus load in blood. *Arthritis Res. Ther.* **2004**, *6*, R295–R302

Moroncini G, Mori S, Tonnini C, Gabrielli A.. Role of viral infections in the etiopathogenesis of systemic sclerosis. Clin Exp Rheumatol. 2013; 31(2 Suppl 76):3- 7

Moroncini G, Paolini C, Orlando F, Capelli C, Grieco A, Tonnini C, Agarbati S, Mondini E, Saccomanno S, Goteri G, Svegliati Baroni S, Provinciali M, Introna M, Del Papa N, Gabrielli A.

Mesenchymal stromal cells from human umbilical cord prevent the development of lung fibrosis in immunocompetent mice. PLoS One. 2018; 13(6):e0196048 (b)

Moroncini G, Svegliati Baroni S, Gabrielli A. Agonistic antibodies in systemic sclerosis. Immunol Lett. 2018; 195:83-87. (a)

Moroncini, G; Cuccioloni, M; Mozzicafreddo, M; Pozniak, KN; Grieco, A; Paolini, C; Tonnini, C; Spadoni, T; Svegliati, S; Funaro, A; Angeletti, M; Gabrielli, A. Characterization of binding and quantification of human autoantibodies to PDGFRα using a biosensor- based approach. Anal Biochem 528: 26-33; 2017

Moroncini, G; Grieco, A; Nacci, G; Paolini, C; Tonnini, C; Pozniak, KN; Cuccioloni, M; Mozzicafreddo, M; Svegliati, S; Angeletti, M; Kazlauskas, A; Avvedimento, EV; Funaro, A; Gabrielli, A. Epitope specificity determines pathogenicity and detectability of anti-Platelet- Derived Growth Factor Receptor α autoantibodies in Systemic Sclerosis. Arthritis Rheumatol 67: 1891-1903; 2015

Murali-Krishna K, Altman JD, Suresh M, et al. Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. Immunity 1998; 8:177 – 187

Murray, AK; Moore, TL; Manning, JB; Griffiths, CE; Herrick, AL. Noninvasive measurement of skin autofluorescence is increased in patients with systemic sclerosis: an indicator of increased advanced glycation endproducts? J Rheumatol 39: 1654-1658; 2012

Muryoi T., Kasturi KN, Kafina MJ, *e t a l* . 1992. Antitopoisomerase I monoclonal autoantibodies from scleroderma patients and tight skin mouse interact with similar epitopes. *J. Exp. Med.* **175:** 1103– 1109

Nagata, K.; Kumata, K.; Nakayama, Y.; Satoh, Y.; Sugihara, H.; Hara, S.; Matsushita, M.; Kuwamoto, S.; Kato, M.; Murakami, I.; et al. Epstein–Barr Virus Lytic Reactivation Activates B Cells Polyclonally and Induces Activation-Induced Cytidine Deaminase Expression: A Mechanism Underlying Autoimmunity and Its Contribution to Graves' Disease. *Viral Immunol.* **2017**, *30*, 240–249.

Neidhart M, Kuchen S, Distler O *et al.*: Increased serum levels of antibodies against human cytomegalovirus and prevalence of autoantibodies in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 389-92

Nenna, R.; Papoff, P.; Moretti, C.; Pierangeli, A.; Sabatino, G.; Costantino, F.; Soscia, F.; Cangiano, G.; Ferro, V.; Mennini, M.; et al. Detection of Respiratory Viruses in the 2009 Winter Season in Rome: 2009 Influenza a (H1N1) Complications in Children and Concomitant Type 1 Diabetes Onset. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **2011**, *24*, 651–659

Nevskaya T, Bykovskaia S, LyssuK E *et al.*: Circulating endothelial progenitor cells in systemic sclerosis: relation to impaired angi- ogenesis and cardiovascular manifestations. *Clin Exp Rheumatol* 2008; 26: 421-9

Nieto FJ, Adam E, Sorlie P *et al.*: Cohort study of cytomegalovirus infection as a risk factor for carotid intimal-medial thickening, a measure of subclinical atherosclerosis. *Cir- culation* 1996; 94: 922-7

Numazaki, K.; Goldman, H.; Seemayer, T.A.; Wong, I.; Wainberg, M.A. Infection by human cytomegalovirus and rubella virus of cultured human fetal islets of Langerhans. *Vivo* **1990**, *4*, 49–54

Oberley, LW; Buettner, GR. The production of hydroxyl radical by bleomycin and iron. FEBS Lett 97: 47-49; 1979.

Ogishi,M.;Yotsuyanagi,H.;Moriya,K.;Koike,K.Delineationofautoantibodyrepertoirethroughdifferential proteogenomics in hepatitis C virus-induced cryoglobulinemia. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 29532.

Oikarinen, S.; Martiskainen, M.; Tauriainen, S.; Huhtala, H.; Ilonen, J.; Veijola, R.; Simell, O.; Knip, M.; Hyöty, H. Enterovirus RNA in blood is linked to the development of type 1 diabetes. *Diabetes* **2011**, *60*, 276–279

Overbeek MJ, Boonstra A, Voskuyl AE *et al.*: Platelet-derived growth factor receptor- beta and epidermal growth factor receptor in pulmonary vasculature of systemic sclerosis- associated pulmonary arterial hypertension versus idiopathic pulmonary arterial hyper- tension and pulmonary veno-occlusive disease: a case-control study. *Arthritis Res Ther* 2011; 13: R61

Paik, YH; Kim, J, Aoyama, T; De Minicis, S; Bataller, R; Brenner, DA. Role of NADPH oxidases in liver fibrosis. Antioxid Redox Signal 20: 2854-2872; 2014

Pak, C.; McArthur, R.; Eun, H.M.; Yoon, J.W. Association of cytomegalovirus infection with autoimmune type 1 diabetes. *Lancet* **1988**, *332*, 1–4.

Pandey JP, Leroy EC: Human cytomegalovirus and the vasculopathies of autoimmune diseases (especially scleroderma), allograft rejection, and coronary restenosis. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 10-5

Peltoniemi, M; Kaarteenaho-Wiik, R; Säily, M; Sormunen, R; Pääkkö, P; Holmgren, A; Soini, Y; Kinnula, VL. Expression of glutaredoxin is highly cell specific in human lung and is decreased by transforming growth factor-beta in vitro and in interstitial lung diseases in vivo. Hum Pathol 35: 1000-1007; 2004.

Pendyala, S; Natarajan, V. Redox regulation of NOX proteins. Respir Physiol Neurobiol 174: 265-271, 2010.

Pera,A.;Broadley,I.;Davies,K.A.;Kern,F.CytomegalovirusasaDriverofExcessCardiovascularMortality in Rheumatoid Arthritis: A Red Herring or a Smoking Gun? *Circ. Res.* **2017**, *120*, 274–277.

Pinto-Díaz, C.A.; Rodríguez, Y.; Monsalve, D.M.; Acosta-Ampudia, Y.; Molano-González, N.; Anaya, J.M.; Ramírez-Santana, C. Autoimmunity in Guillain-Barré syndrome associated with Zika virus infection and beyond. *Autoimmun. Rev.* **2017**, *16*, 327–334

Plot, L.; Amital, H.; Barzilai, O.; Ram, M.; Nicola, B.; Shoenfeld, Y. Infections May Have a Protective Role in the Etiopathogenesis of Celiac Disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2009**, *1173*, 670–674

Postlethwaite AE, Shigemitsu H, Kanangat S: Cellular origins of fibroblasts: possible implications for organ fibrosis in systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 2004; 16: 733-8

Qiu H, Straat K, Rahbar A, Wan M, Soderberg-Naucler C, Haeggstrom JZ: Human CMV infection induces 5-lipoxy- genase expression and leukotriene B4 pro- duction in vascular smooth muscle cells. *The J Exp Med* 2008; 205: 19-24

Ramondetti, F.; Sacco, S.; Comelli, M.; Bruno, G.; Falorni, A.; Iannilli, A.; d'Annunzio, G.; Iafusco, D.; Songini, M.; Toni, S.; et al. Type 1 diabetes and measles, mumps and rubella childhood infections within the Italian Insulin-dependent Diabetes Registry. *Diabet. Med.* **2012**, *29*, 761–766

Ramos-Casals,M.;Loustaud-Ratti,V.;DeVita,S.;Zeher,M.;Bosch,J.-A.;Toussirot,E.;Medina,F.;Rosas,J.; Anaya, J.-M.; Font, J. Sjögren syndrome associated with hepatitis C virus: A multicenter analysis of 137 cases. *Medicine* **2005**, *84*, 81–89.

Reumatologia per studenti e medici di medicina generale, Unireuma, Idelson-Gnocchi, II edizione; 2016

Rhodes, G.H., J.R. Valbracht, M.D. Nguyen & J.H. Vaughan. 1997. The p542 gene encodes an autoanti- gen that cross-reacts with EBNA-1 of the Epstein Barr virus and which may be a heterogeneous nuclear ri- bonucleoprotein. *J. Autoimmun.* **10:** 447–454

Rhyu, DY; Yang, Y; Ha, H; Lee, GT; Song, JS; Uh, ST; Lee, HB. Role of reactive oxygen species in TGF-beta1-induced mitogen-activated protein kinase activation and epithelial-mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells. J Am Soc Nephrol 16: 667–675; 2005

Ribeiro,F.M.;Gomez,V.E.;Albuquerque,E.M.;Klumb,E.M.;Shoenfeld,Y.Lupusandleprosy:Beyondthe coincidence. *Immunol. Res.* **2015**, *61*, 160–163.

Rickinson, A.B.; Young, L.S.; Rowe, M. Influence of the Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA 2 on the growth phenotype of virus-transformed B cells. *J. Virol.* **1987**, *61*, 1310–1317

Roman, L.M.; Simons, L.F.; Hammer, R.E.; Sambrook, J.F.; Gething, M.J. The expression of influenza virus hemagglutinin in the pancreatic beta cells of transgenic mice results in autoimmune diabetes. *Cell* **1990**, *61*, 383–396

Romano E, Manetti M, Guiducci S, Ceccarelli C, Allanore Y, Matucci-Cerinic M: The genetics of systemic sclerosis: an update. *Clin Exp Rheumatol* 2011; 29 (Suppl. 65): S75-86

Root-Bernstein, R. Human Immunodeficiency Virus Proteins Mimic Human T Cell Receptors Inducing Cross-Reactive Antibodies. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 2091.

Sambo, P; Baroni, SS; Luchetti, M; Paroncini, P; Dusi, S; Orlandini, G; 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 Rheumatol 44: 2653-2664; 2001

Sambo, P; Jannino, L, Candela, M; Salvi, A; Donini, M; Dusi, S; Luchetti, MM; Gabrielli, A. Monocytes of patients with systemic sclerosis (scleroderma spontaneously release in vitro increased amounts of superoxide anion. J Invest Dermatol 112: 78-84; 1999

Sanderson, N.S.R.; Zimmermann, M.; Eilinger, L.; Gubser, C.; Schaeren-Wiemers, N.; Lindberg, R.L.P.; Dougan, S.K.; Ploegh, H.L.; Kappos, L.; Derfuss, T. Cocapture of cognate and bystander antigens can activate autoreactive B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, 734–739.

Scherer MT, Ignatowicz L, Winslow GM, et al. Superantigens: bacterial and viral proteins that manipulate the immune system. Annu Rev Cell Biol 1993; 9:101– 128

Servettaz, A; Guilpain, P; Goulvestre, C; Chéreau, C; Hercend, C; Nicco, C; Guillevin, L; Weill, B; Mouthon, L; Batteux, F. Radical oxygen species production induced by advanced oxidation protein products predicts clinical evolution and response to treatment in systemic sclerosis. Ann Rheum Dis 66: 1202-1209; 2007

Servettaz, A; Goulvestre, C; Kavian, N; Nicco, C; Guilpain, P; Chéreau, C; Vuiblet, V; Guillevin, L; Mouthon, L; Weill, B; Batteux, F. Selective oxidation of DNA topoisomerase 1 induces systemic sclerosis in the mouse. J Immunol 182: 5855-5864; 2009

Shahgasempour, S., S.B. Woodroffe, G. Sullivan- Tailyour & H.M. Garnett. 1997. Alteration in the expression of endothelial cell integrin receptors al- pha5beta1andalpha2beta1andalpha6beta1 after in vitro infection with a clinical isolate of human cytomegalovirus. *Arch. Virol.* **142:** 125–138

Simmons P, Kaushansky K, Torok-Storb B: Mechanisms of cytomegalovirus- mediated myelosuppression: perturbation of stromal cell function versus direct infection of myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 1386-90

Sinzger C, Digel M, Jahn G: Cytomegalo- virus cell tropism. *Curr Top Microbiol Immu- nol* 2008; 325: 63-83

Smatti MK, Cyprian FS, Nasrallah GK, Al Thani AA, Almishal RO and Yassine HM; Viruses and Autoimmunity: A Review on the Potential Interaction and Molecular Mechanisms

Solans, R; Motta, C; Solá, R; La Ville, AE; Lima, J; Simeón, P; Montellà, N; Armadans-Gil, L; Fonollosa, V; Vilardell, M. Abnormalities of erythrocyte membrane fluidity, lipid composition, and lipid peroxidation in systemic sclerosis: evidence of free radical-mediated injury. Arthritis Rheum 43: 894-900; 2000

Sotelo,J.;Corona,T.VaricellaZosterVirusandRelapsingRemittingMultipleSclerosis.*Mult.Scler.Int.***2011**, *2011*, 214763.

Spadoni, T; Svegliati Baroni, S; Amico, D; Albani, L, Moroncini, G; Avvedimento, EV; et al. A reactive oxygen species–mediated loop maintains increased expression of NADPH oxidases 2 and 4 in skin fibroblasts from patients with systemic sclerosis. Arthritis Rheumatol 67: 1611–1622; 2015

Steed, A.L.; Stappenbeck, T.S. Role of Viruses and Bacteria-Virus Interactions in Autoimmunity. *Curr. Opin. Immunol.* **2014**, *31*, 102–107.

Stene,L.C.;Rewers,M.Immunologyintheclinicreviewseries;focusontype1diabetesandviruses:The enterovirus link to type 1 diabetes: Critical review of human studies. *Clin. Exp. Immunol.* **2012**, *168*, 12–23.

Stölzel, U.; Schuppan, D.; Tillmann, H.L.; Manns, M.P.; Tannapfel, A.; Doss, M.O.; Zimmer, T.; Köstler, E. Autoimmunity and HCV infection in porphyria cutanea tarda: A controlled study. *Cell. Mol. Biol.* **2002**, *48*, 43–47.

Streblow DN, Soderberg-Naucler C, Vieira J *et al.*: The human cytomegalovirus chemokine receptor US28 mediates vascular smooth muscle cell migration. *Cell* 1999; 99: 511-20

Sumimoto, H. Structure, regulation and evolution of NOX-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. FEBS J 275: 3249-3277; 2008

Svegliati Baroni S; Santillo, M; Bevilacqua, F; Luchetti, M; Spadoni, T; Mancini, M; et al. Stimulatory autoantibodies to the PDGF receptor in systemic sclerosis. N Engl J Med 354: 2667-2676; 2006

Svegliati S., Spadoni T., Moroncini G. and Gabrielli A.: NADPH oxidase, oxidative stress and fibrosis in Systemic S c l e r o s i s , Free Radical Biology and Medicine, 2018 https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.04.554

Svegliati, S; Amico, D; Spadoni, T; Fischetti, C; Finke, D; Moroncini, G; Paolini, C; Tonnini, C; Grieco, A; Rovinelli, M; Funaro, A; Gabrielli, A. Agonistic anti-PDGF Receptor autoantibodies from patients with Systemic Sclerosis impact human pulmonary artery smooth muscle cells function in vitro. Front Immunol 8: 1-13; 2017

Svegliati, S; Cancello, R; Sambo, P; Luchetti, M; Paroncini, P; Orlandini, G; et al. Platelet-derived growth factor and reactive oxygen species regulate Ras protein levels in primary human fibroblasts via ERK1/2: amplification of ROS and Ras in systemic sclerosis fibroblasts. J Biol Chem 280: 36474-36482; 2005

Svegliati, S; Marrone, G; Pezone, A; Spadoni, T; Grieco, A; Moroncini, G; et al. Oxidative DNA damage induces the ATM-mediated transcriptional suppression of the WNT inhibitor WIF-1 in systemic sclerosis and fibrosis. Sci Signal 7: ra84; 2014.

Taichman RS, Nassiri MR, Reilly MJ, Ptak RG, Emerson SG, Drach JC: Infection and replication of human cytomegalovirus in bone marrow stromal cells: effects on the pro- duction of IL-6, MIP-1alpha, and TGF-beta1. *Bone Marrow Transplant* 1997; 19: 471-80

Talib, S.H.; Bhattu, S.; Bhattu, R.; Deshpande, S.; Dahiphale, D. Dengue fever triggering systemic lupus erythematosus and lupus nephritis: A case report. *Int. Med Case Rep. J.* **2013**, *6*, 71–75

Tampaki,M.;Koskinas,J.ExtrahepaticimmunerelatedmanifestationsinchronichepatitisCvirusinfection. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20*, 12372–12380.

Tan F, Arnett F. Genetic factors in the etiology of systemic sclerosis and Raynaud phenomenon. Curr Opin Rheumatol. 2000; 12(6):511-9.

Teixeira, KC; Soares, FS; Rocha, LG; Silveira, PC; Silva, LA; Valença, SS; Dal Pizzol, F; Streck, EL; Pinho, RA. Attenuation of bleomycin-induced lung injury and oxidative stress by N-acetylcysteine plus deferoxamine. Pulm Pharmacol Ther 21: 309-316; 2008.

Thannickal, VJ; Fanburg, BL. Activation of an H2O2-generating NADH oxidase in human lung fibroblasts by transforming growth factor beta 1. J Biol Chem 270: 30334- 30338; 1995

Tobiasch E., Burguete T., Klein-Bauernschmitt P., et al.: Discrimination between different types of human Adeno-associated viruses in clinical samples by PCR. Journal of Virological Methods. 71,1998:17-25.

Tokumura A, Carbone LD, Yoshioka Y, et al. Elevated serum levels of arachidonoyl-lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phos- phate in systemic sclerosis. Int J Med Sci 2009; 6: 168-176

Trojanowska M. Role of PDGF in fibrotic diseases and systemic sclerosis. Rheumatology (Oxford). 2008;47 Suppl 5:v2-4

Tsou, PS; Talia, NN; Pinney, AJ; Kendzicky, A; Piera-Velazquez, S; Jimenez, SA; Seibold, JR; Phillips, K; Koch, AE. Effect of oxidative stress on protein tyrosine phosphatase 1B in scleroderma dermal fibroblasts. Arthritis Rheum 64: 1978-1989; 2012

Tsukamoto, K., H. Hayakawa, A. Sato, *et al*. 2000. Involvement of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 in disease progression in patients with idio- pathic pulmonary fibrosis. *Thorax* **55:** 958–961.

Tucker,W.G.;Paskauskas,R.A.TheMSMVhypothesis:Measlesvirusandmultiplesclerosis,etiologyand treatment. *Med. Hypotheses* **2008**, *71*, 682–689.

Tufvesson E; Bozovic, G; Hesselstrand, R; Bjermer, L; Scheja, A; Wuttge, DM. Increased cysteinyl-leukotrienes and 8-isoprostane in exhaled breath condensate from systemic sclerosis patients. Rheumatol 49: 2322-2326; 2010

Vanheusden, M.; Broux, B.; Welten, S.P.M.; Peeters, L.M.; Panagioti, E.; Van Wijmeersch, B.; Somers, V.; Stinissen, P.; Arens, R.; Hellings, N. Cytomegalovirus infection exacerbates autoimmune mediated neuroinflammation. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 663.

Varga, J; Abraham, DJ. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. J Clin Invest 117: 557-567; 2007

Vaughan, J.H., P.X. Shaw, M.D. Nguyen, *et al*. 2000. Evidence of activation of 2 herpesviruses, Epstein-Barr virus and cytomegalovirus, in systemic sclerosis and normal skins. *J. Rheumatol.* **27:** 821–823

Virtanen, J.O.; Jacobson, S. Viruses and multiple sclerosis. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* **2012**, *11*, 528–544

Von Landenberg P, Lehmann HW, Modrow S: Human parvovirus B19 infection and antiphospholipid antibodies. *Autoimmunity Reviews* 2007; 6: 278-85

Vuorinen, T.; Nikolakaros, G.; Smell, O.; Hyypiä, T.; Vainionpää, R. Mumps and Coxsackie B3 Virus Infection of Human Fetal Pancreatic Islet-like Cell Clusters. *Pancreas* **1992**, *7*, 460–464

Walters RW, Yi SMP, Keshavjee S, Brown KE, Welsh MJ, Chiorini JA, and Joseph Zabner: Binding of Adeno-associated Virus Type 5 to 2,3-Linked Sialic Acid Is Required for Gene Transfer. J Biol Chem, 2001. Jun 8;276(23):20610-6.

White, B. 1996. Immunopathogenesis of systemic sclerosis. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* **22:** 695–708

Wucherpfennig KW, Strominger JL: Molecular mimicry in T cell-mediated auto- immunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* 1995; 80: 695-705

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

Xu, Q; Choksi, S; Qu, J; Choe, M; Banfi, B; Engelhardt, JF; Liu, ZG. NADPH oxidases are essential for macrophage differentiation. J. Biol. Chem. 291: 20030-20041; 2016

Yamakage A, Kikuchi K, Smith EA, LeRoy EC, Trojanowska M. Selective upregulation of platelet-derived growth factor alpha receptors by transforming growth factor beta in scleroderma fibroblasts. J Exp Med 1992;175:1227–34

Yu, S.F.; Wu, H.C.; Tsai, W.C.; Yen, J.H.; Chiang, W.; Yuo, C.Y.; Lu, S.N.; Chiang, L.C.; Chen, C.J. Detecting Epstein-Barr virus DNA from peripheral blood mononuclear cells in adult patients with systemic lupus erythematosus in Taiwan. *Med. Microbiol. Immunol.* **2005**, *194*, 115–120

Zabner J, Seiler M, Walters R, Kotin RM, et al.: Adeno- AssociatedVirus Type 5 (AAV5) but Not AAV2 Binds to the Apical Surfaces of Airway Epithelia and Facilitates Gene Transfer. Journal of Virology, Apr. 2000,p.3852-3858

Zakrzewska K, Cortivo R, Tonello C *et al.*: Human parvovirus B19 experimental infection in human fibroblasts and endothelial cells cultures. *Virus Res* 2005; 114: 1-5

Zhao ZS, Granucci F, Yeh L, Schaffer PA, Cantor H: Molecular mimicry by herpes simplex virus-type 1: autoimmune disease after viral infection. *Science* (New York, NY) 1998; 279: 1344-7

Zhao, W; Zhao, T; Chen, Y; Ahokas, RA; Sun, Y. Oxidative stress mediates cardiac fibrosis by enhancing transforming growth factor-beta1 in hypertensive rats. Mol Cell Biochem 317: 43–50; 2008

Zheng XY, Zhang JZ, Tu P, Ma SQ. Expression of platelet-derived growth factor B- chain and platelet-derived growth factor beta-receptor in fibroblasts of scleroderma. J Dermatol Sci 1998;18:90–97

Zhijian Wu, Aravind Asokan, and R. Jude Samulski: Adeno-associated Virus Serotypes: Vector Toolkit for Human Gene Therapy. Mol Ther. 2006 Sep; 14(3): 316-27. Epub 2006 Jul 7.

Zhou YF, Yu ZX, Wanishsawad C, Shou M, Epstein SE: The immediate early gene products of human cytomegalovirus increase vascular smooth muscle cell migration, pro- liferation, and expression of PDGF beta-re- ceptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 256: 608-13

Zincarelli C., Soltys S, Rengo G, Rabinowitz JE: “Analysis of AAV Serotypes 1-9 Mediated Gene Expression and Tropism in Mice After Systemic Injection”. Mol Ther, 2008 Jun;16(6):1073-80. doi: 10.1038/mt.2008.76. Epub 2008 Apr 15.

Zuckerman,E.;Keren,D.;Rozenbaum,M.;Toubi,E.;Slobodin,G.;Tamir,A.;Naschitz,J.E.;Yeshurun,D.; Rosner, I. Hepatitis C virus-related arthritis: Characteristics and response to therapy with interferon alpha. *Clin. Exp. Rheumatol.* **2000**, *18*, 579–584.